



UNIVERSITÀ
DEGLI STUDI
FIRENZE

DOTTORATO DI RICERCA IN
SCIENZE BIOMEDICHE

CICLOXXXI

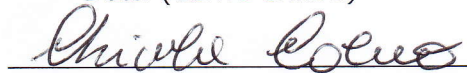
COORDINATORE Prof. Massimo Stefani

STUDIO DEGLI EFFETTI DEL TRATTAMENTO CON
INT-767 SULLA CAPACITA' DIFFERENZIAATIVA
DEI PREADIPOCITI

Settore Scientifico Disciplinare MED/13

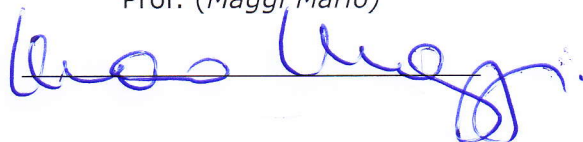
Dottorando

Dott. (Corno Chiara)



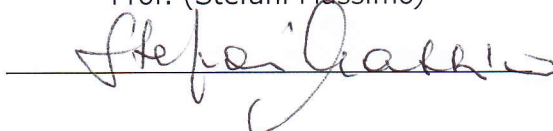
Tutore

Prof. (Maggi Mario)



Coordinatore

Prof. (Stefani Massimo)



Anni 2015/2018

Indice

1. INTRODUZIONE	3
1.1 Il tessuto adiposo: organo endocrino	3
1.1.1 Le funzioni del tessuto adiposo: lipogenesi e adipogenesi.....	4
1.2 Classificazione del tessuto adiposo	5
1.3 Sviluppo del tessuto adiposo	10
1.4 Transattivazione del tessuto adiposo	11
1.5 Disfunzione del tessuto adiposo	15
1.6 Citochine infiammatorie	19
1.7 Mitocondri e loro funzione	20
1.8 Sindrome metabolica.....	22
1.9 NASH e NAFLD	24
1.10 Acidi biliari e loro recettori.....	27
1.11 Agonisti selettivi degli acidi biliari	32
2. SCOPO DELLA TESI	37
3. MATERIALI E METODI	38
3.1 Modello animali	38
3.2 Analisi istomorfometrica e determinazione dell'ipossia nel VAT.....	39
3.3 Analisi istomorfometrica del fegato.....	40
3.4 Preparazione di frazioni totali e citosol/membrana per analisi western blot.....	41
3.5 Isolamento, caratterizzazione e differenziazione dei preadipociti di grasso viscerale di coniglio.....	41
3.6 Microscopia elettronica e a fluorescenza.....	42
3.7 Consumo di ossigeno e analisi dell'ATP intracellulare.....	44
3.8 Esperimenti con rPAD in vitro.....	44
3.9 Misurazione della quantità di cAMP intracellulare.....	45
3.10 Isolamento, caratterizzazione e analisi siRNA di preadipociti di grasso viscerale umano.....	45
3.11 Estrazione dell'mRNA, quantificazione tramite real-time PCR e analisi siRNA.....	46
3.12 Analisi Statistica.....	47
4. RISULTATI.....	48
4.1 Espressione di FXR e TGR5 nei tessuti di coniglio.....	48
4.2 Effetti metabolici benefici del trattamento con INT-767 nel modello di Mets indotto da HFD.....	49
4.3 INT-767 agisce come agonista duale FXR/TGR5 nel fegato, nel VAT e nell'intestino.....	52
4.4 Il trattamento "in vivo" con INT-767 contrasta il rimodellamento del VAT indotto dalla dieta HFD.....	54
4.5 Il trattamento "in vivo" con INT-767 induce l'espressione di geni coinvolti nell'adipogenesi bruna e nella biogenesi mitocondriale nei preadipociti.....	57
4.6 Il trattamento "in vivo" con INT-767 migliora la funzione mitocondriale e preserva la loro ultrastruttura nei preadipociti.....	60
4.7 INT-767 aumenta la differenziazione adipocitaria, la formazione delle	

goccioline lipidiche e la sensibilità all'insulina nei preadipociti indotti con DIM.....	64
4.8 INT-767 agisce direttamente sulla differenziazione delle rPAD attraverso l'attivazione di TGR5.....	66
4.9 siRNA nelle cellule rPAD.....	69
4.10 Il trattamento con INT-767 inibisce la NASH indotta dalla dieta HFD.....	71
5. DISCUSSIONE	74
6. BIBLIOGRAFIA	81

1. INTRODUZIONE

1.1 Il tessuto adiposo: organo endocrino

Per molto tempo il tessuto adiposo è stato considerato un tessuto inerte essenzialmente (Ottaviani et al., 2011). Da parte della comunità scientifica vi è stato scarso interesse nello studiare i meccanismi molecolari e i processi biologici legati a tale tessuto. Si pensava infatti che oltre alla funzione di isolamento termico, il tessuto adiposo rappresentasse semplicemente un sito di stoccaggio dei trigliceridi e di riserva energetica (Vienberg et al., 2017). Tuttavia, negli ultimi anni sono aumentati notevolmente gli studi e i dati sulla biologia e biochimica del tessuto adiposo. Attualmente l'opinione comune si riferisce al tessuto adiposo come un vero e proprio organo endocrino metabolicamente attivo, adibito primariamente ad immagazzinare l'eccesso di energia, ma anche capace di sintetizzare e rilasciare in circolo ormoni e fattori proteici in grado di regolare l'omeostasi metabolica. Il tessuto adiposo rappresenta il tessuto più diffuso nell'organismo umano. Esso, infatti, costituisce tra il 15-20% del peso corporeo di un uomo e il 20-25% di quello di una donna, ed è ampiamente distribuito in diverse regioni del corpo (Badimon et al., 2015). La principale funzione del tessuto adiposo è quella di accumulare materiale lipidico e fungere da riserva di energia in condizioni di digiuno, ma svolge anche un'importante funzione meccanica e strutturale, riempiendo spazi corporei e mantenendo la posizione di alcuni organi. La maggior parte del tessuto adiposo, definito sottocutaneo, è situato sotto la cute (Hoehn e Marieb, 2008). Questo grasso non è correlato a molte delle classiche patologie legate all'obesità, come le malattie cardiovascolari, il cancro e l'ictus, verso le quali sembrerebbe invece avere addirittura un ruolo protettivo (Porter et al., 2009). Il grasso situato nella cavità addominale a livello del mesentere intestinale e del retroperitoneo è definito invece viscerale.

L'obesità viscerale, intesa come aumento del rapporto tra la circonferenza dell'addome e la circonferenza dei fianchi, correla invece con il rischio cardiovascolare ed è indipendente da altri fattori di rischio (Yusuf et al., 2005). La

differente influenza dei due tessuti nella patogenesi dell'obesità è sottolineata anche dal fatto che il tessuto adiposo viscerale è in grado di rilasciare un maggior numero di fattori pro-aterogeni, come interleuchine pro-flogistiche (IL-6, IL-8) (Fontana et al., 2006), angiotensinogeno, (l'inibitore dell'attivatore del plasminogeno-1 (PAI-1), TNF- α e fattori di crescita endoteliali (Berg e Scherer, 2005). Inoltre, il tessuto adiposo viscerale drena direttamente nel circolo portale le citochine proinfiammatorie, e queste stimolano la produzione a livello epatico di proteine della fase acuta, come la proteina C-reattiva (PCR) o PAI-1 (Bambace et al., 2001; Libby et al., 2010). Tuttavia, il tessuto adiposo, oltre ad aver un ruolo da protagonista nella patogenesi dell'obesità, svolge numerose funzioni per il mantenimento dell'omeostasi nell'organismo (Trayhurn, 2005; Fonseca-Alaniz et al., 2006; Laclaustra et al., 2007; Kiess et al., 2008; Grant e Dixit, 2015).

1.1.1 Funzioni del tessuto adiposo: lipogenesi e adipogenesi

Il tessuto adiposo il principale organo votato a immagazzinare energia sotto forma di trigliceridi (TG), che vengono depositati negli adipociti con il processo della lipogenesi. Il processo attraverso cui invece i trigliceridi vengono rilasciati in circolo è definito lipolisi. La lipogenesi è un processo che si verifica non solo nel tessuto adiposo ma anche nel fegato, quando la dieta è ricca di carboidrati e ad un basso contenuto di grassi. La deposizione dei trigliceridi negli adipociti avviene attraverso l'assorbimento degli acidi grassi e del monoacilglicerolo, a partire dai chilomicroni e dalle lipoproteine a bassa densità (VLDL). L'enzima che catalizza questa reazione è la lipoproteina-lipasi (LPL), che viene sintetizzata e secreta dagli adipociti, per poi traslocare in seguito a glicosilazione sull'endotelio dei capillari dove espleta la sua funzione (Wang H. et al., 2009). L'insulina è probabilmente il fattore ormonale più importante che influenza la lipogenesi, inibita invece dal rilascio di glucagone. La lipogenesi è un processo molto sensibile ai cambiamenti della dieta; una dieta ricca di carboidrati attiva la lipogenesi sia a livello epatico che nel tessuto adiposo viscerale (VAT), mentre il digiuno riduce la lipogenesi nel VAT. L'aumento dei livelli di glucosio in circolo stimola la lipogenesi attraverso due meccanismi: il glucosio viene convertito in acetil-CoA, substrato della sintesi dei trigliceridi attraverso un processo di

esterificazione (Herman e Kahn, 2006), ma il glucosio stimola anche il rilascio di insulina e inibendo quello del glucagone. Nei soggetti obesi la LPL del tessuto adiposo non è regolata positivamente nel periodo post-prandiale (Coppack et al., 1992; Frayn, 2002), causando una alterata clearance dei TG nel VAT. Altra funzione importante svolta dal VAT è la lipolisi, attraverso cui le riserve energetiche (trigliceridi) vengono idrolizzate in acidi grassi e glicerolo. Questo fenomeno avviene durante periodi di stress come il digiuno e l'esercizio fisico prolungato, poiché l'organismo richiede fonti di energia. La lipasi ormone sensibile (HSL) è l'enzima che catalizza tale reazione (Jaworski et al., 2007). In seguito a fosforilazione da parte della protein chinasi A (PKA) e della protein chinasi G (PKG), l'HSL trasloca sulla membrana delle goccioline lipidiche, che sono rivestite da perilipina, una proteina che normalmente inibisce la lipolisi. La contemporanea fosforilazione della HSL e della perilipina stimolano l'idrolisi delle goccioline lipidiche (Marcinkiewicz et al., 2006; Miyoshi et al., 2007). HSL è basalmente inibita dall'insulina, mentre la sua azione è favorita dal glucagone e dall'epinefrina (; Kersten, 2001; Laclaustra et al., 2007; Kiess et al., 2008). Gli acidi grassi rilasciati dagli adipociti sono immediatamente legati all'albumina e trasportati nel flusso sanguigno il fegato, i muscoli e altri tessuti per l'ossidazione (Laclaustra et al., 2007). La β -ossidazione è un processo catabolico in cui gli acidi grassi liberi derivanti dalla lipolisi sono usati come fonte di energia convertite in molecole di acetil-CoA (Bernlohr, 2002).

1.2 Classificazione del tessuto adiposo

Nei mammiferi si identificano tre tipi di tessuto adiposo: bianco, bruno e recentemente beige. Questi tessuti hanno funzioni, morfologia e origine diverse (Pfeifer e Hoffmann, 2015) (Fig. 1).

Tessuto adiposo bianco

Il tessuto adiposo bianco (WAT) è definito così perché a fresco presenta una colorazione bianca o giallastra, a seconda della quantità dei pigmenti liposolubili presenti. Il tessuto adiposo bianco è costituito da adipociti e cellule non adipose, matrice extracellulare, vasi e nervi. Gli adipociti, la componente più abbondante

del tessuto adiposo, sono cellule formate da un sottile strato citoplasmatico il cui nucleo all'interno è schiacciato contro la membrana plasmatica della cellula conferendo alla stessa la classica forma "ad anello con castone". Ciò avviene perché l'adipocita presenta un'enorme goccia lipidica, non circondata da membrana, in cui sono immagazzinati i trigliceridi e il colesterolo esterificato. In base al loro stato nutrizionale, la misura degli adipociti varia tra 25 μm e 200 μm . Altra componente importante del tessuto adiposo bianco è la frazione vascolare stromale (SVF), essa è composta da cellule endoteliali, periciti, cellule staminali mesenchimali, pre-adipociti e cellule del sistema immunitario (macrofagi). Le caratteristiche di questo network sono fondamentali per la crescita e lo sviluppo del tessuto adiposo (Rutkowski et al., 2009). In particolare, un ruolo importante è rivestito da alcune cellule del sistema immunitario residenti nel tessuto adiposo, i macrofagi. Nei soggetti sani prevalgono macrofagi residenti che mostrano un fenotipo anti-infiammatorio (M2) (Lumeng et al., 2007). Nei soggetti obesi invece queste cellule acquisiscono un profilo pro-infiammatorio cronico di basso grado (M1), rilasciando un gran numero di chemochine e citochine incaricate di reclutare e attivare altre cellule immunitarie, inducendo la sindrome da insulino-resistenza (Weisberg et al., 2003; Schipper et al., 2012). Infine, nella SVF, un ruolo importante è svolto dalle cellule staminali adipose (ASCs) e dai preadipociti, coinvolti nella rigenerazione delle cellule mature. Tuttavia, mentre le ASCs possono differenziarsi in altre linee cellulari, i preadipociti hanno una ridotta capacità differenziativa e possono generare solo adipociti maturi (Cawthorn et al., 2012). Il processo di differenziazione attraverso cui i preadipociti vengono trasformati in adipociti maturi prende il nome di adipogenesi. Questo fenomeno coinvolge i precursori mesenchimali e porta alla formazione di cellule insulino-responsive e capaci di accumulare lipidi (Lefterova e Lazar, 2009).

L'adipogenesi è un processo che è stato molto studiato grazie alla disponibilità di modelli di coltura cellulare che ne hanno permesso di definirne i dettagli. In particolare, le linee cellulari di preadipociti 3T3-L1 e 3T3-F442A sono state utilizzate per condurre studi "in vitro" sulla differenziazione degli adipociti e

definirne così i fattori trascrizionali alla base (Rosen et al., 2000; Gregoire, 2001). A oggi, si ritiene che il processo differenziativo si divida in due fasi: una precoce, in cui la cellula mesenchimale indifferenziata si trasforma in preadipocita, e una tardiva, in cui il preadipocita assume le caratteristiche di un adipocita maturo. Queste fasi di differenziazione sono regolate da una cascata di fattori trascrizionali che coinvolgono il recettore nucleare attivato dai proliferatori del perossisoma (PPAR γ) e membri delle proteine CCAT-enhancer-binding (C/EBPs). Esistono due isoforme di PPAR γ (PPAR γ 1 e PPAR γ 2), originate da splicing alternativo (Zhu et al., 1995) ed entrambe espresse nel VAT. I fattori C/EBPs coinvolti nel differenziamento adipocitario sono invece tre: $-\alpha$, $-\beta$ e $-\delta$. (Otto e Lane, 2005). Le forme $-\beta$ e $-\delta$ di C/EBP sono le prime ad attivarsi durante l'adipogenesi, e successivamente C/EBP α interagisce con PPAR γ , attivando insieme un ciclo a feedback positivo, così da mantenere lo stato cellulare differenziato (Rosen et al., 2002). Studi condotti su modelli murini indicano che alterazioni dell'espressione di PPAR γ 1 e PPAR γ 2, sono associate alla non formazione del tessuto adiposo (Koutnikova et al., 2003; Gray et al., 2005). Gli studi dimostrano che PPAR γ è sia sufficiente che necessario per la differenziazione degli adipociti bianchi (Farmer, 2006). La sovraespressione di PPAR γ può addirittura compensare la carenza di C/EBP, ma al contrario pare che la sovraespressione di C/EPB non possa sopperire alla mancanza di PPAR γ . La cooperazione tra C/EBP e PPAR γ è confermata da studi in cui è stato osservato come C/EPB sia in grado di legare molti dei promotori del gene bersaglio PPAR γ (Lefterova e Lazar, 2009; Wang Y et al., 2010). Ciò fa ipotizzare quindi che C/EBP possa regolare direttamente l'adipogenesi solo cooperando con PPAR γ . Alcuni studi hanno evidenziato anche un meccanismo che regolerebbe in modo negativo l'adipogenesi. In particolare, le glicoproteine appartenenti alla famiglia di Wnt, che agiscono attraverso meccanismi paracrini e autocrini per influenzare lo sviluppo delle cellule. Le proteine Wnt legano recettori di membrana chiamati Frizzles (FZD), attivando una via che porta alla mancata fosforilazione della β -catenina (Lefterova e Lazar, 2009). L'inibizione della via di Wnt induce la differenziazione in senso adipocitario, come è stato osservato in linee cellulari di preadipociti 3T3-L1 (Kennel e McDougald, 2005; Gustafson e Smith, 2006).

Tessuto adiposo bruno

Presente solamente nei mammiferi, il tessuto adiposo bruno (BAT), abbondantemente presente durante la vita fetale e neonatale, resta invece solamente in tracce nell'adulto. Nell'uomo è localizzato principalmente nelle regioni interscapolare, cervicale, periaortica, perirenale, paravertebrale (Nedergaard et al., 2007; Cypess et al., 2009; van Marken Lichtenbelt et al., 2009). Gli adipociti che compongono il tessuto adiposo bruno hanno dimensioni inferiori rispetto agli adipociti bianchi. Inoltre, all'interno della cellula vi sono numerose goccioline lipidiche non avvolte da membrana, ma libere nel citoplasma. Il nucleo assume una posizione centrale e numerosa è la presenza di mitocondri all'interno del citoplasma; ciò conferisce il classico colore bruno al tessuto. Ruolo cruciale del BAT è la termogenesi, che avviene grazie alla presenza della termogenina (UCP1), una proteina presente sulla membrana mitocondriale interna che disaccoppia la catena respiratoria mitocondriale, utilizzando il gradiente protonico per produrre calore e non ATP (Nicholls & Locke, 1984; Richard & Picard, 2011). Rispetto al tessuto adiposo bianco possiede maggiore vascolarizzazione ed innervazione. È interessante notare che recenti studi condotti sull'uomo hanno dimostrato una ridotta attività del BAT nei soggetti obesi e in sovrappeso. Al contrario, la massa del BAT correla positivamente con il tasso metabolico a riposo (van Marken Lichtenbelt et al., 2009). Inoltre, in pazienti obesi, gli adipociti BAT nella regione interscapolare sembrano adottare un fenotipo di tipo bianco, con un aumento dell'accumulo di lipidi (Shimizu et al., 2014). In sintesi, la presenza di BAT attivo negli adulti rende questo particolare tipo di grasso un obiettivo interessante per nuovi approcci terapeutici per combattere l'obesità.

Tessuto adiposo beige

Adipociti simili a quelli bruni per quanto riguarda la morfologia e la presenza di UCP1 sono presenti nel WAT. Questi adipociti sono chiamati "beige" (Ishibashi e Seale, 2010) o "brite" (Petrovic et al., 2010) e sono facilmente rilevabili nel VAT di animali esposti al freddo presentando marker specifici come il recettore del

fattore di necrosi tumorale 9 (CD137), il fattore di trascrizione T-box (TBX1) e il transattivatore Cbp / p300-interagente 1 (CITED-1) (Harms & Seale, 2013). I precursori beige, pur assumendo una morfologia bruna, non attivano alcun programma per indurre l'espressione di UCP1, a meno che non vengano trattati con alcuni induttori, come ad esempio agonisti β -adrenergici o attivatori del recettore gamma attivato dai proliferatori dei perossisomi (PPAR α) (Klaus et al., 1995; Petrovic et al., 2010; Ohno et al., 2012; Wu et al., 2012). Al contrario, le cellule brune esprimono quantità relativamente elevate di UCP1 anche in condizioni non stimolate e i preadipociti bruni differenziano spontaneamente, "ex vivo", in adipociti esprimenti alti livelli di UCP1.

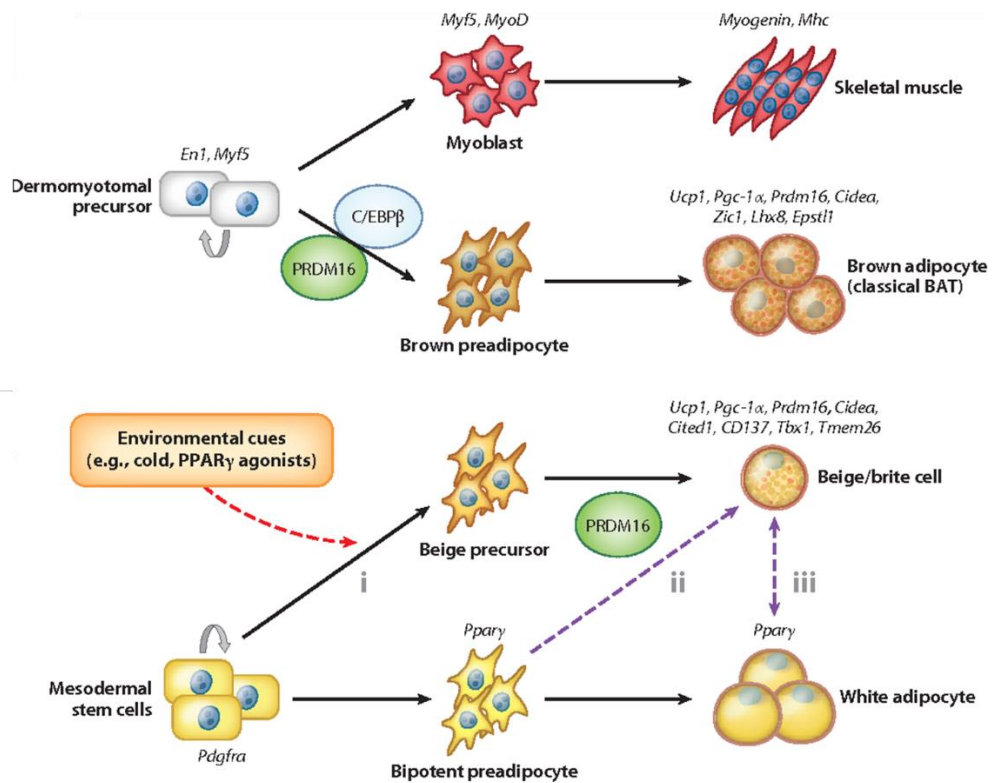


Fig. 1 Schema relativo allo sviluppo dei tre differenti tipi di tessuto adiposo (da "Shingo Kajimura, Masayuki U. Saito A new era in brown adipose tissue biology: molecular control of brown fat development and energy homeostasis. Published 2014 in Annual review of physiology")

1.3 Sviluppo del tessuto adiposo

Durante lo sviluppo embriologico, il foglietto germinale mesodermico può dare origine a progenitori mesenchimali che possono differenziare in tutte le cellule adipocitarie. Tuttavia, negli ultimi anni si è cercato di chiarire se gli adipociti dei differenti distretti tissutali derivino da precursori cellulari differenti. Questa ipotesi nasce dall'osservazione che gli adipociti maturi si sviluppano in tempi differenti e in distretti diversi durante l'embriogenesi (Xue et al., 2007; Wang Q.A. et al., 2013; Hong et al., 2015). Wang e collaboratori hanno costruito un modello di adipocita inducibile, basato sul promotore dell'adiponectina, per studiare l'adipogenesi "in vivo". In questo studio hanno dimostrato che gli adipociti viscerali si sviluppano in una fase postnatale, mentre gli adipociti sottocutanei iniziano la loro differenziazione a livello embrionale (Wang Q.A. et al., 2013)

È possibile trovare un'altra importante differenza tra i progenitori. Nell'adipogenesi "de novo" molti studi hanno dimostrato che le cellule del VAT si sviluppano a partire da progenitori cellulari che esprimono il fattore di crescita derivante dalle piastrine- α (PDGF α^+) (Berry and Rodeheffer, 2013; Hong et al., 2015; Sun et al., 2017). Tuttavia, non tutti i progenitori adipocitari possono essere identificati per l'espressione di PDGF α^+ , e non tutti i progenitori che esprimono PDGF α^+ danno origine a cellule adipocitarie (Berry and Rodeheffer, 2013). Altri studi hanno infine dimostrato che, "in vitro", progenitori capaci di dare origine a cellule adipose presentano un profilo immunologico CD31-/CD34+, che tuttavia può dare origine anche a cellule endoteliali, cellule muscolari lisce vascolari e periciti (Guimaraes-Camboa e Evans, 2017; Hepler e Gupta, 2017). Adipociti bianchi che si sviluppano nell'età adulta, ad esempio durante l'iperplasia del VAT indotta dall'obesità, probabilmente hanno una origine diversa (Jiang et al., 2014; Vishvanath et al., 2016).

Gli adipociti bruni originano da progenitori staminali miogenici, presentando infatti caratteristiche comuni alle cellule muscolari scheletriche, come trascrittoma e proteoma mitocondriale (Forner et al., 2009). I fattori trascrizionali attivati durante le fasi precoci di differenziamento degli adipociti

bruni a partire dalle cellule mesenchimali sono PAX-3 (paired box gene 3), PAX-7 (paired box gene 7) e MYF5 (fattore miogenico 5) (Lepper e Fan, 2010; Sanchez-Gurmaches e Guertin, 2014). Precursori positivi a questi fattori vengono commissionati verso il lineage bruno attraverso l'attivazione della proteina morfogenetica dell'osso 7 (BMP7) (Park et al., 2013), ma anche la proteina PR domain containing 16 (PRDM16), fattore regolatore chiave per il fenotipo bruno (Seale et al., 2008). Tuttavia, non tutti i depositi di BAT e tessuto muscolare scheletrico condividono necessariamente gli stessi marker: solo i depositi inter e subscapolari di BAT derivano da precursori Pax3⁺ Myf5⁺ (Sanchez Gurmaches and Guertin, 2014).

1.4 Transdifferenziazione tessuto adiposo

Il tessuto adiposo bruno ha ormai assunto un ruolo centrale nella ricerca di varie strategie terapeutiche contro l'obesità, proprio per la sua capacità di catabolizzare substrati energetici non producendo ATP bensì calore, che viene diffuso poi a tutto il corpo attraverso il circolo sanguigno. Harms e Seale, in una review del 2013, hanno analizzato diversi modelli sperimentali, inclusi topi knockout, evidenziando come i topi con maggior presenza di BAT siano più magri e più resistenti all'aumento di peso. Un possibile meccanismo per contrastare le malattie metaboliche potrebbe essere quindi proprio l'induzione del BAT. Questo fenomeno è oggi riconosciuto come "browning", ovvero un processo metabolico a cui può andare incontro il VAT in particolari condizioni. Quando ciò avviene all'interno del VAT compaiono adipociti multiloculari con un gran numero di mitocondri, che esprimono UCP1 e fattori di trascrizione chiave per proteine della termogenesi, come il coattivatore gamma del recettore attivato dal proliferatore del perossisoma 1-alfa (PGC1a) e PRDM16 (Cannon e Nedergaard, 2004). Recenti studi hanno dimostrato come gli adipociti bruni che compaiono come depositi nel WAT siano differenti dai tradizionali adipociti del BAT, che condividono lo stesso precursore cellulare bruno del muscolo scheletrico (Seale et al., 2008). L'adipocita bruno e il miocita, dunque, risultano Myf5⁺, contrariamente agli adipociti bruni che si sviluppano nel WAT e che risultano Myf5⁻, come il precursore cellulare del WAT (Seale et al., 2008). Le cellule Myf5-

sembrano tuttavia possano differenziare in adipociti bruni sotto stimolazione termogenica. Tali cellule, come già detto, vengono oggi chiamate beige o brite per differenziarle sia dalle cellule adipose brune che dalle cellule adipose bianche (Wu et al., 2012; Garcia et al., 2016). Il browning è un fenomeno che si verifica tipicamente dopo una prolungata esposizione al freddo, causando anche il reclutamento di nuovi adipociti nei classici siti del tessuto bruno, come la regione intrascapolare. Tuttavia, tale fenomeno può essere mimato, anche, da diversi fattori endogeni, qui di seguito trattati (Fig. 2).

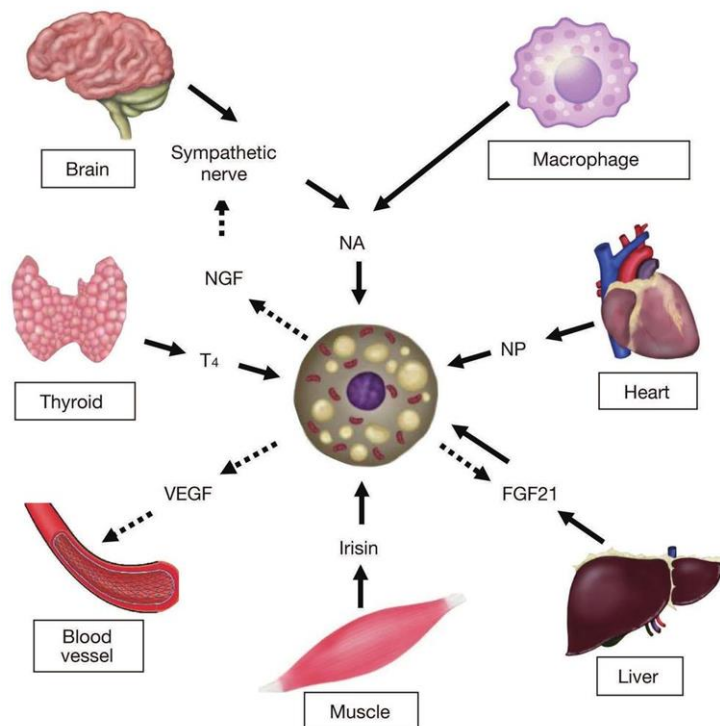


Fig. 2 Schema relative ai fattori endogeni capaci di indurre il processo di transdifferenziazione del Wat verso il BAT (da “Masayuki Saito Human brown adipose tissue: regulation and anti-obesity potential Endocrine Journal 2014, 61 (5), 409-416”)

- La *Norepinefrina* è un neurotrasmettitore, rilasciato dai neuroni noradrenergici, che può, attraverso una serie di enzimi e fattori di trascrizione, attivare l'espressione di UCP1 (Bonet et al., 2013). La norepinefrina, legando il recettore ADRB3, attiva la proteina chinasi A

(PKA) dipendente dal cAMP, inducendo la fosforilazione a valle di alcuni target della PKA come la proteina chinasi attivata da p38 (MAPK), che stimola l'espressione di PGC1 α , direttamente coinvolto nell'overespressione di UCP1. Un ruolo importante è stato messo in luce, a riguardo, per la leptina che, rilasciata dai tessuti periferici, sembrerebbe agire a livello centrale sul rilascio di norepinefrina (Smith & Vale, 2006). La leptina è un adipochina rilasciata dal tessuto adiposo in proporzione alla sua massa che regola il metabolismo e l'assunzione di cibo (Wynne et al., 2005). I recettori della leptina sono localizzati a livello centrale nel nucleo arcuato e nei nuclei ventromediali dell'ipotalamo. Recentemente però sono stati identificati anche nella porzione dorsomediale dell'ipotalamo (Rezai-Zadeh et al., 2014). La leptina medierebbe il sistema melanocortico attraverso il rilascio dell'ormone α -melanocita stimolante (α -MSH), che interagisce anche con il recettore della melanocortina 4. L'attivazione di questo recettore causa la produzione dell'ormone corticotropina che infine attiva il rilascio periferico di NE (Smith & Vale, 2006). La leptina agirebbe così sulla stimolazione simpatica (Smith & Vale, 2006). La leptina agirebbe inoltre, positivamente anche sull'adipocita, inducendo l'espressione di ADRB3, come dimostrato da alcuni studi condotti "in vitro", in cui si osserva come la leptina stimola l'espressione di PGC1 α e del recettore α attivato dal proliferatore del perossisoma (PPAR α). (Kakuma et al., 2000; Dodd et al., 2009; Wendel et al., 2015).

- L'*irisina* è una miochina prodotta dal clivaggio della proteina 5 contenente il dominio della fibronectina di tipo III (FNDC5) a livello delle fibre del muscolo scheletrico durante l'esercizio fisico (Boström & Jedrychowski, 2012). Nel tessuto adiposo viscerale, e in particolar modo, nel tessuto adiposo sottocutaneo, questa miochina esercita un efficace ruolo anti-obesità, attivando geni coinvolti nel catabolismo lipidico e nel processo di browning, tra cui UCP1 (Boström & Jedrychowski, 2012). Un recente studio condotto su adipociti umani, inoltre, dimostra come

l'irisina aumenta l'espressione di FNDC5 negli adipociti mediando p38MAPK (Zhang et al., 2016).

- L'enzima *iodotironina deiodinasi 2* (DIO2) determina, nella ghiandola tiroidea, la produzione dell'ormone triiodotirodina (T3) a partire dalla tetraiodotironina (T4). Uno studio pubblicato nel 2005 ha mostrato come differenti livelli di espressione di DIO2 nel VAT di topi provenienti da diversi ceppi, presentino differenze nella capacità di indurre UCP1 dopo l'esposizione al freddo (Xue et al., 2005). DIO2 è un enzima attivato dalla stimolazione adrenergica e inibito dal suo substrato (Christoffolete et al., 2004). Studi condotti su adipociti umani differenziati a partire da cellule multipotenti isolate dal tessuto adiposo, e trattate con T3, mostrano un aumento dell'espressione di UCP1 e un aumento della biogenesi mitocondriale, accompagnato dall'induzione di proteina CCAAT / enhancer binding (C/EBPs) e PGC1 α (Lee et al., 2012). Inoltre, il trattamento con T3 determina un aumento del consumo di ossigeno (Lee et al., 2012).
- Le *proteine morfogenetiche dell'osso* (BMP) sono proteine coinvolte nel normale sviluppo del tessuto adiposo bruno, ma anche nel browning del VAT. In particolare, BMP7 è un fattore trascrizionale chiave della differenziazione dell'adipocita verso il fenotipo bruno (Seale, 2015). BMP7, in cellule Myf5+, stimola l'espressione di regolatori precoci del bruno come PRDM16 e PGC1 α , che a loro volta inducono l'espressione di UCP1. Secondo recenti studi, BMP7 sarebbe anche capace di aumentare l'espressione di UCP1 e la presenza di mitocondri in adipociti bianchi e cellule staminali derivate dal tessuto adiposo umano (Elsen et al., 2014; Obregon, 2014; Okla et al., 2015). BMP4 è invece un fattore trascrizionale coinvolto nella differenziazione del VAT. Tuttavia, recenti studi hanno messo in luce un possibile ruolo di BMP4 nel browning del VAT, sebbene il suo ruolo sia ancora controverso. Xue e collaboratori hanno evidenziato un potenziale ruolo di BMP4 nell'indurre PGC1 α in adipociti bianchi,

inducendo così lo sviluppo di adipociti beige caratterizzati dall'aumento dei tipici marker e stimolando la biogenesi mitocondriale (Xue et al., 2014). Altri studi, invece, hanno ipotizzato un ruolo contrario di BMP4, che sembrerebbe invece far acquisire agli adipociti bruni un fenotipo bianco (Modica et al., 2016).

- I *peptidi natriuretici cardiaci* sono importanti ormoni prodotti dal cuore che vanno ad agire su numerosi bersagli, tra cui il tessuto adiposo bruno e il WAT. I tre peptidi che fanno parte di questa famiglia sono il peptide natriuretico atriale, il peptide natriuretico cerebrale e il peptide natriuretico di tipo C. È stato riconosciuto al peptide natriuretico cardiaco il ruolo di promuovere il browning in modo del tutto simile alla stimolazione adrenergica, con la quale eserciterebbe anche un lavoro sinergico (Bordicchia et al., 2012). Mentre la stimolazione del recettore ADRB3 attiverrebbe la PKA, il peptide natriuretico cardiaco, attraverso il recettore natriuretico di tipo A (NPRA), attiverrebbe la proteina chinasi dipendente dal cGMP (PKG), ed entrambe le vie indurrebbero l'attivazione di p38 MAPK, stimolando così la biogenesi mitocondriale e il browning nel tessuto adiposo (Bordicchia et al., 2012).

1.5 Disfunzione del tessuto adiposo

La principale funzione del tessuto adiposo è quella di sintetizzare e immagazzinare trigliceridi in condizioni di normale nutrizione e rilasciarli sotto forma di acidi grassi liberi e glicerolo durante il digiuno prolungato. In condizioni di digiuno, gli acidi grassi rilasciati in circolo raggiungono i tessuti periferici, quali il muscolo scheletrico, che li assorbe e li utilizza attraverso la β -ossidazione. Il mantenimento di questo equilibrio nel tessuto adiposo è garantito da una serie di fattori come ormoni, impulsi neuronali, fattori psicologici e culturali. Gli adipociti, in condizioni fisiologiche, riescono a mantenere questo equilibrio integrando tra loro i vari segnali (Abizaid et al., 2006). La disfunzione del tessuto adiposo è una delle prime anomalie che si sviluppa in un soggetto obeso e

sembra essere il principale meccanismo nello sviluppo di comorbidità metaboliche e cardiovascolari. Il tessuto adiposo diventa disfunzionante in condizioni di eccessivo bilancio energetico positivo, andando incontro a diversi processi di rimodellamento cellulare e strutturale, per adattarsi all'eccessivo apporto calorico (Fig. 3). In particolare, si osservano: espansione del tessuto adiposo attraverso iperplasia (aumento del numero di cellule) e ipertrofia (aumento delle dimensioni delle cellule) degli adipociti (Wang Q.A. et al., 2013); infiltrazione di macrofagi e cellule immunitarie nel tessuto (Weisberg et al., 2003; Ferrante, 2013); rimodellamento della matrice extracellulare (ECM) per consentire una adeguata espansione tissutale (Sun et al., 2013). L'ipertrofia degli adipociti, causata da un aumento dello stoccaggio dei trigliceridi nella cellula, rappresenta la prima fase a cui va incontro il tessuto adiposo quando un soggetto inizia gradualmente ad aumentare di peso. Nel tessuto adiposo umano e murino si osserva una aumentata espressione degli enzimi coinvolti nella sintesi dei trigliceridi, in associazione con una maggiore capacità di immagazzinare lipidi. Successivamente, vengono indotti a differenziare altri adipociti a partire da precursori o cellule mesenchimali staminali, attraverso un processo di iperplasia (Spalding et al., 2008). Pazienti con il tessuto adiposo ipertrofico hanno maggiori probabilità di sviluppare malattie legate all'obesità, compreso il peggioramento della infiammazione cronica di basso grado e la dislipidemia (Hoffstedt et al., 2010). D'altro canto, l'iperplasia del tessuto adiposo può essere protettiva contro l'obesità e l'insulino-resistenza (Hoffstedt et al., 2010). La differenza tra ipertrofia e iperplasia nei soggetti obesi si riflette principalmente nelle differenze tra i marcatori circolanti dell'infiammazione, tra cui la proteina C-reattiva (CRP), l'interleuchina-6 (IL-6), la proteina 1 chemotattica dei mitocondri (MCP-1) e la chemerina, più elevate in un tessuto adiposo ipertrofico (Klötting et al., 2010).

L'obesità, associata ad uno stato di infiammazione cronica e ad uno squilibrio dei meccanismi omeostatici, è caratterizzata inoltre da una aumentata secrezione di adipochine proinfiammatorie (Ouchi et al., 2011), un eccessivo accumulo lipidico, ma anche adipogenesi e angiogenesi alterata, ipossia locale e fibrosi (Cao, 2013; Crewe et al., 2017). In particolare, è stato osservato come un aumento della massa adiposa crei nel tessuto uno stato ipossico, poiché il sistema vascolare non

è più in grado di nutrire tutte le cellule via via che il tessuto si espande (Trayhurn et al., 2013), causando stress ossidativo e aggravando la patogenesi della disfunzione del tessuto adiposo. Gli adipociti rispondono allo stress attivando proteine chinasi appartenenti alle MAPK, come p38MAPK e la chinasi N-terminale c-Jun (JNK) (Bashan et al., 2007). In particolare, è stato osservato come la chinasi JNK sia in grado di attivare un segnale di sopravvivenza o morte in risposta al diverso tipo di stress. Un segnale transitorio di JNK attiverrebbe una risposta di tolleranza allo stress, inducendo sopravvivenza e proliferazione cellulare, attraverso l'attivazione di segnali come FOXO e AP-1 (Hayakawa et al., 2004; Fuest et al., 2012; Eijkelenboom e Burgering, 2013; Shaukat et al., 2015). Al contrario, un segnale prolungato di JNK attiva meccanismi di morte programmata attraverso la stimolazione di Bim, Bid e cFlip (Lei & Davis, 2003; Putcha et al., 2003). Ben noto è, dunque, il ruolo di JNK nella risposta allo stress, ma altrettanto conosciuto è il suo ruolo nell'insulino-resistenza legata alla patogenesi dell'obesità. JNK media la resistenza all'insulina attraverso quattro meccanismi distinti: la fosforilazione diretta e inibitoria dei substrati del recettore dell'insulina (IRS) 1 e 2 (Solinas & Karin, 2010); la promozione dell'infiammazione metabolica (Solinas et al., 2007); l'inibizione dell'asse dell'ormone tiroideo (TSH) (Sabio et al., 2010) e la regolazione negativa dell'asse PPAR α -FGF21 (Vernia et al., 2014). In particolare, l'insulino-resistenza associata all'obesità dipende dall'incapacità da parte del tessuto adiposo di espandersi, ma anche dall'aumentata produzione di adipochine (Sethi & Vidal-Puig, 2007; Virtue & Vidal-Puig, 2010).

L'insulina, prodotta dalle cellule β del pancreas, rappresenta l'ormone chiave della regolazione del metabolismo glicidico. Il glucosio rappresenta la principale fonte di energia metabolizzabile dall'organismo, in particolare per tessuti come fegato, muscolo, tessuto adiposo e cervello, tuttavia i suoi livelli circolanti devono essere mantenuti tra 4 mM e 7 mM, per evitare effetti citotossici. L'insulina svolge in questa regolazione un ruolo importante, inibendo la gluconeogenesi e la glicogenolisi a livello epatico, aumentando la glicogenosintesi a livello del tessuto muscolare e aumentando la presenza di trasportatori del glucosio (GLUT) sulla membrana cellulare nel tessuto adiposo e

muscolare, così da garantire un maggior assorbimento del glucosio. L'insulina svolge però un importante ruolo anche sul metabolismo dei lipidi. In particolare, essa riduce i livelli circolanti di acidi grassi inibendo l'attività della HSL nel tessuto adiposo, de-fosforilandola. Inoltre, stimola la sintesi dei TG, promuovendo, da una parte, il trasporto di glucosio negli adipociti (fondamentale per la conversione in acetil-CoA) e, dall'altra, la sintesi della LPL nel tessuto adiposo, per cui nelle cellule si accumulano acidi grassi esterificabili.

In condizioni di digiuno o di stress, la secrezione di insulina è inibita dal rilascio da parte dell'organismo anche di adrenalina, che agisce direttamente mobilizzando le riserve energetiche e rendendole disponibili, tra cui glucosio dal fegato (attraverso gluconeogenesi e glicogenolisi) e acidi grassi dal tessuto adiposo (attraverso la lipolisi). Durante la fase di alimentazione, il recettore dell'insulina viene invece attivato nelle cellule adipose, inducendo la pathway del fosfatidilinositolo 3 chinasi (PI3K) - AKT/PKB-fosfodiesterasi-3 (PDE3), con conseguente diminuzione dei livelli di AMP ciclico (cAMP) intracellulare (Czech et al., 2014). Tuttavia, a digiuno, la stimolazione β -adrenergica, agendo sugli adipociti, induce l'attivazione dell'adenilato ciclasi (AC) con conseguente aumento dei livelli di cAMP. Il cAMP è così in grado di attivare la proteina chinasi A (PKA), che fosforila e attiva la lipasi ormone sensibile (HSL), il cui ruolo è quello di idrolizzare i trigliceridi, inducendone il rilascio sotto forma di acidi grassi liberi e glicerolo (Czech et al., 2014). Inoltre, uno studio del 2000 ha osservato come negli adipociti ipertrofici vi siano livelli di cAMP-PKA-HSL più alti (Osuga et al., 2000). Ne consegue che gli adipociti più grandi presentano insulino-resistenza associata ad un aumento del tasso lipolitico. La disfunzione del tessuto adiposo può portare anche a cambiamenti nella matrice tissutale extracellulare, che può essere considerata come indice di fibrosi del tessuto (Halberg et al., 2009; Spencer et al., 2011). Infine, in condizioni di obesità, il tessuto adiposo diventa incapace di accumulare l'eccesso di lipidi ed energia che gli arriva, riversandoli in circolo. Il flusso di lipidi sarà così direzionato verso altri tessuti ectopici, come fegato, muscolo, cuore (Després et al., 2008). Tuttavia, le cellule in questi tessuti non hanno come principale funzione quella di accumulare lipidi, per cui vanno

incontro a danni da lipotossicità, alimentando poi i processi di insulino-resistenza, apoptosi e infiammazione (Unger et al., 2010).

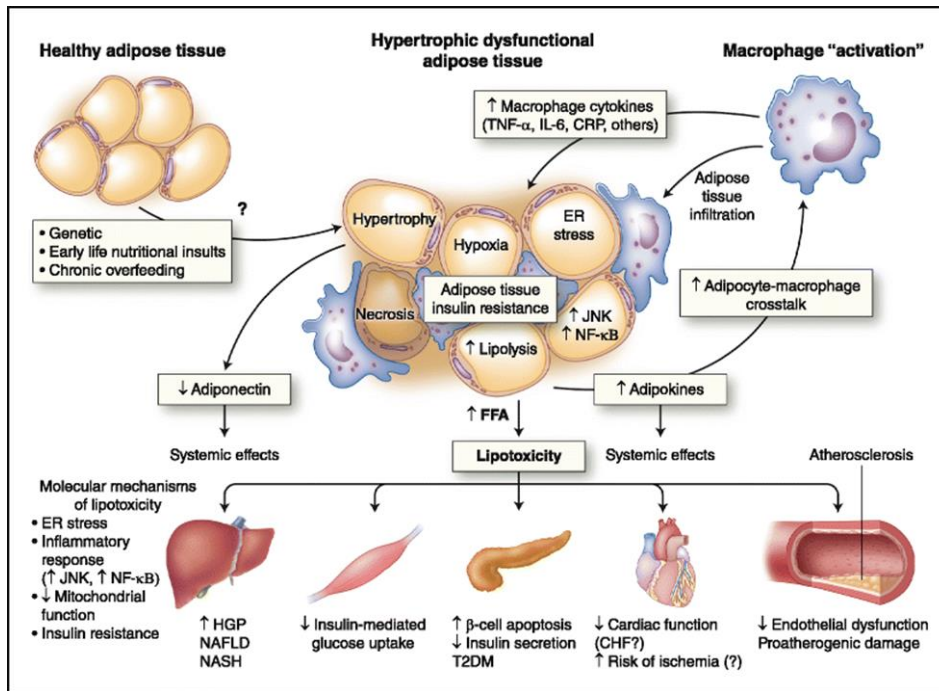


Fig. 3 Schema degli effetti sistemici causati dalla disfunzione degli adipociti nel tessuto adiposo ("Kenneth C. The Role of Adipose Tissue and Lipotoxicity in the Pathogenesis of Type 2 Diabetes Current Diabetes Reports 2010, Volume 10, Issue 4, pp 306–315").

1.6 Citochine infiammatorie

L'espansione del tessuto adiposo in soggetti obesi è associata ad infiltrazione di cellule immunitarie pro-infiammatorie che causano uno stato di infiammazione cronica di basso grado. La risposta infiammatoria associata all'obesità dipende, infatti, prevalentemente dal tessuto adiposo, anche se successivamente è possibile osservare un coinvolgimento nel decorso della patologia anche di altri tessuti, come il fegato (Wellen & Hotamisligil, 2005; Shoelson & Lee, 2006). La risposta infiammatoria che si sviluppa nel tessuto porta gli adipociti ipertrofici a rilasciare chemochine, come la proteina 1 chemoattraente dei monociti MCP1 e TNF α , che a loro volta modulano il processo infiammatorio. In particolare, MCP1

esercita la sua azione richiamando macrofagi nel tessuto, e alti livelli di questa chemochina promuovono la dedifferenziazione e i processi patologici associata con l'iperinsulinemia e l'obesità (Sartipy & Loskutoii, 2003). L'infiltrazione dei macrofagi nel tessuto adiposo, in corso di obesità, è stata osservata sia nell'uomo che in modelli sperimentali di topo (Weisberg et al., 2003; Xu et al., 2003). L'attivazione dei macrofagi è un punto cruciale nella risposta infiammatoria, ed è mediata da cellule immunitarie del sistema adattivo e mediatori da essi rilasciati. In particolare, i linfociti T helper (Th2) e i linfociti T regolatori (Treg) hanno la capacità di polarizzare i macrofagi verso un fenotipo anti-infiammatorio, M2, attraverso il rilascio di citochine come l'interleuchina 4 (IL-4) e l'interleuchina 13 (IL-13); mentre i linfociti Th1 e Th17 promuovono un fenotipo macrofagico di tipo pro-infiammatorio M1, rilasciando interferon γ (INF γ) e interleuchina-17 (IL-17) (Odegaard et al. 2007; Tiemessen et al., 2007). Studi condotti in modelli animali, hanno evidenziato come, in corso di obesità, si osservi una trasformazione, all'interno del tessuto, dei macrofagi da un fenotipo anti-infiammatorio (M2) verso un fenotipo pro-infiammatorio (M1) (Lumeng et al 2007a; Lumeng et al, 2007b). In corso di disfunzione del tessuto adiposo, dunque, gli eventi si susseguono cronologicamente partendo da un aumento della presenza di cellule Th1, le quali, rilasciando mediatori pro-infiammatori, richiamerebbero macrofagi inducendone la polarizzazione verso M1, promuovendo così l'insulino-resistenza (Kintscher et al., 2008; Duffaut et al., 2009).

1.7 Mitochondri e loro funzione

I mitocondri sono organelli citoplasmatici lunghi circa 1-4 μm e con un diametro di circa 1,5 μm . Essi sono caratterizzati dalla presenza di una doppia membrana e da un genoma proprio. La membrana esterna è più permeabile alle piccole molecole rispetto alla membrana interna, che presenta diversi enzimi coinvolti nella catena di trasporto degli elettroni e quindi nel processo di generazione dell'ATP. La principale funzione dei mitocondri è utilizzare il gradiente elettronico, prodotto a seguito della β -ossidazione degli acidi grassi, nella matrice mitocondriale per produrre energia. All'interno della cellula i mitocondri

si trovano in un continuo stato dinamico a ponte tra eventi di fusione e fissione, essenziali per la rimozione dei mitocondri danneggiati, la regolazione dei processi di apoptosi e le normali funzioni cellulari (Hales, 2004; Youle & van der Bliek, 2012). Il processo di fusione mitocondriale è regolato da tre proteine: mitofusina 1 (Mfn1) mitofusina 2 (Mfn2) e mitochondrial dynamin like GTPase (OPA1), localizzate, rispettivamente, le prime due sulla membrana esterna e la terza sulla membrana interna (Hales et al., 1997; Cipolat et al., 2004). La fissione mitocondriale è invece regolata dalla proteina di fissione 1 mitocondriale (Fis1) e dalla proteina dinamina 1-like (Drp1), situati rispettivamente sulla membrana esterna e nel citosol. Recenti studi condotti su topi obesi hanno dimostrato un ruolo della disfunzione mitocondriale nella sindrome metabolica, causato da una eccessiva produzione di ROS a livello degli adipociti, con disregolazione degli enzimi coinvolti nei processi antiossidanti (Furukawa et al., 2004; Ren et al., 2010; Heinonen et al., 2015). Diversi studi hanno documentato il ruolo della disfunzione mitocondriale in modelli animali di diabete mellito di tipo 2 (Lowell & Shulman, 2005; Schrauwen-Hinderling et al., 2007; Abdul-Ghani & DeFronzo, 2008; Mulder & Ling, 2009; Youle & van der Bliek, 2012). Anche in pazienti affetti da diabete mellito di tipo 2, l'insulino resistenza è stata ricondotta alle disfunzioni mitocondriali, e in particolare legata alla ridotta capacità della catena respiratoria e alla ridotta produzione di ATP (Mootha et al., 2003; Razak & Anand, 2004; Morino et al., 2005; Hojlund, 2007). Il signaling dell'insulina è alterato dalla produzione incontrollata di ROS, che interferendo con il processo di ossidazione dell'acetil-CoA, determina ad un aumento dei lipidi (Lowell & Shulman, 2005; Houstis et al., 2006; Krebs & Roden, 2007).

1.8 Sindrome metabolica

La sindrome metabolica (Mets) rappresenta oggi una delle patologie più diffuse nei paesi industrializzati e in via di sviluppo. Il concetto di sindrome metabolica nasce nel 1923 quando Kylin, un medico svedese, dimostrò l'associazione tra ipertensione, iperglicemia e gotta (Kylin, 1923). Qualche anno dopo è stata descritta l'associazione tra obesità viscerale e anomalie metaboliche, riscontrate nelle malattie cardiovascolari (CVD) e nel diabete mellito di tipo 2 (T2DM) (Vague, 1947). Una importante svolta è avvenuta in seguito alla Conferenza di Banting del 1988, dove è stato descritto "un gruppo di fattori di rischio per il diabete e le malattie cardiovascolari" definendole nel loro insieme "Sindrome X" (Raven, 1988). Il suo principale contributo è stato l'introduzione del concetto di resistenza all'insulina. Solo un anno dopo Kaplan definì il "quartetto della morte", cioè la contemporanea presenza di obesità viscerale, intolleranza al glucosio, ipertrigliceridemia e ipertensione (Kaplan, 1989), rinominata nel 1992 come la "sindrome dell'insulino resistenza" (Haffner et al., 1992). Nel corso degli anni, sono state proposte diverse classificazioni anche se risulta abbastanza difficile stabilire i criteri diagnostici definitivi relativi a questa sindrome. Un primo tentativo è stato fatto dall'Organizzazione Mondiale della Sanità (OMS), che nel 1998 ha definito la Mets come presenza di diabete mellito, alterata glicemia a digiuno, ridotta tolleranza al glucosio e/o insulino resistenza associate 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; Alberti & Zimmet, 1998).

Il Gruppo Europeo per lo Studio della Resistenza all'Insulina (EGIR), ha contestato quanto affermato dall'OMS, apportando alcune modifiche alla definizione di Mets, in particolare per ben differenziare il concetto di insulino-resistenza dal concetto di diabete mellito. Perciò, secondo l'EGIR la Mets è definita come la presenza di insulino-resistenza (solo in soggetti non diabetici) e almeno due dei seguenti criteri:

- glicemia a digiuno > 110 mg/dL;
- dislipidemia (trigliceridi > 177 mg/dL e/o HDL < 39 mg/dL 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) (Balkau & Charles, 1999)

Nel 2001, il National Cholesterol Education Program - Adult Treatment Panel III (NCEP / ATP) ha pubblicato i primi veri criteri diagnostici, suggerendo come la Mets possa essere definita se vengono riscontrate in esso almeno tre delle seguenti caratteristiche:

- obesità addominale quantificabile con una circonferenza della vita superiore ai 102 cm negli uomini e 88 cm nelle donne;
- aumento dei valori dei trigliceridi (\geq 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 \geq 110 mg/dL (Cleeman, 2001).

Successivamente, l'American Association of Clinical Endocrinologists (AACE) nel 2003 pone nuovamente l'attenzione sul concetto di insulino-resistenza, specificando come necessari solo 2 dei 4 criteri di seguito proposti per definire la Mets:

- 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 (Einhorn et al., 2003).

Ad oggi una delle ultime definizioni proposte di Mets risale al 2005 (International Diabetes Federation: The IDF consensus worldwide definition of the metabolic syndrome, <http://www.idf.org/metabolic-syndrome>). Pur riconoscendo che sia molto difficile trovare un accordo sulla definizione dei parametri clinici per definire la Mets, soprattutto variabilità di manifestazioni fenotipiche, anche legate a processi parafisiologici come l'invecchiamento, l'IDF sottolinea l'importanza dell'obesità centrale e dell'insulino-resistenza come fattori determinanti (Nakamura et al., 1994; Anderson et al., 2001). In particolare, è l'obesità centrale (addominale), secondo questa nuova classificazione, il fattore cardine per una diagnosi di Mets, e non più l'insulino-resistenza. Questa nuova classificazione prevede l'obesità viscerale più:

- aumento dei trigliceridi: ≥ 150 mg/dL (1,7 mmol/L);
- riduzione del colesterolo HDL: < 40 mg/dL (1,03 mmol/L) nei maschi < 50 mg/dL (1,29 mmol/L) nelle donne;
- ipertensione: sistolica BP ≥ 130 or diastolica BP ≥ 85 mm/Hg;
- glicemia a digiuno ≥ 100 mg/dL o precedente diagnosi di diabete di tipo 2; se superiore a 100 mg/dL, la curva da carico del glucosio (OGTT) è fortemente consigliata ma non è necessaria per stabilire una diagnosi di Mets.

1.9 NASH e NAFLD

Dati clinici, epidemiologici e biochimici sostengono fortemente il concetto che la forma meno grave di steatosi epatica non alcolica (Non-alcoholic fatty liver disease, NAFLD) rappresenti una manifestazione epatica della Mets (Marchesini et al., 1999). La NAFLD può estrinsecarsi con caratteristiche anatomo-patologiche e cliniche molto diverse tra loro, a partire dalla semplice steatosi, alla steatoepatite non alcolica (NASH) associata a infiammazione e/o fibrosi, fino alla

cirrosi epatica e il carcinoma epatocellulare (Sayiner et al., 2016). Negli Stati Uniti, tra il 30 e il 40 % della popolazione adulta mostra segni di steatosi, e di questi il 3-12 % sviluppa poi la NASH (Spengler & Loomba, 2015). La patogenesi rimane ancora poco chiara, tuttavia l'evoluzione della NAFLD può essere divisa in due fasi. In una prima fase si verifica un accumulo di grasso a livello del tessuto epatico che sembra essere legata ad una delle caratteristiche della Mets, l'insulino-resistenza, fattore a comune tra l'obesità e il diabete. I meccanismi proposti che porterebbero il fegato ad accumulare grasso sono principalmente tre (Pierantonelli e Svegliati-Baroni, 2018): 1) aumento della lipolisi a livello del VAT, 2) attivazione della lipogenesi de novo a livello epatico, stimolata da un aumento del glucosio e dell'insulina in circolo (Postic & Girard, 2008), 3) e un alto contenuto di grassi nella dieta. Grazie all'utilizzo di isotopi stabili, in pazienti obesi con NAFLD, è stato possibile osservare che l'eccesso di acidi grassi liberi deriva per il 59% dalla lipolisi del tessuto adiposo, per il 26% dalla lipogenesi "de novo" e solo per il 15% dalla dieta ipercalorica (Donnelly et al., 2005). La seconda fase, ovvero la transizione tra steatosi e NASH, prevede invece numerosi e complessi processi che coinvolgono il VAT e la lipotossicità da esso causata, lo stress ossidativo, le disfunzioni mitocondriali e le alterazioni dell'asse fegato-intestino (Marra & Svegliati-Baroni, 2018). Inoltre, nel processo che porta all'infiammazione e alla fibrosi nella NASH, un ruolo importante è svolto dai macrofagi residenti nel fegato, o cellule di Kupffer, che, attivate, reclutano altri monociti e leucociti dal circolo sanguigno, alimentando così il processo infiammatorio. Tutte queste modificazioni inducono poi, a valle, l'attivazione delle cellule stellate nel fegato, con conseguente deposizione della matrice extracellulare (Koyama & Brenner, 2017). Sono stati numerosi i tentativi di riprodurre un modello sperimentale animale per lo studio della NAFLD/NASH. Alcuni modelli animali di NASH indicano che il colesterolo aumentato è un fattore chiave nella progressione di questa patologia (Subramanian et al., 2011; Van Rooyen et al., 2011), tuttavia, ad oggi, non si è ancora riusciti a riprodurre un vero modello animale, con tutte le caratteristiche della NAFLD.

L'insulino-resistenza rappresenta sicuramente l'evento scatenante la steatosi a livello epatico (Kristina et al., 2006). In particolare, la perdita di sensibilità all'insulina da parte del VAT determina un aumento dell'attività di enzimi adibiti al catabolismo dei trigliceridi, come la lipasi adiposa dei trigliceridi (ATGL), la lipasi ormone sensibile (HSL) e la lipasi monogliceride (MGL) (Schweiger et al., 2006). L'aumento dell'attività di questi enzimi ha la duplice azione di ridurre l'accumulo dei trigliceridi nel VAT e di aumentare il rilascio di acidi grassi in circolo, che verranno così accumulati a livello epatico, sotto forma di trigliceridi. L'insulino-resistenza media inoltre il processo di lipogenesi "*de novo*" a livello epatico, che conduce alla sintesi di acidi grassi liberi (Vatner et al., 2015). La lipogenesi è un meccanismo strettamente legato alla glicolisi, il cui prodotto, l'acetil-CoA, viene utilizzato per sintetizzare acidi grassi, convertiti poi in trigliceridi nello stesso tessuto epatico (Postic & Girard, 2008). L'intero processo è regolato a monte da due fattori trascrizionali; la proteina legante gli elementi regolatori degli steroli (SREBP1c) e la proteina legante gli elementi di risposta dei carboidrati (ChREBP). SREBP1c è attivato dal recettore dell'insulina oppure dal recettore nucleare LXR (Beaven et al., 2013; Kawano & Cohen, 2013; Sanders & Griffin, 2016), mentre ChREBP è attivato dai prodotti intermedi della glicolisi, andando a regolare due enzimi chiave della lipogenesi "*de novo*", acetil CoA carbossilasi (ACC) e acido grasso sintasi (FAS). ACC trasforma l'acetil-CoA in malonil-CoA, prima fase della lipogenesi, mentre successivamente FAS utilizza il malonil-CoA come substrato per la sintesi degli acidi grassi. Questo processo, cronico e prolungato nel tempo di produzione e utilizzo dell'acetil-CoA può causare un danno a livello del ciclo di Krebs e della catena mitocondriale, con conseguente aumento dei ROS (Sunny et al., 2017). Sunny e collaboratori, utilizzando isotopi stabili, hanno osservato un aumento della funzione mitocondriale, a livello epatico, in soggetti obesi con NAFLD (Sunny et al., 2011). I risultati di quello studio suggeriscono che i mitocondri abbiano un ruolo protettivo nel contrastare i processi ossidativi causati dal sovraccarico lipidico e che tale capacità venga persa durante il processo di NASH (Koliaki et al., 2015). L'eccesso di acidi grassi liberi può inoltre innescare direttamente la produzione di ROS, senza coinvolgere l'ossidazione lipidica e i mitocondri. Infatti, normalmente

gli acidi grassi vengono catabolizzati a livello epatico per produrre energia. Tale processo determina il rilascio di una minima quota di ROS, che vengono eliminati dalla cellula attraverso meccanismi compensatori antiossidanti (Neuschwander-Tetr, 2010). In caso di NASH, il processo di β -ossidazione viene incrementato per contrastare l'apporto lipidico al tessuto e questo determinerebbe un aumento della produzione di ROS e una minore efficienza dei meccanismi antiossidanti (Yesilova et al., 2005).

1.10 Acidi biliari e loro recettori

Gli acidi biliari (BA) sono molecole anfipatiche contenenti sia una regione idrofila che una regione idrofoba e costituiscono la componente principale della bile. I BA rappresentano il prodotto finale del catabolismo del colesterolo e sono sintetizzati nel fegato e immagazzinati nella cistifellea, da dove fluiscono nell'intestino tenue dopo l'ingestione del pasto. A livelli intestinale BA esercitano una potente azione emulsionante promuovendo l'assorbimento dei lipidi, comprese le vitamine liposolubili (Insull, 2006; Lefebvre et al., 2009). L'acido colico e l'acido chenodesossicolico sono gli acidi biliari primari più abbondanti nella bile. Essi sono formati tramite idrossilazione del colesterolo in posizione 7, grazie all'enzima colesterolo 7 α -idrossilasi (CYP7A1) o P450. Prima di essere secreti gli BA vengono coniugati ad amminoacidi come la taurina e la glicina, producendo rispettivamente glicconiugati e tauroconiugati. Questo processo di coniugazione aumenta la loro natura anfipatica. I sali biliari così formati sono secreti attraverso l'azione della proteina di esportazione del sale biliare (BSEP) nei canalicoli biliari, da cui raggiungono la cistifellea, dove vengono concentrati per formare la bile. Nell'intestino, una piccola percentuale di sali biliari viene deconiugata dal microbiota e la 7 α -deidrossilasi batterica converte gli acidi biliari primari CA e CDCA in acido desossicolico (DCA) e acido litocolico (LCA), rispettivamente, che sono re-coniugati con glicina o taurina (John e Chiang, 2013). Oltre ad avere un ruolo nell'assorbimento dei lipidi dalla dieta e nell'omeostasi del colesterolo, è stato dimostrato il ruolo degli acidi biliari come veri e propri segnali ormonali che regolano il metabolismo. In particolare, i meccanismi di segnalazione attivati dagli acidi biliari coinvolgono due recettori

noti come “recettori attivati dagli acidi biliari”; la proteina G transmembrana accoppiata al recettore per gli acidi biliari di tipo I (GP-BAR1), ovvero Takeda G-protein-coupled Receptor 5 (TGR5) (Maruyama et al., 2002; Kawamata et al., 2003), e il recettore nucleare del farnesoide X (FXR o NR1H4) (Makishima et al., 1999; Parks et al., 1999; Wang H. et al., 1999).

TGR5, originariamente riconosciuto come un recettore orfano, è oggi identificato come un membro della sottofamiglia Rhodopsin-like di GPCR (Classe A). Questo recettore degli acidi biliari è stato scoperto nel 2002 (Maruyama et al., 2002) e caratterizzato per la prima volta nel 2003 (Kawamata et al., 2003). TGR5 è espresso in numerosi tessuti, tra cui fegato, cistifellea, ileo, colon, cuore, milza, reni, placenta, polmone, utero, testicolo, ghiandola mammaria, prostata, muscolo scheletrico, tessuto adiposo bruno, leucociti, macrofagi, cellule endoteliali e aree specifiche del sistema nervoso centrale (Casaburi et al., 2012; Stepanov et al., 2013; Eggink et al., 2014).

TGR5 svolge le sue funzioni in modo tessuto-specifico, comunque aumentando i livelli di cAMP (Eggink et al., 2014) (Fig. 4). In particolare, se attivato dal proprio ligando, TGR5 trasduce il segnale attivando la proteina G stimolatoria (Gs), che va a legare l'adenilato ciclasi favorendo il rilascio del cAMP e l'attivazione della protein-chinasi A (PKA). La PKA fosforila la proteina legante l'elemento di risposta all'cAMP (CREB), determinando così la stimolazione di numerosi altri geni (Nguyen et al., 2008; Thomas et al., 2008). Nelle cellule enteroendocrine, l'attivazione di TGR5 stimola il rilascio a valle del peptide 1 glucagone simile (GLP-1), che influenza l'omeostasi del glucosio e del peptide YY (PYY) che regola l'assunzione di cibo (Bala et al., 2014). Nel muscolo e nel tessuto adiposo bruno, invece, l'attivazione di TGR5 regola il dispendio energetico attraverso l'induzione dell'enzima DIO2 (Eggink et al., 2014). Inoltre, nelle cellule di Kupffer TGR5 riduce la produzione di citochine in modo c-AMP dipendente, tramite l'inibizione del fattore nucleare kappa-potenziatore di catene leggere di cellule B attivate (NF- κ B), e influenza la differenziazione dei monociti (Eggink et al., 2014). TGR5 è anche espresso nelle cellule endoteliali dei sinusoidi epatici, dove si ipotizza rivesta un ruolo importante nella regolazione della produzione di ossido nitrico,

attraverso l'attivazione cAMP-dipendente dell'ossido nitrico sintasi endoteliale (eNOS) (Keitel et al., 2007). Questo meccanismo, indotto dagli acidi biliari può eliminare le specie reattive dell'ossigeno e proteggere il fegato dalla perossidazione lipidica. TGR5 svolge però un importante ruolo sul metabolismo cellulare, in particolare è stato osservato come gli acidi biliari tramite questo recettore siano in grado di aumentare la spesa energetica soprattutto nel tessuto adiposo bruno e nel muscolo (Watanabe et al., 2006). Questo effetto è stato osservato in topi alimentati con una dieta ricca di grassi, che sviluppavano obesità e insulino-resistenza (Watanabe et al., 2006). Gli acidi biliari aumentano la spesa energetica attivando l'enzima deiodinasi di tipo 2 (DIO2), che converte nei tessuti termogenicamente attivi l'ormone T4 in T3. Oltre a DIO2, altri geni coinvolti nella regolazione della spesa energetica aumentano nel tessuto adiposo bruno dopo il trattamento con acido biliare: Peroxisome proliferator-activated receptor gamma coactivator 1-alpha e 1 beta (PGC1A, PGC1B) e UCP1 (Watanabe et al., 2006). Il meccanismo proposto prevederebbe dunque una via di segnalazione TGR5-cAMP-DIO2 e la successiva stimolazione di UCP1 da parte di T3. Tuttavia, i modelli animali knockout per TGR5 supportano solo in parte queste ipotesi (Maruyama et al., 2002; Kawamata et al., 2003). Topi maschi e femmine omozigoti o eterozigoti per la delezione di TGR5 mostrano normali livelli di trigliceridi e glucosio, e non aumentano di peso rispetto ai topi alimentati con una dieta normale (Maruyama et al., 2002; Vassileva et al., 2006). Alcune differenze di genere sono state osservate in topi TGR5 -/- in termini di risposta ad una dieta con alto contenuto di grassi (Maruyama et al., 2002). Infatti, i livelli plasmatici di colesterolo totale erano più alti del 20% nel maschio, ma non nella femmina omozigote TGR5 -/-, che risultava anche aumentare di peso rispetto ai controlli (Maruyama et al., 2002). Questa differenza può essere spiegata dall'uso di diverse diete o da altre differenze nelle condizioni sperimentali applicate agli animali.

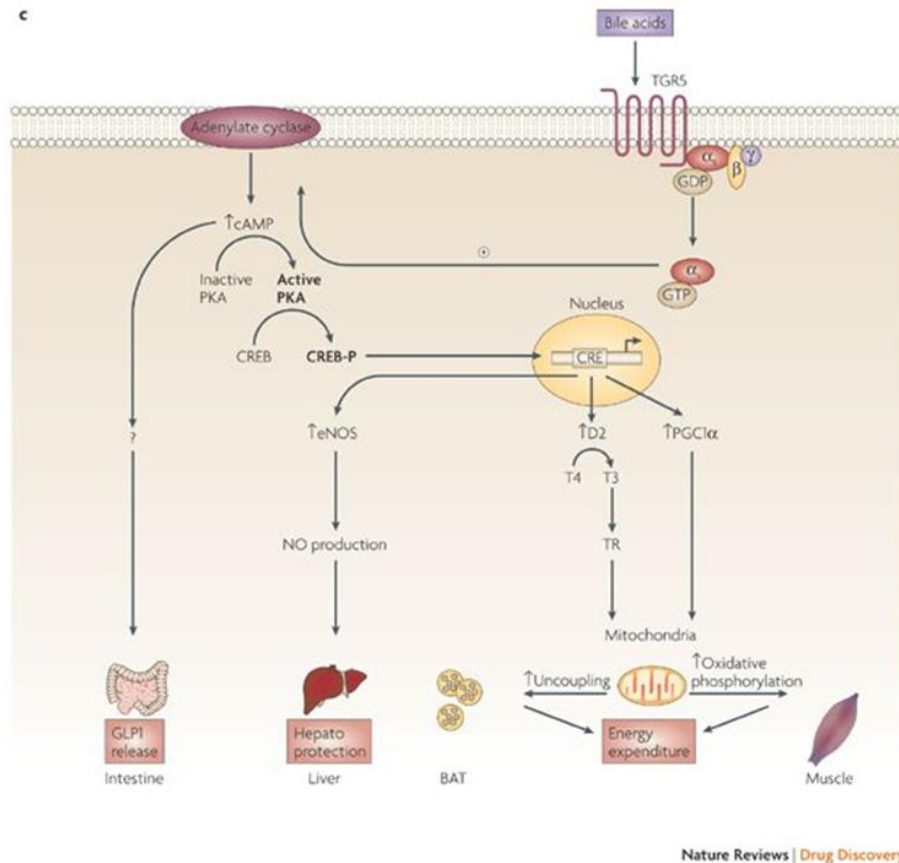


Fig. 4 Via di segnalazione di TGR5 (da “Thomas C, Pellicciari R, Pruzanski M, Auwerx J, Schoonjans K. Targeting bile-acid signalling for metabolic diseases. *Nat Rev Drug Discov.* 2008;7(8):678-93.”).

FXR è un recettore che appartiene alla famiglia dei recettori nucleari che, agendo come fattori di trascrizione, modulano l’espressione di numerosi geni coinvolti in numerosi processi biologici. Nell’uomo il gene FXR, definito FXRA, codifica quattro isoforme diverse (FXRa1-4), attraverso un meccanismo di splicing alternativo (Wang Y.D. et al., 2008, b). FXRB (Nr1h5), un secondo gene di FXR, agisce come lanosterolo nei topi ed è uno pseudogene nell’uomo (Otte et al., 2003). Altamente espresso nel fegato, nell’intestino e nei reni, FXR è caratterizzato da una serie di domini che conferiscono al recettore specifiche funzioni:

- un dominio regolatore N-terminale;
- un dominio di legame con il DNA;
- un dominio di legame con il ligando;
- un dominio centrale, con cui il recettore può cambiare conformazione;
- un dominio C-terminale.

Il ligando con cui FXR normalmente interagisce è l'acido chenodesossicolico (Lefebvre et al., 2009). Come tutti i recettori nucleari, FXR dopo aver legato il proprio ligando trasloca dal citosol al nucleo, formando un eterodimero con il recettore X dell'acido retinoico (RXR) (Forman et al., 1995). Grazie alla presenza di un dominio funzionale, FXR lega una sequenza specifica sul DNA inducendo regolazione genica. Uno dei geni target di FXR è il piccolo partner eterodimero (SHP) che lega il DNA (Goodwin et al., 2000; Brendel et al., 2002). SHP dimerizza e inattiva il recettore X del fegato (LXR), un regolatore positivo dell'espressione di CYP7A1, il primo e limitante enzima della biosintesi degli acidi biliari (Kerr et al., 2002; Stedman et al., 2004). L'inattivazione di LXR mediante FXR/SHP determina l'inibizione della sintesi degli acidi biliari attraverso la via canonica (Brendel et al., 2002; Kerr et al., 2002; Stedman et al., 2004). La principale funzione di FXR è dunque quella di regolare il metabolismo degli acidi biliari proteggendo gli epatociti dagli effetti tossici dovuti al loro accumulo. Oltre a regolare il metabolismo degli acidi grassi, FXR modula inoltre l'omeostasi glicemica (Cariu et al., 2005) e lipidica (Sinal et al., 2001) (Fig. 5). Studi effettuati su animali hanno evidenziato, infatti, che il recettore FXR modula geni coinvolti nella regolazione della gluconeogenesi epatica (Duran-Sandoval et al., 2004; Yamagata et al., 2004; Duran-Sandoval et al., 2005), migliorando anche l'assorbimento dell'insulina nel tessuto adiposo e nel tessuto muscolare (Cariou et al., 2006; Ma et al., 2006; Zhang et al., 2006; Wang Y.D. et al., 2008, a). Il signaling dell'insulina e i livelli di glucosio sono modulati regolando l'espressione di FXR nel fegato (Duran-Sandoval et al., 2004). Topi FXR $-/-$ mostrano, se sottoposti ad un carico orale di glucosio, ridotta tolleranza al glucosio, alterazioni dell'omeostasi del glucosio nel fegato e nel muscolo e insulino-resistenza (Ma et al., 2006; Zhang et al., 2006). Altri studi, invece, sempre condotti su topi FXR $-/-$ mostrano un normale signaling dell'insulina (Duran-Sandoval et al., 2004; Cariou et al., 2006). Nonostante questi dati siano contrastanti, si ipotizza che l'attivazione di FXR moduli positivamente il segnale dell'insulina, infatti, il trattamento con GW4064 (un agonista sintetico degli acidi biliari non steroideo) migliora la sensibilità all'insulina sia in topi db/db, KK-A(y) (Zhang et al., 2006) che in quelli ob/ob (Cariou et al., 2006). Inoltre, studi condotti in animali

knockout (KO) per FXR e SHP, suggeriscono che la via di segnalazione di FXR/SHP regoli alcuni geni della gluconeogenesi, proprio perché nei topi KO viene persa questa regolazione (Cariou et al., 2006; Ma et al., 2006; Zhang et al., 2006). In particolare, l'attivazione di FXR sembrerebbe modulare l'espressione dell'enzima fosfoenolpiruvato carbossichinasi (PEPCK) (Cariou et al., 2005), ma anche in questo caso, sono riportati in letteratura dati contrastanti, sia positivi (Stayrook et al., 2005) che negativi (Yamagata et al., 2004). Infine, viene ipotizzato che FXR riduca i livelli circolanti di trigliceridi e di acidi grassi, inibendo la loro sintesi a livello epatico e aumentandone l'ossidazione (Lefebvre et al., 2009). E' stato osservato in animali KO per il recettore FXR un aumento dei livelli in circolo di trigliceridi e colesterolo (Lambert et al., 2003) e un aumento del conseguente rischio di formazione di placche aterosclerotiche (Li et al., 2007). FXR è anche coinvolto nella regolazione della lipogenesi a livello epatico, fonte di acidi grassi liberi per la formazione delle lipoproteine a bassa densità (VLDL) (Hanniman et al., 2005). FXR, attivando il suo effettore a valle SHP, inibisce la sintesi dei trigliceridi a livello epatico, regolando l'espressione genica del fattore di trascrizione SREBP1c e dei geni lipogenici target su cui agisce, tra cui FAS (Watanabe et al., 2004). Altri meccanismi con cui FXR potrebbe inibire la sintesi dei trigliceridi coinvolgono PPAR α e PGC1A (Zhang et al., 2004).

1.11 Agonisti selettivi degli acidi biliari

L'analogo semisintetico dell'acido colico (CA), acido 6 α -etil-3 α , 7 α -diidrossi-5 β -colan-24-oico (acido obeticolico, OCA) è un potente agonista selettivo di FXR (Pellicciari et al., 2002, 2004, 2012; Gioiello et al., 2011). OCA, attraverso l'aggiunta di un singolo gruppo etilico in posizione 6 α nel CDCA, mostra una attività agonistica circa 100 volte maggiore per FXR (Pellicciari et al., 2002) rispetto a CDCA. Inoltre, l'attività di agonista di OCA è 200 volte più alta su FXR rispetto a TGR5 (Rizzo et al., 2010); OCA è quindi considerato un agonista FXR selettivo. Studi condotti da Rizzo e collaboratori nel 2006 hanno evidenziato un ruolo positivo di FXR nella regolazione dell'adipogenesi. In particolare, l'espressione di FXR aumenta quando i preadipociti vengono stimolati con un cocktail di differenziazione verso il tessuto adiposo bianco, composto da desametasone, insulina e IBMX (DIM); al

contrario l'espressione di FXR non è apprezzabile nei preadipociti indifferenziati. Il trattamento con OCA su cellule 3T3-L1 ha indotto in tali cellule la formazione di goccioline lipidiche nel citoplasma, non osservabili invece in cellule trattate con DIM ma non con OCA. Inoltre, l'attivazione di FXR da parte di OCA induce geni adipocita-specifici come C/EBP α , PPAR γ 2 e FABP4, mentre riduce l'espressione di TNF α , mediatore della lipolisi (Wang H. et al., 2009; Rizzo et al., 2010; Wang Y. et al., 2010). Questi dati, osservati su linee cellulari, sono stati poi anche confermati "in vivo", sia su topi wild-type sia su topi KO per FXR sottolineando come tale recettore sarebbe coinvolto nella adipogenesi inducendo C/EBP α e PPAR γ 2, e nell'accumulo dei lipidi, agendo su FABP4 e TNF α . Questo agonista semisintetico ha dimostrato avere, inoltre, un potente effetto antiolestatico e antifibrotico nel fegato proteggendolo da necrosi e cirrosi, come osservato in molti modelli murini (Pellicciari et al., 2005). Un effetto antifibrotico e antiinfiammatorio è stato anche osservato a livello dei reni e dell'intestino (Adorini et al., 2012).

Sono stati effettuati trial clinici per il trattamento di diverse condizioni epatiche e gastrointestinali come la colangite biliare primitiva, la steatoepatite non alcolica, l'ipertensione portale e la diarrea da acido biliare. Attualmente la Food and Drug Administration (FDA) ha concesso l'approvazione per Ocaliva (acido obeticholico) per il trattamento della colangite biliare primaria. In seguito a risultati positivi di un trial clinico di fase III (POISE), randomizzato, doppio cieco, controllato con placebo, a gruppi paralleli, Ocaliva è stato approvato come farmaco orfano. Infatti il trattamento con Ocaliva ha portato ad una riduzione dei livelli di fosfatasi alcalina, endpoint primario per la valutazione del beneficio clinico (Press Release - FDA Approves Ocaliva for Rare, Chronic Liver Disease; Nevens et al., 2016). Le indicazioni prevedono che Ocaliva venga utilizzato, in combinazione con l'acido ursodesossicolico (UDCA), in pazienti che non hanno risposto adeguatamente all'UDCA, o da solo negli adulti che non tollerano il trattamento con UDCA. Un altro studio di fase II, randomizzato, doppio cieco, a gruppi paralleli, controllato con placebo è stato condotto somministrando OCA in pazienti affetti da NASH. Il trial Farnesoid X Receptor Ligand Obeticholic Acid in Steatohepatitis Treatment (FLINT) è stato tuttavia sospeso, poiché pur avendo raggiunto l'endpoint primario, cioè una riduzione dello score relativo alla NAFLD di almeno due punti senza peggioramento della fibrosi, sono stati riscontrati problemi di sicurezza legati

all'aumento dei livelli di colesterolo totale ed LDL in circolo, con una modesta riduzione delle HDL, un aumento degli eventi cardiovascolari avversi e la presenza di prurito nel 23% dei pazienti (Neuschwander-Tetri et al., 2015).

Precedentemente, per valutare gli effetti dell'OCA, nel nostro laboratorio, sono stati condotti studi utilizzando un modello animale non genomico di sindrome metabolica, ottenuto alimentando conigli maschi con una dieta ad alto contenuto di grassi. Questi animali sviluppavano tutte le caratteristiche fenotipiche della Mets dell'uomo, compresa la steatoepatite non-alcolica (Maneschi et al., 2013). In questo modello animale OCA attivava in modo selettivo il recettore FXR dimostrando la capacità di revertire molti degli effetti causati dalla Mets. In particolare, OCA ha (Maneschi et al., 2013) contrastato l'espansione del tessuto adiposo, riducendo l'ipertrofia degli adipociti e ripristinando i livelli di ossigenazione del tessuto, migliorato la differenziazione degli adipociti verso un fenotipo metabolicamente sano, sottolineato dalla riacquisizione della capacità di formare goccioline lipidiche più piccole e numerose, in associazione all'inibizione di proteine del complesso SNARE (SYNT5 e SNAP23), migliorato l'assorbimento del glucosio a livello periferico, ripristinando il normale funzionamento del signaling dell'insulina con up-regolazione dell'espressione di GLUT4, RhoA, ROCK1 e ROCK2, ridotto la steatosi e l'infiammazione a livello epatico.

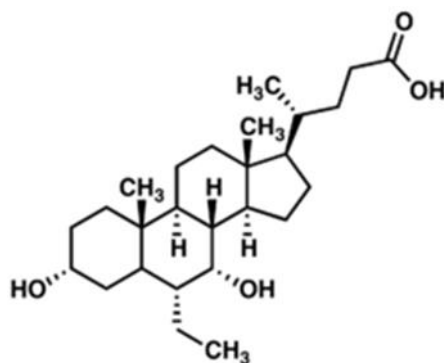


Fig. 6 OCA o acido obeticolico

Un agonista selettivo di TGR5 è l'acido 6a-etil-23(S)-metil-3a, 7a, 12a-triidrossi-5b-colan-24-oico (INT-777), (Pellicciari et al., 2009, 2012; Gioiello et al., 2012). La sua potenza agonistica (EC_{50}) è 50 volte superiore quella dell'acido colico (Pellicciari et al., 2009), e la sua efficacia nel trattamento di diabete (Thomas et al., 2009) e aterosclerosi è stata dimostrata in diversi modelli animali (Pols et al., 2011). L'indicazione principale per lo sviluppo di agonisti selettivi di TGR5 è stato il trattamento dell'obesità, per sfruttare l'effetto del recettore nella regolazione della spesa dell'energia. In particolare, l'INT-777 agendo sul proprio recettore:

- stimola la secrezione di GLP-1 nei topi quando somministrato per via orale (30 mg / kg) dopo una prova di glucosio (Thomas et al., 2009);
- aumenta il dispendio energetico e riduce steatosi epatica e adiposità nei topi con obesità indotta da dieta (Thomas et al., 2009);
- stimola la secrezione di insulina nelle cellule β pancreatiche (Kumar et al. 2012);
- riduce l'infiammazione, inibendo il fattore trascrizionale pro-infiammatorio Nf-kB e riducendo di conseguenza il processo di aterosclerosi nei topi (Pols et al., 2011).

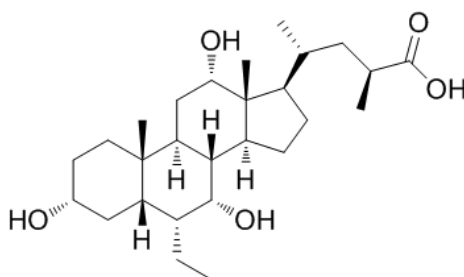


Fig. 7 Acido 6a-etil-23(S)-metil-3a, 7a, 12a-triidrossi-5b-colan-24-oico o INT-777

Recentemente è stato sintetizzato un doppio agonista FXR/TGR5, l'acido 6a-etil-3a, 7a-diidrossi-24-nor-5b-cholan-23-solfato (INT-767) (Rizzo et al., 2010). Tale molecola farmacologica è 3 volte più potente dell'agonista selettivo per FXR (OCA) (Rizzo et al., 2010). Gli adipociti rappresentano un buon modello di studio

dell'integrazione tra la segnalazione endocrina e il metabolismo energetico (Halberg et al., 2008). In uno studio preliminare, Rizzo e collaboratori hanno osservato che l'INT-767 migliora la differenziazione di preadipociti della linea 3T3-L1, in modo FXR dipendente (Rizzo et al., 2010). In linea con la sua duplice attività, l'INT-767 induce l'assorbimento dei lipidi attraverso un meccanismo FXR-dipendente e promuove la secrezione di GLP1 tramite un meccanismo dipendente da TGR5 (Rizzo et al., 2010). Sempre questo studio ha dimostrato che INT-767 è in grado di ridurre significativamente i livelli sierici di colesterolo e trigliceridi sia in un modello genomico di diabete di tipo 2 (topi db/db), sia in un modello di diabete di tipo 1 indotto da streptozotocina (DBA/2J) (Rizzo et al., 2010).

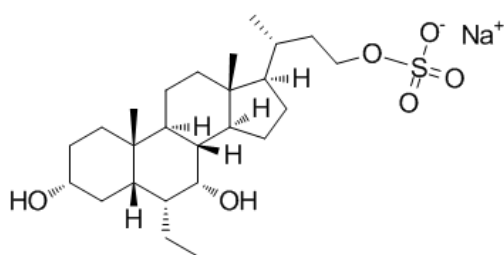


Fig. 8 Acido 6a-etil-3a, 7a-diidrossi-24-nor-5b-cholan23-solfato o INT-767

2. Scopo della tesi

Come abbiamo già detto, la sindrome metabolica (Mets) è l'insieme di alterazioni multipli fattori di rischio che inducono un aumento del rischio di incidenza di malattie cardio vascolari, metaboliche e steatosi epatica. La disfunzione del tessuto adiposo rappresenta la principale anomalia patogenetica che si sviluppa in un soggetto obeso, e sembra essere il principale meccanismo alla base dello sviluppo di comorbidità metaboliche e cardiovascolari. Obesità viscerale e insulino-resistenza svolgono un ruolo centrale nella Mets. Infatti, gli adipociti gravemente disfunzionanti, perdendo la capacità di rispondere all'insulina, diventano incapaci di sostenere l'aumento dell'apporto energetico. Ciò causa ipertrofia e iperplasia del tessuto adiposo che inizia a rilasciare in circolo citochine infiammatorie che vanno ad alterare la funzionalità degli organi periferici come il fegato promuovendo NAFLD/NASH. Considerando il ruolo chiave che gli acidi biliari hanno nel controllo del metabolismo glicidico e lipidico, interagendo con i loro recettori, FXR e TGR5, lo scopo del presente studio è stato quello di indagare l'effetto di un doppio agonista FXR/TGR5, INT-767, sulle alterazioni a livello epatico, sui parametri metabolici e sulle disfunzioni di adipociti isolati da tessuto adiposo viscerale. Il presente lavoro è stato intrapreso utilizzando un modello animale di Mets precedentemente sviluppato nel nostro laboratorio. Questo modello prevede un trattamento per 12 settimane di conigli maschi alimentati con una dieta ricca di grassi (HFD) (Filippi et al., 2009; Comeglio et al., 2014; Morelli et al., 2013). Nel presente studio, un primo gruppo di conigli HFD è stato trattato con OCA, agonista selettivo FXR, un secondo gruppo di conigli HFD è stato trattato con INT-777, agonista selettivo TGR5, e un terzo gruppo di conigli HFD è stato trattato con INT-767. Effetti benefici dell'INT-777 (agonista TGR5) e dell'OCA (agonista FXR) sono stati già dimostrati in modelli sperimentali di Mets (Thomaset al. 2009, Maneschi et al. 2013, Vignozzi et al. 2014). Pertanto, in questo studio abbiamo deciso di utilizzare entrambi i trattamenti così da poter discriminare se eventuali effetti indotti da INT-767 fossero mediati prevalentemente da FXR e TGR5.

3. MATERIALI E METODI

3.1 Modello animale

Conigli maschi di razza albina ceppo New Zaland (Charles River, Calco, Lecco, Italia), aventi un'età di 16 settimane al momento dell'inizio del trattamento e peso paragonabile, sono stati stabulati in gabbie all'interno di stanze le cui condizioni di temperatura e umidità erano controllate, con un ciclo giorno/notte di 12h. Dopo una settimana di alimentazione con una dieta standard, i conigli sono stati divisi in modo casuale in due gruppi: non trattati e alimentati con una dieta regolare (RD, n=20) o trattati e alimentati con una dieta ad alto contenuto di grassi (HFD, n=21), costituita da 0,5 % di colesterolo e 4 % di olio d'arachidi (Azadoi et al., 1991; Najibi et al., 1994). La dieta ad alto contenuto di grassi per conigli è stata acquistata dalla ditta Mucedola (Settimo Milanese; Milano; Italia). Sottogruppi di conigli HFD sono stati trattati per 12 settimane (5 giorni/settimana) tramite gavaggio orale con: 1) OCA, l'agonista selettivo di FXR (10 mg/kg al giorno, n=9); 2) INT-777, agonista selettivo di TGR5 (30 mg/kg al giorno, n=6), o 3) INT-767 agonista duale di FXR/TGR5 (3 mg/kg al giorno, n=8). La dose di OCA utilizzata è stata selezionata sulla base di analisi di efficienza e farmacocinetica nei roditori (Rizzo et al. 2010) ed è stata già utilizzata in uno studio precedente (Maneschi et al. 2013). Allo stesso modo, la dose di INT-777 è documentata in molti studi sperimentali (Pellicciari et al. 2009, Thomas et al. 2009, Maneschi et al. 2013). Sebbene alcuni lavori su modello murino riportano una dose di INT-767 di 30 mg/Kg/die (Pathak et al. 2017, Wang X.X. et al. 2017) la dose utilizzata è stata tre volte più bassa di quella usata per l'OCA, considerando la sua potenza circa tre volte più alta nell'attivazione di FXR (Rizzo et al. 2010). Tutti i composti sono stati forniti da Intercept Pharmaceuticals Inc. (New York, NY, USA). Prima del sacrificio è stata misurata la pressione arteriosa media (MAP) inserendo un catetere di polietilene nella vena femorale, dopo sedazione con pentobarbitale sodico (45mg/kg). Inoltre, prima del sacrificio, è stato effettuato un test di tolleranza al glucosio (OGTT). La notte prima del sacrificio i conigli vengono mantenuti a digiuno e il giorno successivo, poco prima del test, viene

somministrato loro una soluzione al 50% di glucosio in dose 1,5 g/kg. Attraverso la vena marginale dell'orecchio vengono fatti dei prelievi, prima e dopo 15, 30 e 120 minuti della somministrazione della soluzione. Il plasma è stato ottenuto da questi campioni dopo averli centrifugati a 3000 rpm per 20 minuti a 4°C e i valori di glicemia sono stati rilevati mediante sistema automatizzato ADVIA 2004 (Siemens Chemistry System; Siemens Science Medical Solution Diagnostic, Tarrytown, NY). Questo studio è stato effettuato in accordo al D.L. 116/92, che regola queste procedure e dopo approvazione da parte del Comitato di Studi dell'Università di Firenze e dell'Istituto di Cura degli Animali. Dopo il sacrificio, fegato, intestino tenue e grasso viscerale sono stati prelevati dai diversi gruppi sperimentali per eseguire i successivi saggi sperimentali. Campioni di sangue sono stati prelevati dalla vena marginale dell'orecchio alla dodicesima settimana. Il sangue è stato immediatamente centrifugato a 3000 rpm per 20 min, e il plasma raccolto è stato riposto a -20° C fino al momento dell'analisi. I livelli di colesterolo totale, trigliceridi e transaminasi (AST e ALT), sono stati analizzati in ogni gruppo sperimentale, utilizzando il sistema automatizzato menzionato prima.

3.2 Analisi istomorfometrica e determinazione dell'ipossia nel VAT

La localizzazione immunoistochimica di FXR e TGR5 è stata analizzata su sezioni reidratate e deparaffinate, come precedentemente descritto in Vignozzi et al. 2017. Per determinare il diametro degli adipociti, aree di VAT colorate con ematossilina-eosina sono state analizzate come precedentemente descritto (Maneschi et al. 2012). Il grado di ossigenazione del tessuto adiposo è stato analizzato utilizzando uno specifico kit (Hypoxiprobe-1 Chemicon International, CA, USA) che utilizza un farmaco bio-reattivo, il pimonidazolo idroclorito (60 mg/kg), riconosciuto come marcatore standard della presenza di ipossia in un tessuto. Il pimonidazolo è stato iniettato per via intraperitoneale un'ora prima del sacrificio. Esso, grazie alla sua natura solubile in acqua, può rapidamente distribuirsi in tutti i tessuti del corpo, formando però addotti proteici esclusivamente nelle zone ipossiche che hanno una pressione di ossigeno uguale o inferiore 10 mmHg. Brevemente, i campioni di VAT, una volta isolati ed

immediatamente fissati in formalina al 4%, vengono deidratati ed inclusi in paraffina. Le cellule ipossiche sono state successivamente rilevate con l'utilizzo di un anticorpo monoclonale (Hypoxyprobe-Mab1), seguendo il protocollo della casa produttrice.

3.3 Analisi istomorfometrica del fegato

Campioni di fegato sono stati analizzati utilizzando sempre il pimonidazolo idroclorito (60 mg/Kg), per misurare il grado di ipossia. Per valutare l'accumulo di lipidi, sezioni di fegato congelato sono state tagliate con un criostato e colorate con la colorazione Oil-Red-O per 20 min, come precedentemente descritto (Maneschi et al. 2013). Il contenuto di collagene è stato valutato utilizzando la colorazione Picrosirius Red Assay (Bio-Optica, Milano, Italia). Brevemente, sezioni sono state fissate in un buffer con formalina al 10%, imbibite in paraffina, e poi sono state tagliate sezioni ad uno spessore 5 μm e colorate seguendo il protocollo della casa produttrice (Comeglio et al. 2017). Alcune sezioni di tessuto sono state colorate anche con ematossilina eosina come precedentemente descritto (Maneschi et al. 2012). Analisi immunoistochimiche per la localizzazione del fattore 5 di regolazione dell'interferone (IRF5) sono state condotte su sezione reidratate e deparaffinate. Brevemente, sezione deparaffinate e reidratate sono state incubate overnight a 4°C con un Ab primario monoclonale di topo per IRF5 (1:50 vol/vol; Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA); le sezioni sono state poi lavate in PBS e incubate con un anticorpo secondario biotinilato di capra anti-topo (Millipore Corporation, Birrerica, MA) e poi con il complesso perossidasi-streptavidina (Lab-Vision, Fremont, CA, USA). La reazione prodotta è stata sviluppata con 3,3'-diaminobenzidina come cromogeno (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO). Le immagini sono state ottenute utilizzando un microscopio Nikon Microphot-FXA (Nikon, Tokyo, Japan).

3.4 Preparazione di frazioni totali e citosol/membrana per analisi western blot

Campioni di VAT e di fegato dopo essere stati isolati al momento del sacrificio sono stati immediatamente congelati in azoto liquido. Le frazioni di membrana citosolica sono state preparate utilizzando un kit di estrazione per proteine subcellulari ProteoExtract (Calbiochem, EDM Biosciences, La Jolla, CA), in accordo con le istruzioni della casa produttrice. Le proteine sono state quantificate con il reagente BCA (Pierce, Rockford, IL). Successivamente, è stata effettuata l'analisi di western blot utilizzando un anticorpo anti-trasportatore del glucosio di tipo 4 (GLUT4, 1:500 vol/vol; Upstate Biotechnology, Lake Placid, NY, USA), un anticorpo anti-membro omologo di ras A (RhoA, 1:500 vol/vol; Santa Cruz Biotechnology) e un anticorpo anti-termogenina (UCP1, 1:200 vol/vol; Santa Cruz Biotechnology) come da protocollo già descritto (Maneschi et al. 2016). L'analisi densitometrica dell'intensità delle bande è stata effettuata utilizzando il programma Adobe Photoshop 6.0[®] software (Adobe System Inc, Agrate Brianza, Italia).

3.5 Isolamento, caratterizzazione e differenziazione dei preadipociti di grasso viscerale di coniglio

I preadipociti di coniglio (rPAD) sono stati isolati da campioni di tessuto adiposo viscerale e caratterizzati come precedentemente descritto (Maneschi et al. 2016). La capacità adipogenica differenziativa è stata analizzata in colture di rPAD lasciate differenziare per 10 gg in terreno DMEM addizionato con siero bovino fetale (FBS) al 5%. La differenziazione degli adipociti rPAD, due giorni dopo la confluenza (tempo 0), è stata indotta esponendo le cellule ad un cocktail differenziativo (DIM) contenente 5 mg/mL di insulina, 1 mM di desametasone (Sigma-Aldrich) e 0.5 mM 3-isobutilmetilxantina (IBMX; Sigma-Aldrich) in terreno DMEM strippato con siero al 5% per 8 gg (Student et al. 1980, Maneschi et al. 2016). L'up-take di glucosio nelle cellule DIM-rPAD, stimulate o no per 10 gg con INT-767 1 μ M, è stato effettuato come precedentemente descritto (Maneschi et al. 2012).

3.6 Microscopia elettronica e a fluorescenza

Preadipociti trattati e non, isolati dai vari gruppi sperimentali, sono stati piastrati in piastre di 35 mm di diametro (Ibidi, Munich, Germania) per 10⁶ gg e poi colorate con una sonda, MitoTracker Green (200 nM, Invitrogen, Carlsband,CA), da solo o in combinazione con diidroetidio 10 μM (DHE; Life Technologies, Carlsbad, California, USA) o AdipoRed Assay (Cambrex BioScience, Walkersville, MD, USA), come precedentemente descritto (Maneschi et al. 2016). Per l'analisi morfometrica dei mitocondri, sono state considerate le regioni di interesse nella periferia delle cellule, dove i mitocondri erano più isolati, e la lunghezza degli stessi facilmente misurabile. Sono stati registrati time lapses di 3 min con 10 sec di intervallo. La fluorescenza del DHE è stata utilizzata per misurare la produzione di radicale superossido in rPAD non trattati. La produzione dei radicali del superossido è stata quantificata usando Fiji ImageJ software (Schindelin et al. 2012) misurando il cambio dell'intensità di fluorescenza nei nuclei di cellule rPAD durante l'acquisizione delle immagini, come precedentemente descritto (Maneschi et al. 2016). Per analizzare l'accumulo dei lipidi intracellulari qualitativamente, le cellule sono state lavate in PBS, fissate in un buffer di formalina al 10% per 30 min a temperatura ambiente, e successivamente colorate con AdipoRed (Cambrex BioScience) (seguendo il protocollo della casa produttrice) e DAPI (1μg/mL; Roche) a temperatura ambiente per 10 min aggiungendo poi un reagente anti-dissolvenza Prolong Gold (Life Technologies). Le immagini sono state acquisite con un microscopio Leica DM6000 fornito di camera DFC350FX, usando un obiettivo 10x/0.3na HC PL Fluator e filtri per AdipoRed e DAPI, rispettivamente, L5/A4 Leica. Le cellule positive all'AdipoRed, identificate come quelle con goccioline lipidiche chiaramente visibili, e il numero delle cellule totali (numero di nuclei) sono state contate. I risultati sono stati mostrati come percentuale di cellule positive all'AdipoRed. Per l'analisi delle goccioline lipidiche, immagini sono state campionate catturando con Z-stack in accordo con il criterio. Le immagini sono state prima convertite utilizzando Huygens Professional Software (Scientific Volume Imaging, Hilversum, Olanda),

l'algoritmo Classic Maximun Likelihood Estimation e una teorica Point Spread Function. Le immagini convertite sono state poi quantitativamente analizzate usando il Software Volocity 5 (Perkin-Elmer, Foster City, CA) per misurare il volume e il numero delle gocce lipidiche.

Il microscopio elettronico è stato usato per analizzare le cellule rPAD non trattate per 10 gg con terreno DMEM con 5% FBS. Al termine dei 10 gg le cellule sono state centrifugate a 1100 rpm per 5 minuti e il pellet ottenuto è stato fissato con il buffer di Karnowsky e 1% di tetrossido di osmio e imbibite in Epon 812 (EMS, Hatfield, PA). La superficie dei mitocondri e delle creste mitocondriali interne è stata misurata, dopo aver ottenuto sezioni ultrasottili, con ITEM image analysis software (EMSYS, Muenster, Germania), come precedentemente descritto (Maneschi et al. 2016). La localizzazione immunocitochimica di UCP1 è stata studiata su colture di preadipociti rPAD isolati da conigli HFD, trattati o no con INT-767 1 μ M (o con una dose equimolare dell'agonista selettivo di TGR5 o FXR, rispettivamente INT-777 o OCA) per 10 gg. Le cellule sono state poi fissate con paraformaldeide al 2% in PBS per 10 min a temperatura ambiente, e in seguito sono state permeabilizzate con 0.1% Triton X-100 in PBS per 10 min e bloccate con 1% BSA in PBS. Per l'immunolocalizzazione è stato utilizzato un anticorpo policlonale di capra anti-UCP1 (1:50 vol/vol, Santa Cruz Biotechnology), seguito da anticorpo secondario IgG di asino anti-capra, coniugato con Alexa Flour 488 (H+L) (1:200 vol/vol, Molecular Probe, Eugene, Oregon). La specificità dell'anticorpo è stata verificata omettendo lo stesso anticorpo primario su alcuni vetrini. La percentuale di cellule UCP1-positive è stata calcolata selezionando le cellule colorate in 10 campi per vetrino in tre differenti esperimenti e normalizzando sul totale delle cellule (utilizzando la colorazione con DAPI).

3.7 Consumo di ossigeno e analisi dell'ATP intracellulare

La quantificazione del consumo di ossigeno nei preadipociti rPAD isolati da ogni gruppo sperimentale è stata effettuata tramite il sistema Oxygraph (Hansatech Instruments, Pentney, Regno Unito), come precedentemente detto (Rapizzi et al. 2015). Brevemente, le cellule (alla densità di 7.5×10^4) sono state caricate in una camerina, al cui interno vi erano 300 μL di DMEM con glutammina 2 mM e sodio succinato 20 mM. Il consumo di ossigeno è stato monitorato per 5 min a 37°C . I livelli di ATP sono stati misurati usando il saggio di vitalità cellulare luminescente CellTiter-Glo (Promega Corporation, Medison, WI). Questo saggio è stato eseguito in accordo alle procedure della casa produttrice. Brevemente, le cellule rPAD isolate da ogni gruppo sperimentale sono state piastrate in piastre da 96-pozzetti (2×10^4 cell/pozzetto) e coltivate in terreno di crescita completo. Per valutare l'effetto della differenziazione spontanea, le cellule sono state stimulate per 10 gg con terreno DMEM addizionato con FBS al 5% in presenza o meno di INT-767 1 μM , e poi incubate con 125 μL di reagente CellTiter-Glo. Le colture erano agitate a 300 rpm per 5 min e poi incubate a temperatura ambiente per 25 min per stabilizzare il segnale di luminescenza. La luminescenza è stata poi misurata usando il VICTOR³ 1420 multilabel Counter (Packard Instruments, Perkin-Elmer, Foster City, CA) e normalizzando sul numero di cellule.

3.8 Esperimenti con rPAD in vitro

Le cellule rPAD sono state piastrate (8×10^4 cellule/pozzetto) e fatte crescere in terreno di crescita completo fino ad arrivare a confluenza, poi sono state stimulate per 10 gg in terreno DMEM addizionato con FBS al 5%, a cui è stato aggiunto l'INT-767 1 μM o una dose equimolare di uno dei due agonisti selettivi per TGR5 o FXR (INT-777 o OCA). Successivamente, per meglio indagare il ruolo dell'attivazione di TGR5, le rPAD sono state stimulate per 18h con INT-767 (1 μM), da solo o con inibitore della proteina chinasi A, permeabile alle cellule (PKI, 10 μM ; Merck, New York) o forskolina (10 μM ; Sigma-Aldrich), un attivatore diretto dell'adenilato ciclasi (Insel & Ostrom 2003).

3.9 Misurazione della quantità di cAMP intracellulare

I livelli di cAMP intracellulare sono stati misurati con un kit ELISA competitivo seguendo le istruzioni della casa produttrice (Invitrogen). Brevemente, le rPAD sono state isolate da tutti i gruppi sperimentali, piastrate ad una concentrazione di 5×10^4 cellule/pozzetto e fatte crescere in terreno DMEM con FBS al 10% fino a raggiungere la confluenza ottimale. Successivamente le cellule sono state lavate e il terreno di coltura è stato sostituito con un medium privo di siero per 24h. Le cellule sono state poi trattate con dosi crescenti (0.3-30 μ M) di INT-767 per 1 min, poi il terreno di coltura è stato rimosso e le cellule sono state lisate con 0.1 M di HCL, per bloccare l'attività della fosfodiesterasi endogena, e dopo centrifugazione, il sopranatante è stato direttamente analizzato con il saggio.

3.10 Isolamento, caratterizzazione e analisi siRNA di preadipociti di grasso viscerale umano

Campioni di tessuto adiposo sono stati ottenuti, in seguito al consenso informato dei pazienti, da 8 soggetti (maschi obesi, età compresa tra 25 e 65 anni; $BM \geq 40$ kg/m^2) sottoposti a chirurgia bariatrica per perdita di peso. Tutti i soggetti affetti da neoplasie maligne, infezione, infiammazione cronica o acuta e malattie autoimmuni sono stati esclusi. Il protocollo usato nel presente studio è stato revisionato e approvato dal Comitato Istituzionale di Revisione dell'ospedale dell'Università di Firenze. I preadipociti di grasso viscerale umano (rPAD) sono stati isolati e caratterizzati da campioni bioptici di grasso viscerale ottenuti dalla chirurgia bariatrica come precedentemente descritto (Zuk et al. 2001, Baglioni et al. 2009). Una popolazione di cellule confluenti e omogenee, simili a fibroblasti, sono state ottenute dopo 2-3 settimane. Solo le cellule dei primi passaggi cellulari sono state utilizzate per gli esperimenti, e ogni esperimento è stato ripetuto almeno tre volte. L'analisi immunofenotipica delle colture cellulari rPAD è stata eseguita usando anticorpi monoclonali FITC-, PE-, APC-coniugati (mAbs) per CD14, CD31, CD34, CD44, CD45, CD73, CD90, CD105, CD166 e il complesso di immunoistocompatibilità di classe I e classe II (HLA-I e HLA-DR), e il loro rispettivo isotipo di controllo mAbs (BD Biosciences, Mountain View, CA, USA),

come precedentemente descritto (Krampera et al. 2003). L'analisi in citofluorimetria dei markers di superficie sulle cellule hPADs isolate dai diversi pazienti mostra un profilo immunofenotipico simile (Zannettino et al. 2008), caratterizzato dalla positività per markers di cellula staminale mesenchimale (CD44, CD73, CD90, CD105, CD166). Tuttavia, sono risultate negative per i markers endoteliale (CD31), ematopoietico (CD34 e CD45) e monocitario (CD14).

3.11 Estrazione dell'mRNA, quantificazione tramite real-time PCR e analisi siRNA

L'RNA è stato isolato dal tessuto e dalle cellule, la sintesi del cDNA e l'analisi quantitativa real-time PCR è stata eseguita come precedentemente descritto (Comeglio et al. 2017). I primer specifici per i geni target nel coniglio sono stati disegnati su sequenze disponibili su NCBI GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) o Ensemble Genome (<http://www.ensembl.org>) e sono stati prodotti da Life Technologies. In particolare, la sequenza di FGF19 nel coniglio (ENSOCUT00000003867.3) è stata usata come template. FGF15 e FGF19 sono proteine ortologhe con funzione simile, il primo descritto nel topo e il secondo nel coniglio (Shang et al. 2014). La subunità ribosomiale del 18S è stata usata come gene di riferimento per la relativa quantizzazione dei geni target sulla base del metodo comparativo del ciclo soglia (Ct) $2^{-\Delta\Delta Ct}$ (Livak & Schmittgen 2001). Le sequenze per il siRNA di TGR5 (GPBAR1 ON-TARGETplus SMARTpool) ed FXR (NR1H4 ON-TARGETplus SMARTpool), per il controllo positivo (ON-TARGETplus GAPD Control SMARTpool) e negativo (ON-TARGETplus NON-Targeting Pool) sono state acquistate presso Dharmacon (Lafayette, CO, USA). Le cellule sono state trattate con OCA, INT-767 e INT-777 (1 μ M) per 72h. la trasfezione è stata eseguita su cellule hPAD non confluenti per 72h con 25 nM di siRNA con DharmaFECT come reagente trasfettante (Dharmacon) in terreno DMEM-F12, secondo il protocollo. L'efficienza di knockdown è stata misurata con qRT-PCR (GAPH, FXR e TGR5). L'espressione dell'mRNA messaggero di geni target è stata eseguita come già citato.

3.12 Analisi Statistica

I risultati sono espressi come $\text{media} \pm \text{S.E.M.}$. Per la lunghezza dei mitocondri è riportato il valore della mediana con il minimo e il massimo valore. L'analisi statistica è stata eseguita con il test one-way ANOVA seguito dall'analisi post hoc Mann-Whitney per valutare le differenze tra i gruppi, con un $P < 0.05$ come significativo. L'analisi statistica è stata eseguita con il software SPSS 25.0 (SPSS Inc., Chicago, IL). Il valore della concentrazione (EC_{50}) per ottenere la metà della risposta massimale e il valore dell'effetto massimo (E_{max}) sono stati calcolati usando il programma ALLFIT (DeLean et al., 1978).

4. RISULTATI

4.1 Espressione di FXR e TGR5 nei tessuti di coniglio

L'espressione dell'mRNA di FXR e TGR5 è stata analizzata in un ampio pannello di tessuti di coniglio (Fig. 9). I dati sono espressi come aumento relativo (fold-change) rispetto all'espressione dell'mRNA nella prostata, arbitrariamente scelto come tessuto di riferimento poiché l'espressione di entrambi i recettori risulta molto bassa. Sono stati rilevati alti livelli di espressione di FXR nell'intestino, seguito dal fegato. Paragonato all'intestino, l'espressione di FXR mostra nel VAT un livello due unità logaritmiche più basse (Fig. 9A). L'espressione di TGR5 mostra livelli relativamente più omogenei nei vari tessuti (Fig. 9B), con l'intestino che mostra altissimi livelli di espressione, mentre prostata e muscolo scheletrico mostrano i livelli più bassi.

La dieta HFD per 12 settimane ha mostrato di aumentare significativamente l'espressione dell'mRNA sia di FXR che di TGR5 nel fegato, confrontato con gli animali alimentati con una dieta standard (RD) ($p < 0,001$; Fig. 9C e D, rispettivamente). Non è stata osservata nessuna differenza nell'espressione dei recettori in altri tessuti analizzati (Fig. 9C e D).

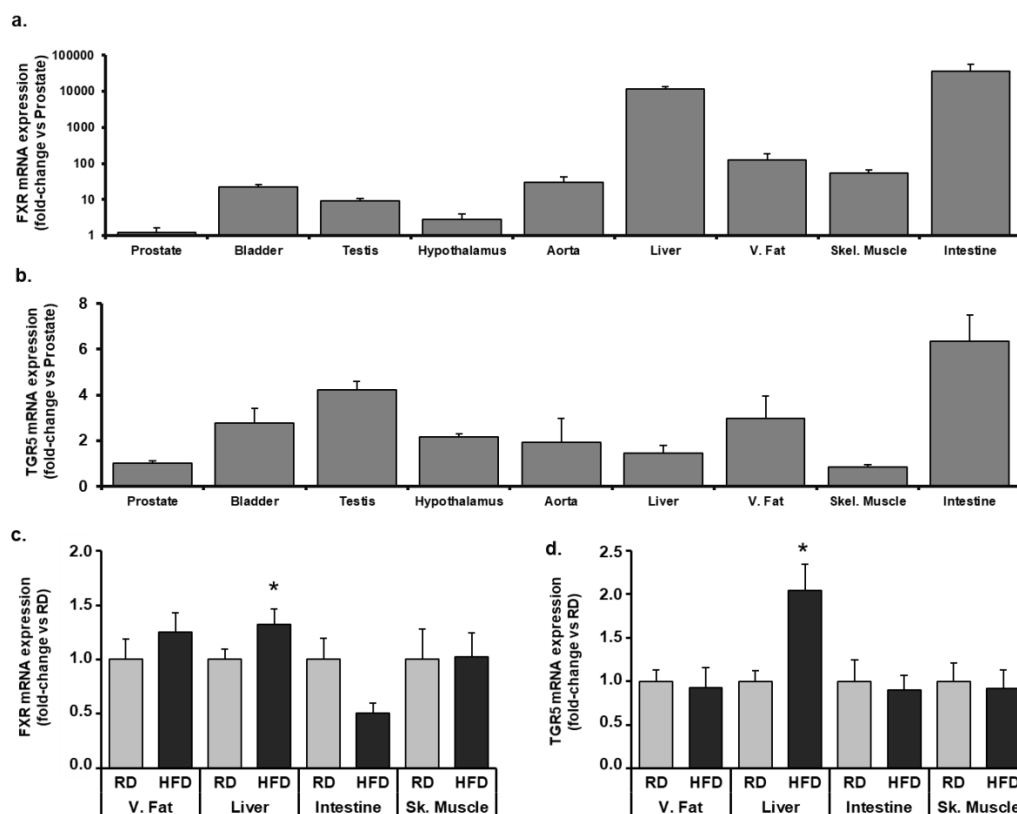


Fig.9 Espressione di FXR e TGR5 nei tessuti di coniglio. L'espressione dell'mRNA di FXR (A) e TGR5 (B) è stata analizzata mediante RT-PCR in un pannello di tessuti di coniglio isolati dal gruppo RD. Il confronto dell'espressione dell'mRNA di FXR e TGR5 nei tessuti target di conigli RD e HFD è riportato rispettivamente nei pannelli C e D. I dati sono calcolati con il metodo comparativo $2^{-\Delta\Delta Ct}$, utilizzando l'espressione della subunità del 18S ribosomiale come gene di riferimento per la normalizzazione. I risultati sono espressi come fold-change dell'espressione dell'mRNA e riportati come media \pm s.e.m. L'analisi statistica è stata eseguita utilizzando i test di Mann-Whitney (* P < 0.05 vs RD).

4.2 Effetti metabolici benefici del trattamento con INT-767 nel modello di Mets indotto da HFD

Per testare *"in vivo"* gli effetti dell'INT-767 sul metabolismo del glucosio e dei lipidi, conigli HFD sono stati trattati con INT-767. I risultati ottenuti sono stati confrontati con quelli ottenuti da un gruppo di animali RD aventi età e peso paragonabile, e due altri gruppi di animali HFD trattati con OCA e INT-777. Il peso totale degli animali non ha mostrato nessuna differenza significativa tra i vari gruppi (Tabella 1).

La tendenza alla riduzione del peso corporeo osservata negli animali HFD, confrontati con gli animali RD, riflette la ridotta resistenza fisica, misurata come

la distanza percorsa sul treadmill (RD: 241,11 ± 107,29 m/sessione di corsa; HFD: 116,36 ± 64,27 m/sessione di corsa; p<0,01, n=9 per ogni gruppo). Al contrario, tutti gli agonisti mostrano una riduzione significativa della massa del VAT rispetto agli animali HFD, anche quando i valori vengono espressi come percentuale rispetto al peso corporeo (Fig. 10A e Tabella 1). La dieta HFD induce un aumento significativo delle transaminasi rispetto agli animali di controllo RD (Tabella 1). Entrambe le transaminasi, invece, mostrano una tendenza alla riduzione in tutti i gruppi di trattamento rispetto al gruppo HFD, sebbene non si raggiunga la significatività statistica (Tabella 1). Tuttavia, tutti i trattamenti hanno mostrato ridurre la ALT, riportandole ad un livello non significativamente differente rispetto ai controlli RD (Tabella 1). Inoltre, INT-767 e OCA, ma non INT-777, migliorano significativamente altri parametri della Mets, come iperglicemia (Fig. 10B), intolleranza al glucosio (Fig. 10C) e ipercolesterolemia (Fig. 10D). Al contrario, l'aumento della MAP e dei livelli di trigliceridi indotti dalla dieta HFD, non subiscono variazioni significative con nessuno dei trattamenti (Fig. 10E e F).

	RD	HFD	HFD + OCA	HFD + INT-767	HFD + INT-777
Body weight (g) Week 12	3700.58±48.23	3683.63±54.30	3570.42±98.91	3389.50±145.07	3443.60±166.86
VAT (g) Week 12	29.44±1.67	43.00±1.70 °°°	17.00±2.53 °°° *	23.71±3.97 *	17.88±4.07 ° *
AST (U/l) Week 12	30.56±1.27	91.33±15.08 °°°	67.21±8.98 °°°	61.83±5.83 °°°	62.40±6.24 °°
ALT (U/l) Week 12	32.50±1.54	55.09±3.25 °°°	41.79±5.53	46.75±6.50	38.80±7.96

Tabella 1. Parametri metabolici e biochimici nei diversi gruppi sperimentali di coniglio. I dati sono espressi come media ±s.e.m. I dati riportati in grassetto sono quelli che risultano significativamente differenti tra i gruppi all'analisi ANOVA (p <0,001). Per questi parametri è stata quindi eseguita l'analisi di Mann-Whitney (° p <0,05, °° p <0,01, °°° p <0,001 vs RD; * p <0,001 vs HFD).

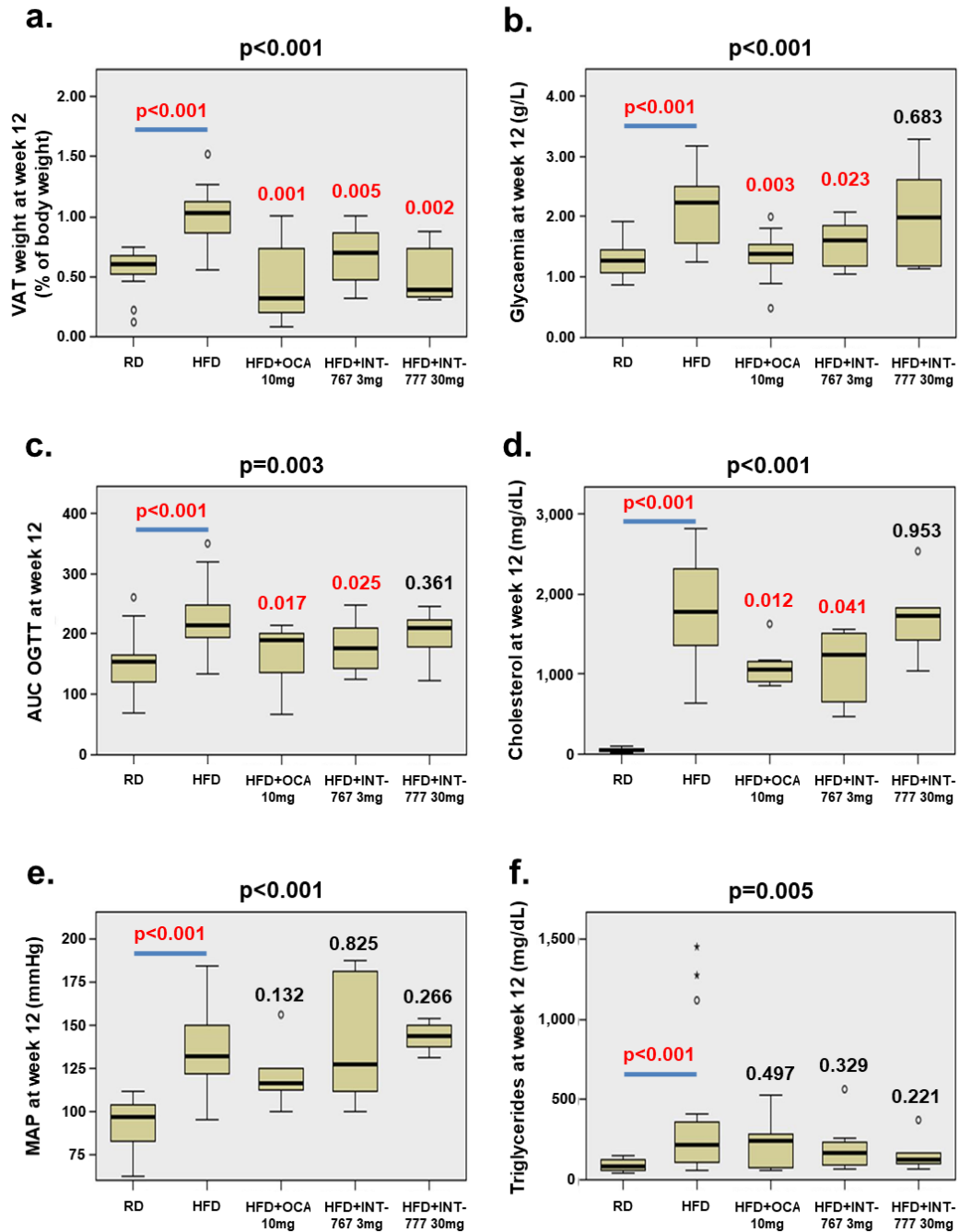


Fig. 10 Effetti metabolici dei trattamenti con OCA, INT-767 e INT-777 in un modello di Mets indotto da HFD. I parametri metabolici analizzati alla fine del trattamento (12 settimane) sono riportati come media \pm s.e.m. per il VAT (A), la glicemia (B), l'OGTT (C), il colesterolo (D), la MAP (E) e i trigliceridi (F). Sono riportati anche i valori Kruskal-Wallis (P segnalati all'esterno dei pannelli) o Mann-Whitney (P di HFD vs RD e HFD vs trattamenti all'interno dei pannelli). AUC, area incrementale sotto la curva del livello di glucosio nel sangue durante il test orale di tolleranza al glucosio (OGTT); MAP, pressione arteriosa media; VAT, tessuto adiposo viscerale.

4.3 INT-767 agisce come agonista duale FXR/TGR5 nel fegato, nel VAT e nell'intestino

Inizialmente è stato valutato il potenziale dell'agonista INT-767 su TGR5 ed FXR sui tessuti che esprimono alti livelli dei recettori degli acidi biliari (BAR), confrontati al rispettivo agonista selettivo. Nel fegato, i geni dipendenti da FXR, incluso SHP, la pompa di esportazione dei sali biliari (BSEP) e i due recettori epatici di FGF19 (recettore del fattore di crescita dei fibroblasti 4, FGFR4; Klotho β , KLB) – erano tutti up-regolati da INT-767, che ha mostrato anche ridurre l'espressione dell'mRNA di CYP7A1 (Fig. 11A). Questo effetto è stato anche osservato in conigli trattati con OCA (Fig. 11A). Al contrario, INT-777 non ha modulato significativamente alcuno dei geni dipendente da FXR testati (Fig. 11A). INT-767 ha mostrato anche stimolare l'espressione epatica di geni a valle di TGR5, come il fattore di scambio attivato direttamente dal cAMP 1 (EPAC1) e PKA (Fig. 11A). Un effetto simile è stato osservato anche in conigli trattati con INT-777 (Fig. 11A).

Nel VAT, l'INT-767 induce l'espressione di geni relativi al signaling di FXR (SHP) e al pathway TGR5 (la proteina 1 di legame reattivo agli elementi cAMP, CREB1; ciclina D1, CCND1). Questi effetti sono anche mimati dai trattamenti con OCA e INT-777 (Fig. 11B). Infine, nell'intestino tenue, INT-767 induce significativamente l'espressione dell'mRNA di SHP, così come FGF19 (Fig. 11C). Questo effetto è stato mimato dall'agonista FXR, OCA, ma non da INT-777. INT-767 e INT-777 inducono un aumento dell'espressione dell'mRNA della proteina convertasi 1 (PCSK1) dipendente da TGR5. Un aumento di PCSK1 è stato osservato in animali trattati con OCA.

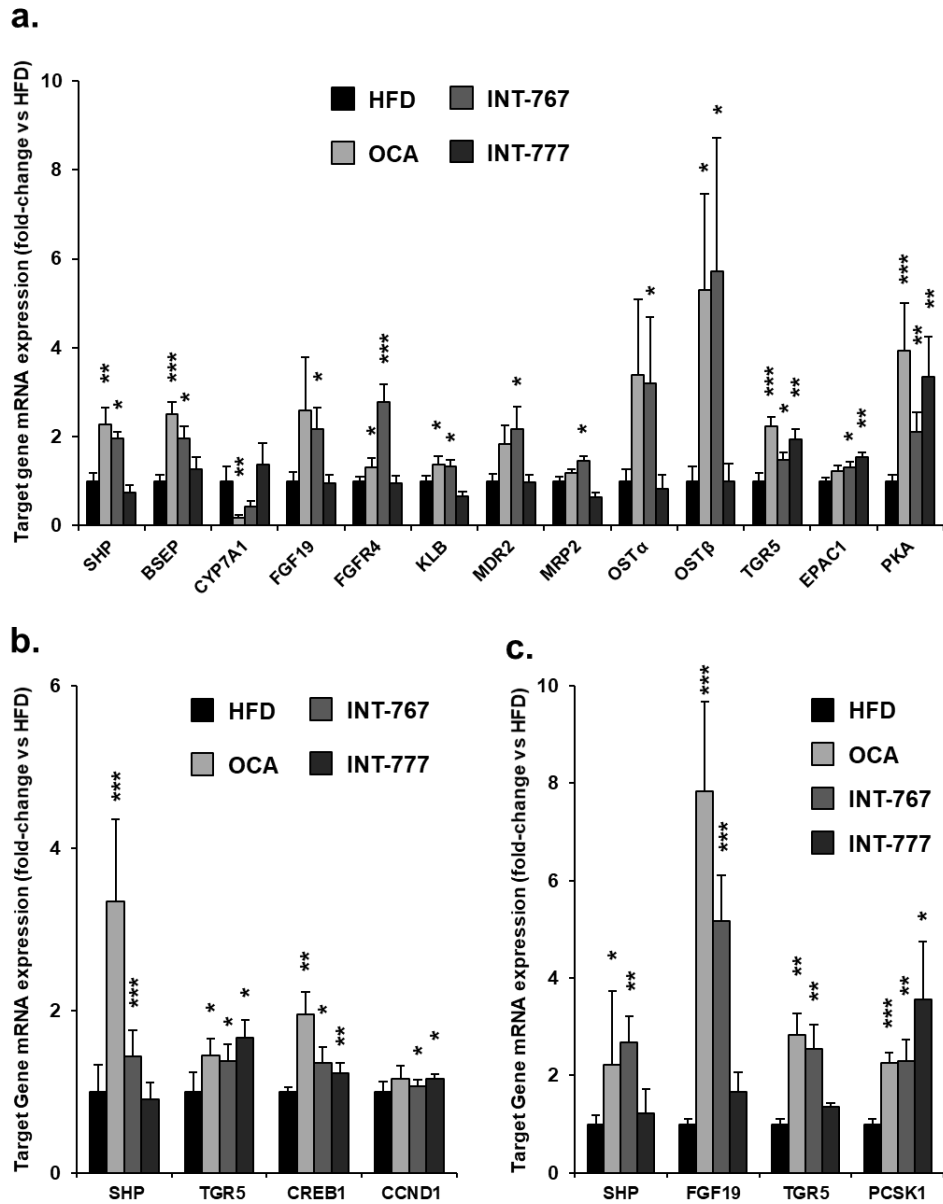


Fig. 11 Effetti dei trattamenti con OCA, INT-767 e INT-777 sull'espressione dell'mRNA dei geni correlati a FXR e TGR5 nel fegato (A), grasso viscerale (B) e intestino tenue (C) di coniglio. I dati sono calcolati con il metodo del confronto $2^{-\Delta\Delta C_t}$, utilizzando la subunità dell'RNA ribosomiale 18S come gene di riferimento per normalizzare e sono riportati come fold-change dell'espressione dell'mRNA rispetto a quella nei conigli HFD. L'analisi statistica è stata eseguita utilizzando il test di Mann-Whitney (* P <0,05, ** P <0,01, *** P <0,001 vs HFD).

4.4 Il trattamento *in vivo* con INT-767 contrasta il rimodellamento del VAT indotto dalla dieta HFD

L'analisi immunohistochimica ha mostrato una positività nucleare per FXR sia negli adipociti che nelle cellule endoteliali che rivestono i vasi sanguigni (Fig. 12, pannello a e b). Allo stesso modo, la positività per TGR5 è stata osservata nelle membrane degli adipociti e delle cellule stromali (Fig 12, pannello c e d).

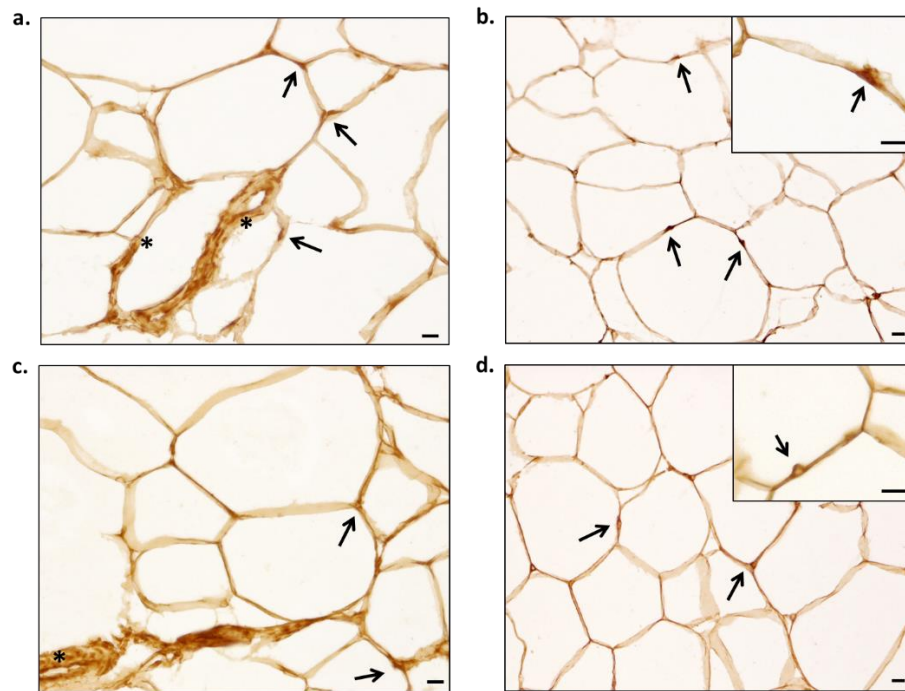


Fig. 12 Valutazione immunohistochimica delle proteine FXR e TGR5 in campioni di VAT derivate da conigli di controllo RD. I pannelli A e B mostrano la localizzazione di FXR nel nucleo degli adipociti (freccie) e delle cellule endoteliali dei vasi sanguigni (asterischi). I pannelli C e D mostrano la localizzazione di TGR5 nelle membrane degli adipociti (freccie) e delle cellule stromali (asterischi) (scala=100μm).

Considerando l'alto livello di espressione dell'mRNA di entrambi i recettori TGR5 e FXR nel VAT (Fig. 9A e B), e la capacità dell'INT-767 di ridurre la massa del VAT (Fig. 10A), è stato prima indagato l'effetto dell'INT-767 nel contrastare le alterazioni del VAT indotte dalla dieta HFD. Negli animali HFD, l'analisi istomorfometrica dei campioni di VAT ha mostrato un aumento della misura degli adipociti (Fig. 13A) e una riduzione dell'ossigenazione tissutale (Fig. 13B; entrambe $p < 0,0001$ vs. RD). La localizzazione intracellulare del trasportatore del glucosio GLUT4 e della piccola proteina legante GTP, RhoA, coinvolti entrambi

nel segnale dell'insulina, è stata valutata tramite analisi di western blot (Fig. 13C e D, rispettivamente). Campioni di VAT prelevati da animali HFD hanno mostrato una riduzione della traslocazione di GLUT4 a membrana (Fig. 13C; $P < 0,05$) e un aumento della traslocazione di RhoA a membrana (Fig. 5D; $p < 0,0001$). Entrambe le alterazioni sono normalizzate dal trattamento con INT-767 (Fig. 13C e D). Interessante è che il trattamento con INT-767 induce anche un aumento significativo dell'espressione di UCP1, se comparato con HFD (Fig. 13E).

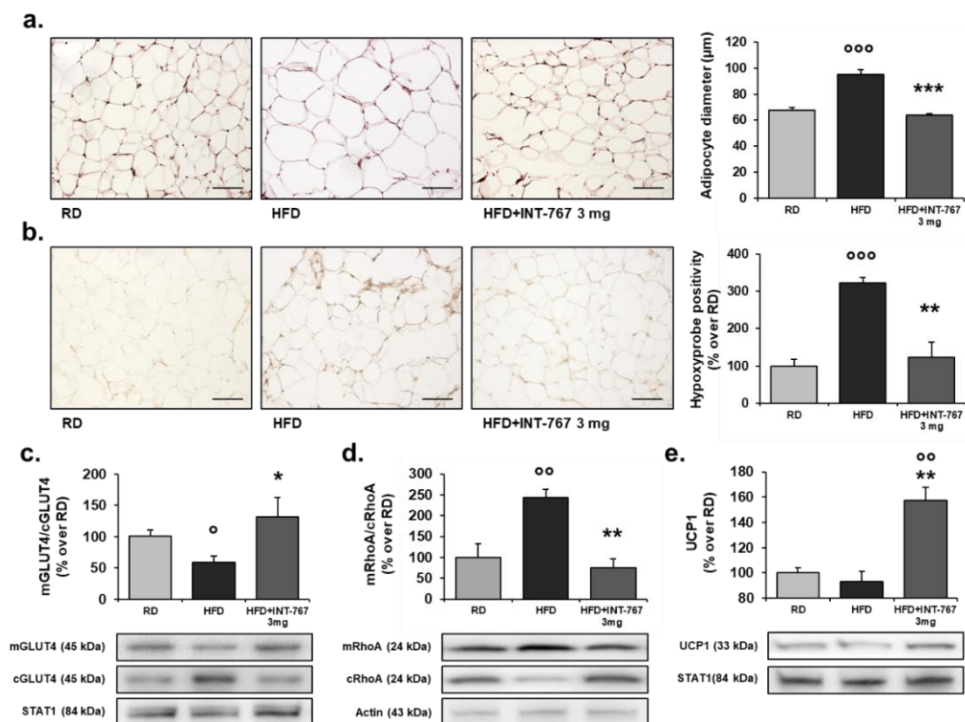


Fig. 13 Effetti del trattamento con INT-767 sulla dimensione degli adipociti, sull'ipossia, sulla traslocazione a membrana di GLUT4, RhoA e UCP1 in sezioni di VAT isolate da conigli RD, HFD e HFD+INT-767. Il pannello A mostra l'analisi istomorfometrica del diametro degli adipociti (μm) nei diversi gruppi sperimentali ($n=3/\text{gruppo}$) con colorazione ematosilina-eosina (scala= $100\mu\text{m}$). Il pannello B mostra la colorazione immunistoichimica degli addotti di Hypoxyprobe in sezioni di VAT rivelati nelle cellule ipossiche ($\text{PO}_2 < 10 \text{ mmHg}$) utilizzando l'anticorpo monoclonale hypoxyprobe-1-MAB (barra della scala= $100\mu\text{m}$). La densità ottica dei conigli RD è stata presa come 100% nell'analisi quantitativa dell'immagine assistita da computer eseguita in tre esperimenti indipendenti per ciascun gruppo. Pannello C mostra gli immunoblots rappresentativi degli anticorpi primari anti-GLUT4 e anti-STAT1 su estratti proteici di membrana (m) e citosol (c) di VAT. I grafici a barre mostrano l'analisi della densità ottica del rapporto membrana/citosol di GLUT4 ($n=3/\text{gruppo}$). I dati sono espresso come percentuale dei valori rispetto ai conigli RD. Il pannello D mostra gli immunoblots rappresentativi degli anticorpi primari anti-RhoA e anti-actina su estratti proteici di membrana (m) e citosol (c) di VAT. I grafici a barre mostrano l'analisi della densità ottica del rapporto membrana/citosol di RhoA ($n=3/\text{gruppo}$). I dati sono espressi come percentuale dei valori rispetto ai conigli RD. Il pannello E mostra gli immunoblots rappresentativi degli anticorpi primari anti-UCP1 e anti-STAT1 su estratti proteici di VAT. I grafici a barre mostrano le analisi della densità ottica di UCP1 ($n=3/\text{gruppo}$). I dati sono espressi come percentuale dei valori rispetto ai conigli RD ($^{\circ} P < 0,05$, $^{\circ\circ} P < 0,001$, $^{\circ\circ\circ} P < 0,0001$ vs RD; $^* P < 0,01$, $^{**} P < 0,001$, $^{***} P < 0,0001$ vs HFD).

Le analisi Kruskal-Wallis e Mann-Whitney dimostrano come INT-767 aumenti significativamente l'espressione dell'mRNA di geni relativi alla sopravvivenza cellulare nel VAT [B-cell lymphoma 2, (BCL2)], al pathway del cGMP [protein chinasi G, (PKG)], all'adipogenesi bruna (attivatore della morte cellulare CIDE-A, CIDEA; LIM homeobox 8, LHX8), alla mitocondriogenesi (fattore nucleare respiratorio 1, NRF1; PGC1A; fattore trascrizionale mitocondriale A, TFAM), al signaling dell'insulina (proteina a 6 domini transmembrana della prostata 2, STAMP2), al metabolismo lipidico (recettore alpha attivato dai perossisomi proliferatori, PPARA) e al complesso coinvolto nella formazione delle goccioline lipidiche (perilipina 1, PLIN1; sintassina-5, STX5; proteina di membrana associata alle vescicole 4, VAMP4) (Fig. 14A). Inoltre, il trattamento con INT-767 riduce nel fegato l'espressione di geni pro-infiammatori (interleuchina 6, IL6; fattore di necrosi tumorale alpha, TNFA) e induce fortemente la regolazione di geni antiinfiammatori (forkhead box P3, FOXP3; interleuchina 10 IL10) (Fig. 14B).

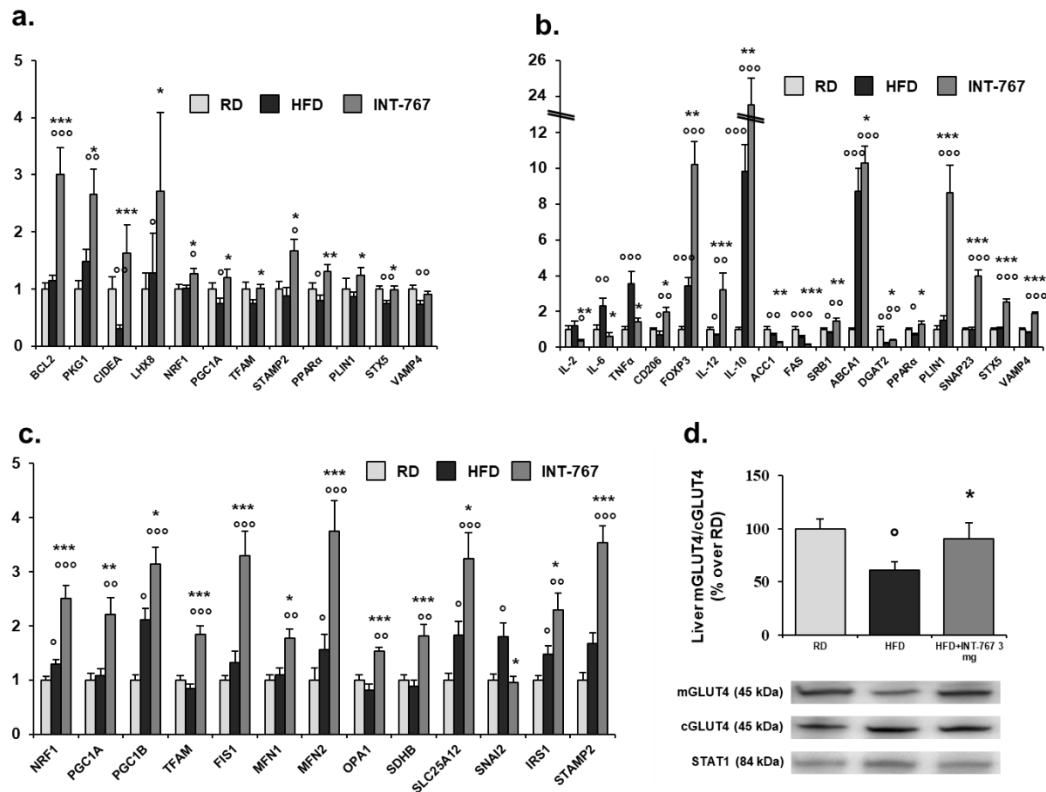


Fig. 14 Il trattamento con INT-767 modula l'espressione dell'mRNA dei geni bersaglio nel grasso viscerale (A) e nel fegato (B e C) di coniglio. I dati sono calcolati con il metodo comparativo $2^{-\Delta\Delta Ct}$, utilizzando la subunità 18S dell'RNA ribosomiale come gene di riferimento per la normalizzazione e sono riportati come fold-change d'espressione dell'mRNA rispetto ai conigli RD. L'analisi statistica è stata eseguita utilizzando il Test di Kruskal-Wallis e Mann-Whitney ($^{\circ}$ $P < 0,05$, $^{\circ\circ}$ $P < 0,01$, $^{\circ\circ\circ}$ $P < 0,001$ vs RD; * $P < 0,05$, ** $P < 0,01$, *** $P < 0,001$ vs HFD). Panel D mostra gli immunoblots rappresentativi degli anticorpi primari anti-GLUT4 e anti-STAT1 su estratti proteici di membrana (m) e citosolici (c) di fegato. I grafici a barre mostrano le analisi della densità ottica del rapporto membrana/citosol di GLUT4 ($n = 3$ / gruppo). I dati sono espressi come percentuale dei valori rispetto ai conigli RD ($^{\circ}$ $P < 0,01$ vs RD; * $P < 0,05$ vs HFD).

4.5 Il trattamento *in vivo* con INT-767 induce l'espressione di geni coinvolti nell'adipogenesi bruna e nella biogenesi mitocondriale nei preadipociti

Considerando l'effetto dell'INT-767 sui geni relativi all'adipogenesi bruna, alla mitocondriogenesi e al signaling dell'insulina, è stata esaminata la differenziazione spontanea degli rPAD isolati dai differenti gruppi sperimentali dopo 10 giorni di coltura (Fig.15). Paragonati ai preadipociti ottenuti da conigli RD, la dieta HFD riduce significativamente l'espressione dell'mRNA dei markers dell'adipogenesi bruna (proteina morfogenetica dell'osso 4, BMP4; proteina

homeobox Hox-9, HOXC9; LHX8; proteina transmembrana 26, TMEM26), delle proteine di pro-fissione dei mitocondri (proteina di fissione mitocondriale 1, FIS1) e del segnale della guanosina monofosfato ciclica (cGMP) (guanilil ciclastasi solubile beta-1, GCSB1) (Fig. 15A e B). Al contrario, la proteina 4 di legame gli acidi grassi (FABP4), marker di adipogenesi bianca, è significativamente aumentata ($p < 0,05$; Fig. 15A). Il trattamento dei conigli HFD con INT-767 induce l'espressione dell'mRNA di molti geni coinvolti nell'adipogenesi bruna (BMP4, CIDEA, HOXC9, LHX8, TMEM26), nella biogenesi mitocondriale (NRF1, TFAM), della catena respiratoria mitocondriale (NADH deidrogenasi beta subcomplesso 3, NDUFB3; NADH deidrogenasi beta subcomplesso 5, NDUFB5; subunità ferro-zolfo succinato deidrogenasi, SDHB; proteina 12 carrier mitocondriale legante il calcio della famiglia 25, SLC25A12), delle proteine di pro-fissione dei mitocondri (FIS1) e del segnale del cGMP (guanilil ciclastasi solubile alpha-1, GCSA1; GCSB1; PKG1) (Fig. 15A e B). Viceversa, se confrontati con HFD, i marker di adipogenesi bianca (FABP4; recettore gamma attivato dai proliferatori dei perossisomi, PPARG) sono significativamente ridotti con il trattamento "in vivo" con INT-767 (Fig. 15A). I geni relativi al segnale di TGR5 (PKA; EPAC1; CCND1; elemento modulatore responsivo al cAMP, CREM; CREB1; DIO2) sono significativamente aumentati dal trattamento con INT-767, mentre l'espressione di SHP dipendente da FXR non è influenzata (Fig. 15C).

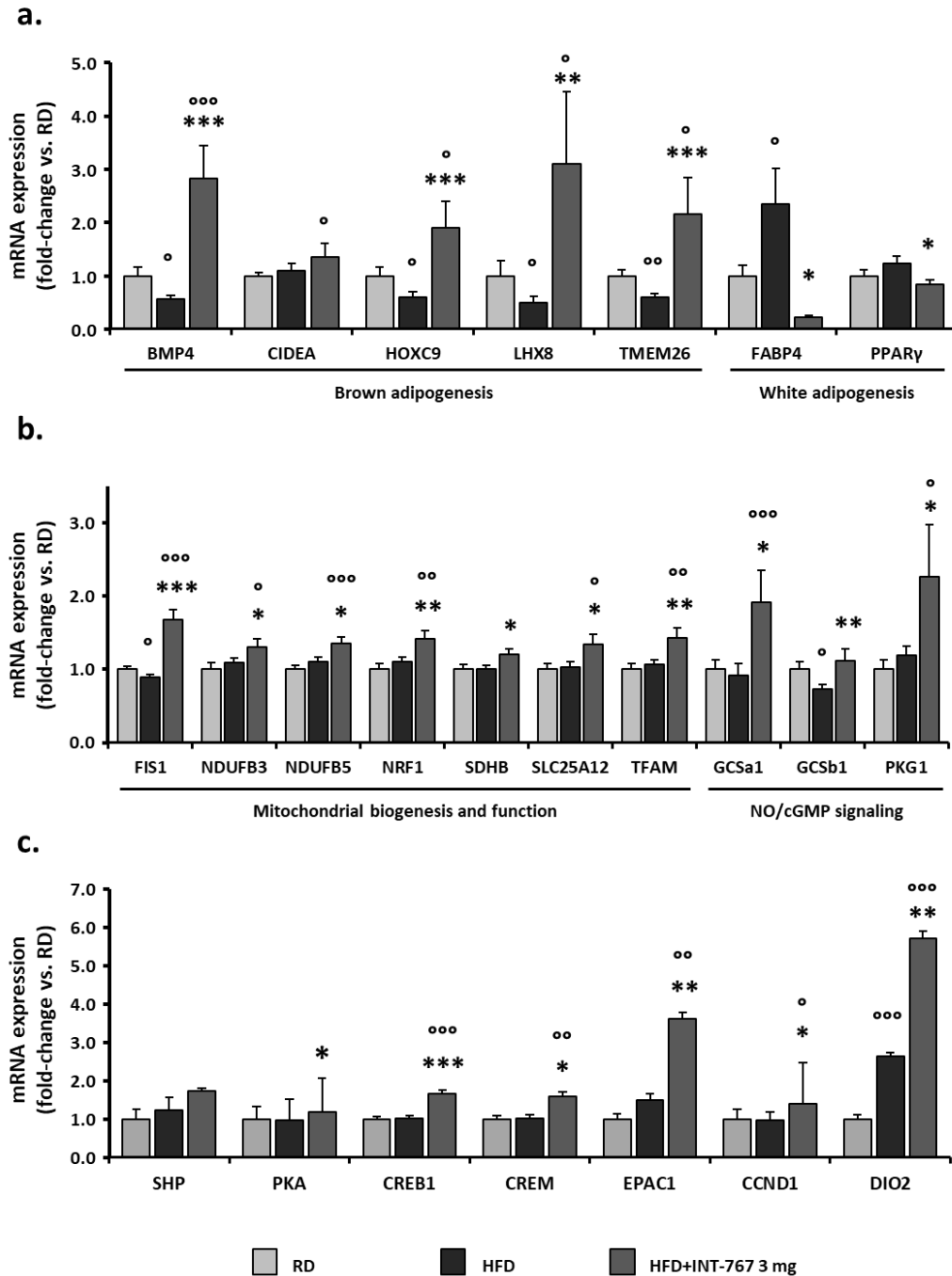


Fig. 15 Il trattamento “*in vivo*” con INT-767 migliora l'espressione dei geni coinvolti nell'adipogenesi bruna e nella biogenesi mitocondriale nei preadipociti. rPAD sono stati analizzati dopo 10 giorni di differenziazione spontanea. Il pannello A riporta l'espressione dell'mRNA di geni coinvolti nel browning e nell'adipogenesi bianca. Il pannello B mostra l'espressione dell'mRNA dei geni coinvolti nella biogenesi mitocondriale e nella via di segnalazione NO/cGMP. Il pannello C mostra l'espressione dell'mRNA dei geni dipendenti da FXR e TGR5. I dati sono calcolati con il metodo comparativo $2^{-\Delta\Delta C_t}$, utilizzando la subunità dell'RNA ribosomiale 18S come gene di riferimento per la normalizzazione e sono espressi come fold-change rispetto alle cellule isolate da conigli RD (media \pm s.e.m.), i dati sono ottenuti da almeno tre esperimenti indipendenti. L'analisi statistica è stata eseguita utilizzando il test statistico Mann-Whitney ($^{\circ}$ $P < 0,05$, $^{\circ\circ}$ $P < 0,01$, $^{\circ\circ\circ}$ $P < 0,001$ vs RD; * $P < 0,05$, ** $P < 0,01$, *** $P < 0,001$ vs HFD).

4.6 Il trattamento “*in vivo*” con INT-767 migliora la funzione mitocondriale e preserva la loro ultrastruttura nei preadipociti

Per indagare i meccanismi alla base del rimodellamento del VAT indotto dall' INT-767, sono stati studiati i suoi effetti sulla funzionalità mitocondriale nei preadipociti rPAD usando il MitoTracker, una sonda fluorescente che entra nei mitocondri, accumulandosi all'interno dei mitocondri attivi (Fig. 16). Le cellule con forma simile sono state scelte e grazie all'utilizzo di un microscopio in time-lapse è stato possibile analizzare il dinamismo mitocondriale (eventi di fissione-fusione) (Fig. 16A e B). La misura computerizzata della lunghezza dei mitocondri nelle cellule rPAD è riportata in Fig. 16C. Nei preadipociti RD i mitocondri mostrano forme e lunghezze eterogenee, risultando in una larga distribuzione di lunghezze e una lunghezza media di 4,2 μm (1,08 - 10,6 μm) (Fig. 16C). Questi mitocondri sono particolarmente dinamici, in continuo movimento e cambiano continuamente forma (Fig. 16A, immagini sequenziali di RD in Fig. 16B). Al contrario, nelle cellule isolate da animali HFD, i mitocondri sembrano dispersi a caso, aggregati, frammentati e quasi immobili (Fig. 16A), con una rete mitocondriale meno estesa e una media della lunghezza pari a 2,6 μm (0,9 - 7,8 μm ; $p < 0,0001$ vs RD) (Fig. 16C, immagini sequenziali di HFD in Fig. 16B). E' da notare che la rete mitocondriale nelle cellule rPAD isolate da animali HFD trattati con INT-767 è altamente dinamica (Fig. 16A), in un continuo processo di fusione e fissione, con rapidi cambi di forma e lunghezza, con una lunghezza media di 3.6 μm (0.9-11.2 μm ; $P < 0.0001$ vs HFD) (Fig. 8C, immagini INT-767 in Fig. 16B).

E' stata poi studiata l'ultrastruttura mitocondriale con un microscopio elettronico a trasmissione. L'analisi ha ulteriormente evidenziato la disfunzione mitocondriale in rPAD ottenuti da animali HFD, con una riduzione significativa delle creste, fino alla perdita completa, e l'aumento della densità elettronica della matrice ($p < 0,0001$ vs RD; Fig. 16D, E, F e G). Il trattamento con INT-767 normalizza la riduzione delle creste mitocondriali indotta dalla HFD ($P < 0.0001$ vs HFD; Fig. 16G), che risulta ad un livello persino più alto rispetto ai conigli RD ($P < 0.0001$; Fig. 16G).

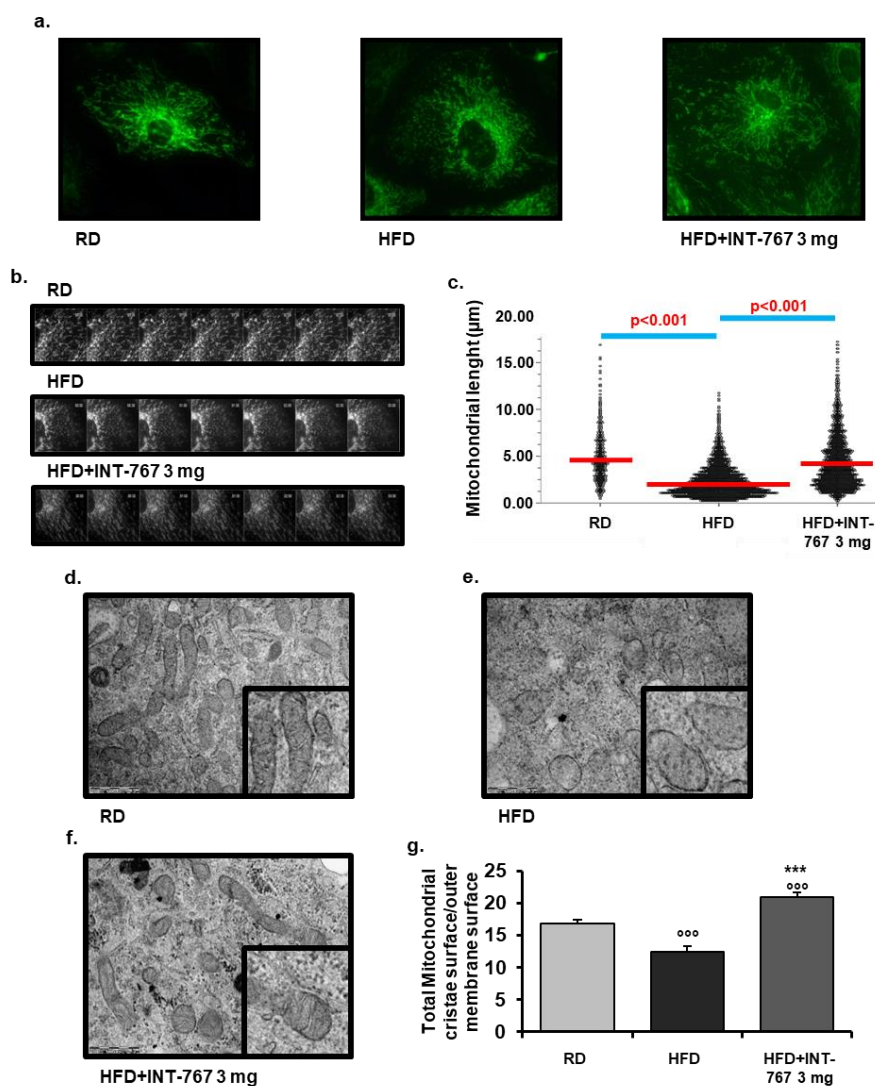


Fig. 16 Il trattamento con INT-767 migliora la funzione mitocondriale. Il pannello A mostra la funzione mitocondriale, visualizzata mediante incubazione della sonda fluorescente per i mitocondri (MitoTracker) in rPAD isolati da conigli RD, HFD e trattati con INT-767. Il panel B mostra immagini rappresentative di time-lapse, di 3 min, di rPAD marcati con MitoTracker. La misurazione computerizzata della lunghezza dei mitocondri è riportata nel pannello C. Per l'analisi morfometrica della lunghezza mitocondriale, sono stati analizzati i mitocondri nella periferia cellulare utilizzando il software ImageJ. Almeno 50 misurazioni dei mitocondri in almeno dieci cellule/gruppo sono state effettuate per determinare la distribuzione della lunghezza mitocondriale (μm). I dati sono stati ottenuti da tre esperimenti indipendenti. Le linee all'interno della distribuzione rappresentano i valori della media. Sono riportati i valori corrispondenti di P all'interno del pannello. Il trattamento con INT-767 normalizza l'ultrastruttura mitocondriale negli rPAD. rPAD sono stati isolati da conigli RD (pannello D), HFD (pannello E) e HFD+INT-767 (pannello F) e analizzati mediante microscopia elettronica a trasmissione (TEM). I grafici a barre nel pannello G mostrano il rapporto tra la superficie delle creste mitocondriali e la superficie della membrana esterna, le immagini sono state analizzate con iTEMsoftware. I dati sono riportati come media \pm s.e.m. ($^{\circ\circ\circ}$ P < 0,001 vs RD; $^{\circ\circ\circ}$ P < 0,001 vsHFD).

L'accumulo tempo-dipendente della fluorescenza ottenuto con il DHE è stato utilizzato come marker surrogato di produzione di specie reattive dell'ossigeno

nei preadipociti (Fig. 17A e B). In funzione del tempo, gli adipociti RD non hanno mostrato alcun accumulo della fluorescenza derivata dal DHE (sequenza di immagini di 30s, RD, in Fig. 17A). Un aumento tempo-dipendente nella generazione del superossido è stato osservato in rPAD di animali HFD (sequenza di immagini di 30s, HFD, in Fig. 17A). Il trattamento con INT-767 riduce significativamente la produzione di superossido, se paragonato all'HFD (sequenza di immagini di 30s, INT-767, in Fig. 17A). La quantificazione del cambio di intensità di fluorescenza nel tempo indica che il trattamento "*in vivo*" con INT-767 migliora le capacità delle rPAD, riducendo l'accumulo del superossido (Fig. 17B).

Per poter monitorare l'attività mitocondriale, è stato valutato il consumo di ossigeno e la quantificazione dei livelli intracellulari di ATP come indicatori della funzione mitocondriale. Il trattamento con INT-767 "*in vivo*" aumenta significativamente il consumo di ossigeno, rispetto ai gruppi RD e HFD (entrambi $P < 0.001$; Fig. 17C), mentre nessuna differenza statisticamente significativa è stata osservata tra i gruppi sperimentali RD e HFD. Sono inoltre riportati i risultati della quantificazione dei livelli intracellulari di ATP nelle cellule rPAD isolate dai vari gruppi sperimentali. Comparati ai preadipociti rPAD di animali RD e HFD, il trattamento con l'INT-767 "*in vivo*" riduce significativamente i livelli di ATP intracellulare (entrambi $p < 0,001$; Fig. 17D), mentre non è stata osservata nessuna differenza tra i gruppi sperimentali di RD e HFD.

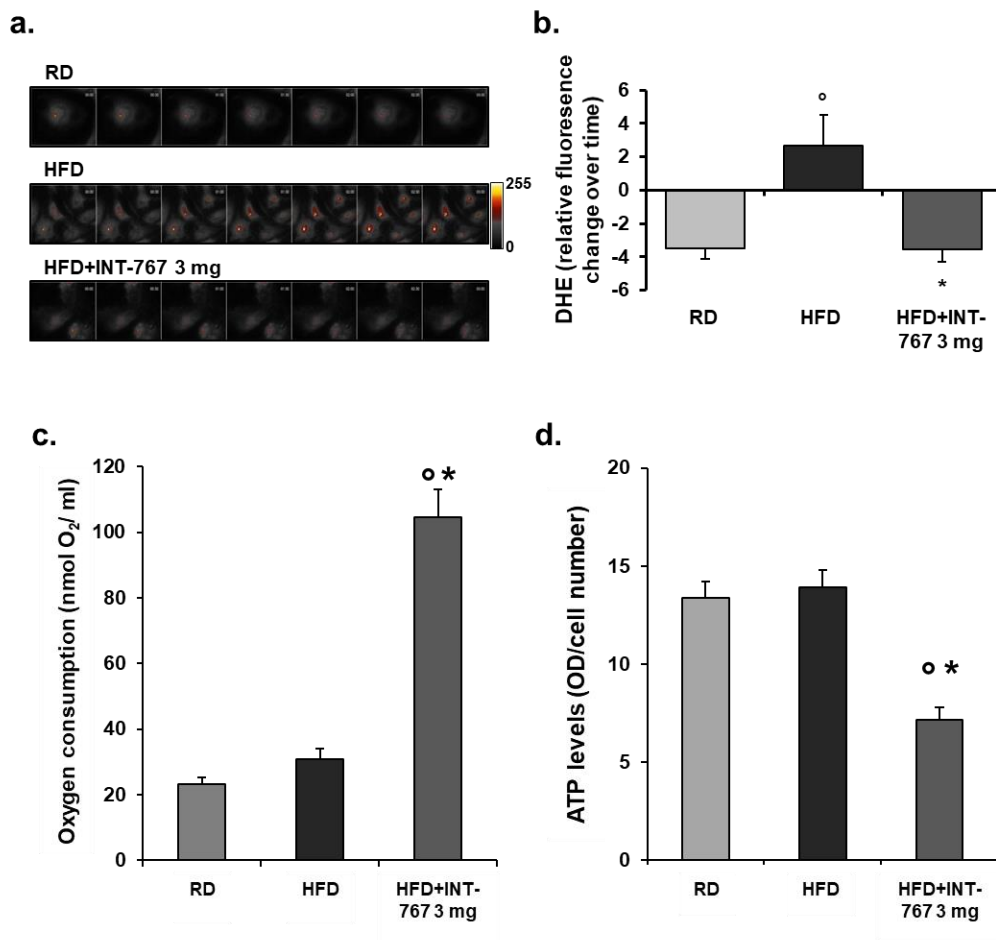


Fig. 17 Il trattamento con INT-767 normalizza la produzione di superossido negli rPAD. Il pannello A mostra immagini rappresentative in time-lapse di rPAD isolati da conigli RD, HFD e trattati con INT-767. Gli rPAD sono stati colorati con 10 μ M di diidroetidio (DHE) e le immagini sono state acquisite per 3 minuti. I grafici a barre mostrano le modifiche dell'intensità di fluorescenza misurata nei nuclei delle cellule rPAD durante l'acquisizione delle immagini in time-lapse (B). L'intensità è stata misurata nella fase iniziale (I_0) e finale (I_{180}) dell'acquisizione delle immagini. Il relativo cambiamento dell'intensità di fluorescenza nel tempo è stata calcolata in ogni cellula come $\Delta I = (I_{180} - I_0) * 100 / I_0$, dove I_0 e I_{180} sono rispettivamente le misure della fluorescenza integrata misurata all'inizio ed alla fine dell'acquisizione delle immagini; ° $p < 0,001$ vs RD; * $p < 0,001$ vs HFD. Il pannello C mostra il consumo di ossigeno in rPAD isolati da RD, HFD e HFD+INT-767 dopo 10 giorni di differenziazione spontanea. È stato misurato grazie all'utilizzo del sistema Oxygraph. Il grafico a barre mostra il rapporto del consumo di ossigeno normalizzato per ml di volume cellulare. I dati sono riportati come media \pm s.e.m. di almeno tre esperimenti indipendenti (° $P < 0,005$ vs RD; * $P < 0,005$ vs HFD). La quantificazione dei livelli intracellulari di ATP è stata misurata in rPAD isolati da ciascun gruppo sperimentale dopo differenziazione spontanea ed è mostrata nel pannello D. La luminescenza è stata normalizzata rispetto al numero di cellule totali. I dati sono riportati in RLU per cella come media \pm s.e.m. di almeno tre esperimenti indipendenti (° $P < 0,005$ vs RD; * $P < 0,005$ vs HFD).

4.7 INT-767 aumenta la differenziazione adipocitaria, la formazione delle goccioline lipidiche e la sensibilità all'insulina nei preadipociti indotti con DIM

Come precedentemente osservato (Maneschi et al., 2013), anche in questo lavoro è stato dimostrato (Fig. 18A e C) che gli rPAD isolati dall'HFD mostrano una percentuale ridotta di positività all'AdipoRed dopo esposizione al DIM, rispetto a RD. Tuttavia, è interessante notare come, il trattamento con INT-767 "*in vivo*" induca un aumento significativo delle cellule AdipoRed-positivo, sia rispetto a quelle isolate da animali HFD che quelle isolate da animali RD (Fig. 18A e C). Il contenuto di gocce lipidiche intracellulari è stato analizzato mediante microscopia confocale in rPADs trattati con DIM isolati dai diversi gruppi sperimentali (Fig. 18B). Le goccioline lipidiche nelle rPAD degli HFD hanno un volume aumentato rispetto agli RD ($p < 0,001$; Fig. 18D). INT-767 somministrato "*in vivo*", normalizza il rimodellamento delle goccioline lipidiche, riducendone il loro volume ($p < 0,0001$; Fig. 18D) e ne aumenta il numero ($p < 0,05$; Fig. 18E) rispetto a quanto osservato nelle rPAD isolati da conigli HFD. Il trattamento "*in vivo*" con INT-767 migliora inoltre anche l'assunzione del ^3H -2-desossi-D-glucosio indotto da insulina (Fig. 18F). Nelle rPAD, isolate da tutti i gruppi sperimentali e indotte con DIM, l'insulina aumenta, in modo dose-dipendente, l'assunzione del ^3H -2-desossi-D-glucosio, con valori di EC_{50} simili (EC_{50} condivisa = $1,6 \pm 0,6$ nM), ma con effetto massimale (E_{MAX}) differente (Fig. 18F). Nelle rPAD di conigli HFD, l' E_{MAX} dell'insulina è significativamente ridotta rispetto alle rPAD di RD (HFD = $114,2 \pm 5,8\%$, RD = $180,1 \pm 9,5\%$, $p = 0,002$; Fig. 18F). Il trattamento "*in vivo*" con INT-767 normalizza la capacità delle rPAD di rispondere all'aumento delle concentrazioni di insulina (E_{MAX} : INT-767 = $174,9 \pm 9,1\%$, $p = 0,027$ vs HFD e $p = 0,49$ vs RD; Fig. 18F). È stato studiato anche l'effetto del trattamento "*in vitro*" con INT-767 ($1 \mu\text{M}$ per 10 giorni) sull'up-take, insulina-dipendente, di ^3H -2-desossi-D-glucosio nelle rPAD indotte da DIM isolate da conigli HFD. Il trattamento "*in vitro*" con INT-767 aumenta significativamente l' E_{MAX} dell'insulina ($176,1 \pm 27,5\%$) rispetto alle cellule HFD non trattate ($134,0 \pm 12,7\%$, $P = 0,028$; Fig. 18G).

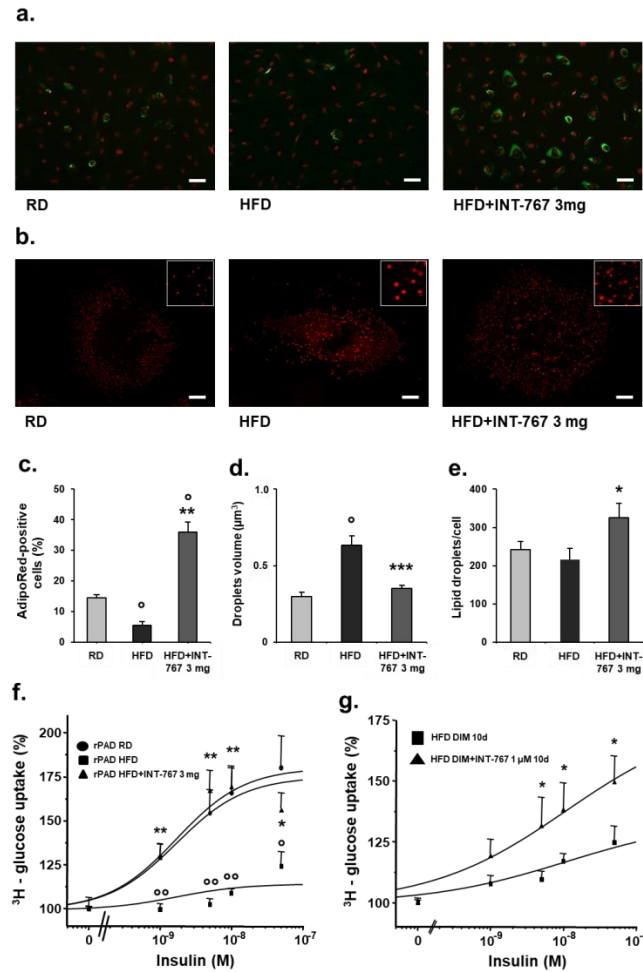


Fig. 18 Il trattamento con INT-767 normalizza la differenziazione adipocitaria, il rimodellamento delle goccioline lipidiche e la sensibilità all'insulina negli rPAD indotti da DIM. Immagini di rPAD isolati da conigli RD, HFD e HFD+INT-767 3mg sono stati analizzati con un microscopio Leica DM6000 (ingrandimento 10 x) per studiare la differenziazione adipogenica (pannello A; barra di scala = 10μm). rPAD di animali RD, HFD e HFD+INT-767 3 mg sono stati analizzati mediante microscopia confocale (ingrandimento 63 x) per l'analisi delle goccioline lipidiche in cellule rPAD colorate con AdipoRed (pannello B; barra di scala = 10μm). Le cellule AdipoRed-positive sono state contate in almeno quattro campi per ogni vetrino ed espresse come percentuale delle cellule totali in tre esperimenti indipendenti (C). Le immagini di microscopia confocale sono state analizzate quantitativamente usando Volocity 5 software per misurare il volume (μm³; pannello D) e il numero (pannello E) di goccioline lipidiche all'interno di singole cellule. Sono state analizzate almeno otto cellule per gruppo. I risultati sono riportati come media ± s.e.m. (° P <0,001 vs RD; * P <0,05, ** P <0,001, *** P <0,0001 vs HFD). Il pannello F riporta l'effetto del trattamento con INT-767, "in vivo", in rPAD indotti da DIM, sulla captazione indotta da insulina di 3H-2-desossi-d-glucosio, dopo esposizione a concentrazioni crescenti di insulina. I risultati sono espressi in percentuale rispetto al basale (senza insulina) e sono riportati come media ± s.e.m. di quattro diversi esperimenti, ciascuno eseguito in duplicato e utilizzando un diverso campione cellulare per gruppo. I valori relativi di EC₅₀ ed E_{max} sono riportati nel testo (° P <0,01, °° P <0,001 HFD vs RD; * P <0,05, ** P <0,001 HFD + INT-7673 mg vs HFD). Il pannello G mostra le curve dose-risposta dell'assorbimento di 3H-glucosio radioattivo negli rPAD trattati con DIM dopo l'esposizione all'aumento delle concentrazioni di insulina. I risultati sono espressi come percentuale rispetto al basale e sono riportati come media ± s.e.m. di quattro diversi esperimenti, ciascuno eseguito in duplicato e utilizzando un diverso campione cellulare per gruppo. I valori relativi EC₅₀ ed E_{max} sono riportati nel testo (* P <0.05 vs HFD).

4.8 INT-767 agisce direttamente sulla differenziazione delle rPAD attraverso l'attivazione di TGR5

Per studiare se gli effetti negli adipociti del trattamento con INT-767 fossero mediati da FXR o da TGR5, sono stati eseguiti una serie di esperimenti *"in vitro"* sulle rPAD. INT-767 aumenta in modo dose-dipendente (0,3-30 μM) la produzione di cAMP nelle rPAD di HFD (Fig. 19A). E' stato esaminato l'effetto della stimolazione, per 10 giorni, con 1 μM di INT-767 in rPAD di animali HFD, rispetto a una dose equimolare di INT-777 o OCA sui geni relativi al pathway di FXR e TGR5. Attraverso RT-PCR, è stato evidenziato che INT-767 upregola in modo significativo i geni legati al pathway di TGR5, tra cui CCND1, CREB1, DIO2, EPAC1 e PKA, raggiungendo livelli simili a quelli osservati dal trattamento con INT-777 (Figura 19B). INT-767 aumenta l'espressione dell'mRNA di TGR5 e SHP, sebbene quest'ultimo non raggiunga significatività statistica (Figura 19B). OCA aumenta significativamente l'espressione dell'mRNA di PKA e TGR5 (Figura 19B). Inoltre, diversi geni relativi alla biogenesi e funzionalità mitocondriale (FIS1; mitofusina 1, MFN1; mitofusina 2, MFN2; NDUFB3; NRF1) e alla differenziazione bruna (LHX8) risultano indotti da INT-767 (Fig. 19C). La maggior parte di questi geni è anche upregolata da INT-777 ma non da OCA (Figura 19C). Inoltre, i trattamenti *"in vitro"* con OCA e INT-767 aumentano significativamente l'espressione dell'mRNA di GLUT4, STAMP2 e del substrato del recettore dell'insulina 1 (IRS1) nelle rPAD di conigli HFD, mentre INT-777 ha mostrato un effetto meno significativo su questi marcatori di signaling dell'insulina (Fig. 19C). Per confermare ulteriormente il ruolo dell'attivazione di TGR5 da parte di INT-767 sulle rPAD, INT-767 è stato testato il suo effetto *"in vitro"* con o senza l'inibitore della protein chinasi permeabile alle cellule (PKI 14-22 amide, miristoilato, 1 μM) e comparato a quello della forskolina (10 μM). Il co-trattamento di INT-767 e PKI aumenta significativamente tutti gli effetti indotti da INT-767 sui geni relativi alla segnalazione TGR5 (CREB1; DIO2; PKA) e sui geni della funzionalità mitocondriale (FIS1; MFN1; MFN2; NDUFB3; NRF1) (Fig. 19D). La forskolina, usata controllo positivo, mima l'effetto di INT-767 sugli effettori a valle di TGR5 (Fig. 19D). L'espressione di UCP1 nelle rPAD di HFD (Fig. 19E, F, G e

H) è stata analizzata con il microscopio a fluorescenza dopo trattamento “*in vitro*” con INT-767 alla dose 1 μM o con una dose equimolare di OCA o INT-777. Il trattamento con INT-767 ha promosso in modo significativo l’adipogenesi bruna, espressa come percentuale di cellule UCP1-positive sulla totalità delle cellule, rispetto agli rPAD non trattati ($p < 0,001$; Fig. 19I). Allo stesso modo, anche, il trattamento “*in vitro*” con INT-777 ha determinato un significativo aumento di UCP1, mentre il trattamento con OCA non ha raggiunto la significatività statistica (Fig. 19I). In accordo a questi dati, il trattamento con INT-767 “*in vitro*” (1 μM) ha determinato un aumento significativo del consumo di ossigeno, rispetto alle rPAD HFD non trattate (HFD: $30,83 \pm 3,15$ nmol O_2/mL ; HFD+INT-767 1 μM : $69,44 \pm 14,74$ nmol O_2/mL ; $P < 0,05$), così come una riduzione della formazione di ATP (HFD: $13,89 \pm 0,92$ unità di luce relativa (RLU)/numero di cellule; HFD+INT-767 1 μM : $9,34 \pm 0,59$ RLU/numero di cellule; $p < 0,005$).

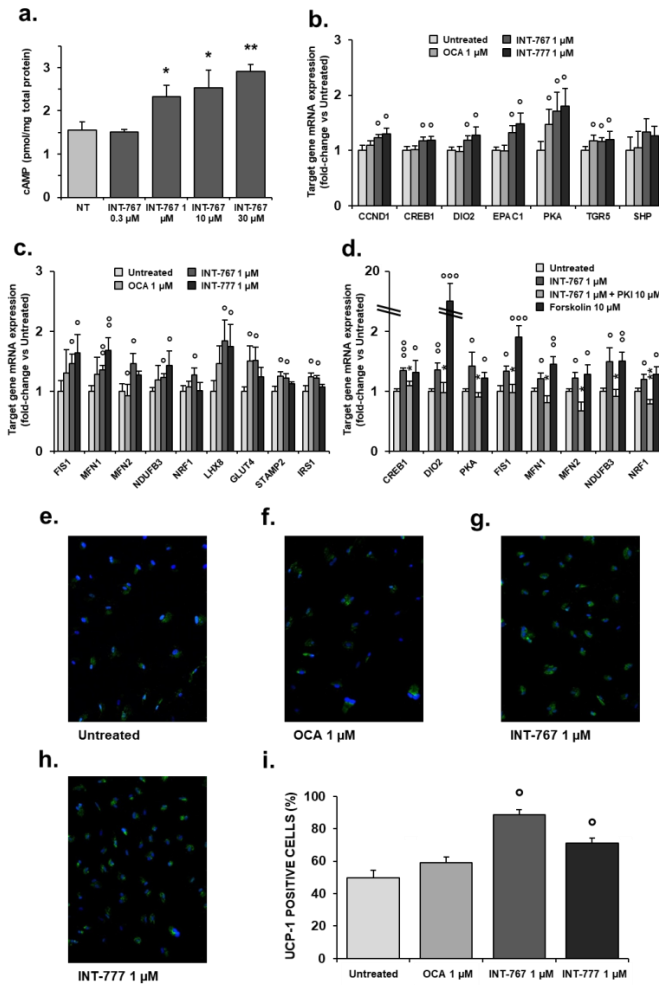


Fig. 19 INT-767 agisce direttamente sulla differenziazione degli rPAD agendo tramite TGR5. Il pannello A mostra l'effetto del trattamento *in vitro* con INT-767 sulla produzione di cAMP intracellulare nelle cellule rPAD isolate dal gruppo sperimentale HFD. La concentrazione basale di cAMP nelle cellule non trattate e mantenute solo in un terreno privo di siero sono state utilizzate come controllo (NT). I dati sono espressi come pmol di cAMP per mg di proteine totali e riportate come media \pm s.e.m. di tre esperimenti indipendenti (* $P < 0,05$, ** $P < 0,01$ vs NT). Pannello B riporta l'effetto *in vitro* sull'espressione dell'mRNA di geni correlati a TGR5 dopo la stimolazione per 10 giorni con OCA (1 μ M), INT-767(1 μ M) o INT-777 (1 μ M) di rPAD di conigli HFD. I dati sono calcolati con il metodo comparativo $2^{-\Delta\Delta Ct}$, utilizzando la subunità dell'RNA ribosomiale 18S come gene di riferimento per la normalizzazione e sono riportati come fold-change rispetto all'espressione dell'mRNA in cellule non trattate. Il pannello C mostra gli effetti *in vitro* sull'espressione dell'mRNA dei geni correlati ai mitocondri dopo stimolazione per 10 giorni di rPAD HFD con OCA(1 μ M), INT-767 (1 μ M) o INT-777 (1 μ M). Pannello D mostra gli effetti *in vitro* sugli rPAD di conigli HFD dopo stimolazione per 18 ore con INT-767 (1 μ M) in presenza o assenza dello specifico inibitore della PKA ad alta affinità, PKI (10 μ M). La forskolina (10 μ M) è stato usato come controllo positivo ($^{\circ}$ $P < 0,05$, $^{\circ\circ}$ $P < 0,01$, $^{\circ\circ\circ}$ $P < 0,001$ vs non trattato; * $P < 0,05$, ** $P < 0,01$ vs INT-767 1 μ M). Pannelli E, F, G, H e I mostrano l'effetto dei trattamenti con OCA, INT-767 e INT-777 per 10 giorni sull'espressione di UCP1 in rPAD. Le immagini di rPAD di conigli HFD non trattati (E) e trattati con OCA (F), INT-767 (G) e INT-777 (H), sono mostrate a scopo dimostrativo. Il pannello I mostra la percentuale di cellule positive a UCP1 misurata contando le cellule colorate in dieci campi per vetrino in tre diversi esperimenti e normalizzato sul totale delle cellule (DAPI colorato) ($^{\circ}$ $P < 0,001$ vs non trattato; scala = 50 μ m).

4.9 siRNA nelle cellule rPAD

Cellule hPAD isolate da campioni di VAT, prelevati da pazienti obesi sottoposti a chirurgia bariatrica, che rappresentano la controparte umana del gruppo di conigli HFD, sono state utilizzate per effettuare il siRNA di FXR e TGR5. L'analisi del controllo positivo (GAPDH) e del controllo negativo dei geni target (FXR e TGR5) ha dimostrato che la procedura sperimentale era funzionale (Fig. 20A, B e C). Per rilevare il silenziamento specifico dei recettori, sono stati selezionati marcatori TGR5-dipendenti dell'attività mitocondriale (FIS1), dell'adipogenesi bruna (recettore adrenergico beta-3, ADRB3) e del segnale dell'insulina FXR-dipendente (IRS1). L'espressione dell'mRNA di FIS1 e di ADRB3, up-regolata dal trattamento con INT-767 e INT-777 *in vitro*, è stata significativamente ridotta dal silenziamento di TGR5, mentre il trattamento con OCA e il silenziamento di FXR non sembrano modulare l'espressione di questi geni (Fig. 20D e E). Analogamente, l'espressione di IRS1 è up-regolata dal trattamento *in vitro* con OCA e con INT-767 e significativamente ridotta dal silenziamento di FXR. Di conseguenza, l'espressione del gene IRS1 non ha mostrato essere downregolata né dal trattamento con INT-777 né dal silenziamento di TGR5 (Fig. 20F).

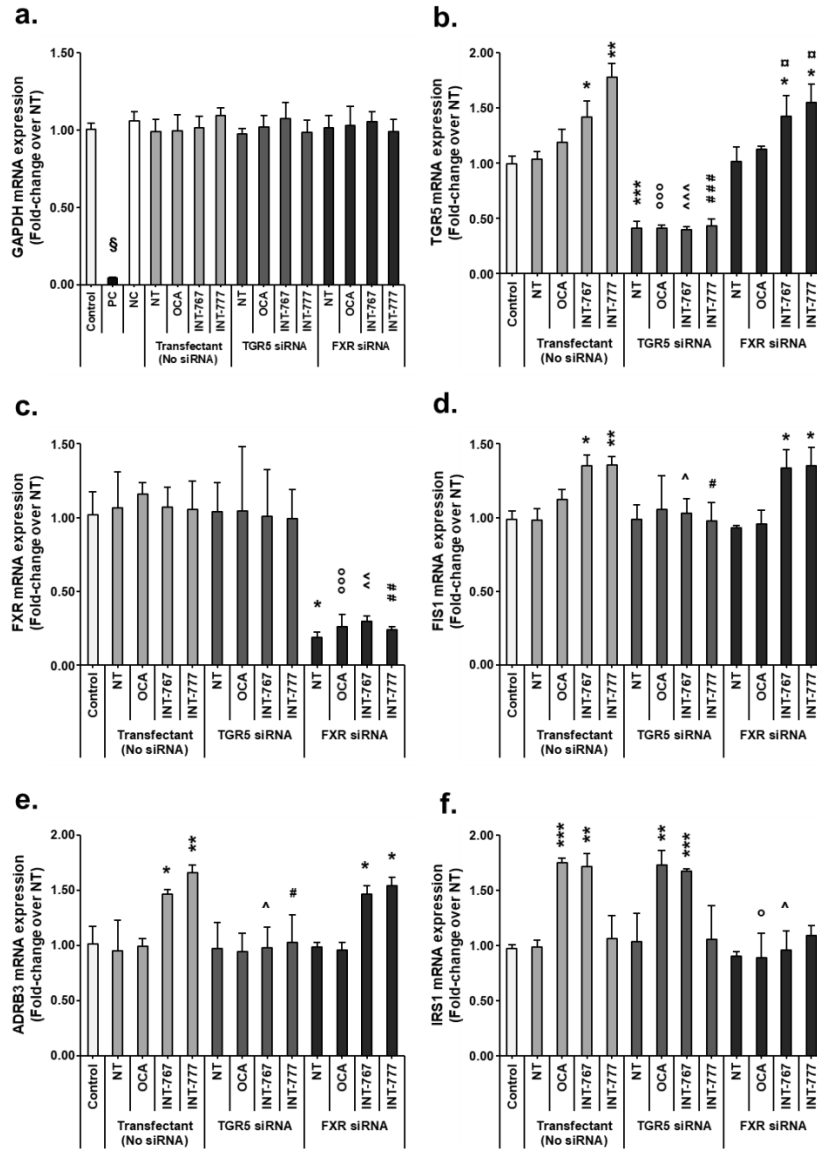


Fig. 20 Il pannello A mostra l'espressione relativa dell'mRNA di GAPDH in cellule di controllo (non trattate), di controllo positivo (PC; Silenziamento GAPDH), di controllo negativo (NC, pool non target) e dopo incubazione con transfettante senza siRNA, con siRNA di TGR5 e con siRNA di FXR in hPAD non trattati (NT) o trattati (OCA, INT-767, INT-777). Pannelli B e C mostrano, rispettivamente, l'espressione relativa dell'mRNA di TGR5 e FXR. I pannelli D, E ed F mostrano l'espressione relativa dell'mRNA di FIS1, ADRB3 e IRS1, rispettivamente, in cellule di controllo (non trattate) e dopo incubazione con transfettante senza siRNA, con siRNA di TGR5 e con siRNA di FXR in hPAD non trattate (NT) o trattate (OCA, INT-767, INT-777). Gli esperimenti sono stati eseguiti in triplice copia usando quattro diversi campioni di hPAD. I dati sono calcolati con il metodo comparativo $2^{-\Delta\Delta Ct}$, utilizzando la subunità dell'RNA ribosomiale 18S come gene di riferimento per la normalizzazione. I risultati sono espressi in fold-change rispetto alle cellule di controllo (non trattate) e sono riportati come media \pm s.e.m. su scala aritmetica. §P <0,001 vs Controllo; P <0,05 vs NT (FXR siRNA); * P <0,05, ** P <0,01, *** P <0,001 vs NT (transfettante); ° P <0,05, °° P <0,001 vs OCA (transfettante); ^ P <0,05, ^^ P <0,01, ^^ P <0,001 vs INT-767(Transfettante); #P <0,05, ## P <0,01, ### P <0,001 vs INT-777 (transfettante).

4.10 Il trattamento con INT-767 inibisce la NASH indotta dalla dieta HFD

Dopo aver osservato che il trattamento con INT-767 migliora le alterazioni indotte dalla dieta HFD nel VAT e la funzionalità dei preadipociti disfunzionali, compresa l'insulino-resistenza, è stato testato se il trattamento “*in vivo*” con INT-767 potesse migliorare la NASH associata a Mets, il segno epatico della resistenza all'insulina. Una dieta ricca di grassi ha indotto gravi alterazioni istologiche nel fegato (Fig. 21), compresa: ipossia (A), accumulo di grasso (B), deposizione di collagene (C) e infiltrazione di cellule mononucleate (D). Inoltre, la dieta HFD aumenta l'infiltrato pro-infiammatorio di macrofagi di tipo 1, come dimostrato dalla colorazione con il marcatore M1, IRF5 (Fig. 21E). Tutte le alterazioni sono significativamente ridotte dal trattamento con INT-767 (Fig. 21A, B, C, D ed E).

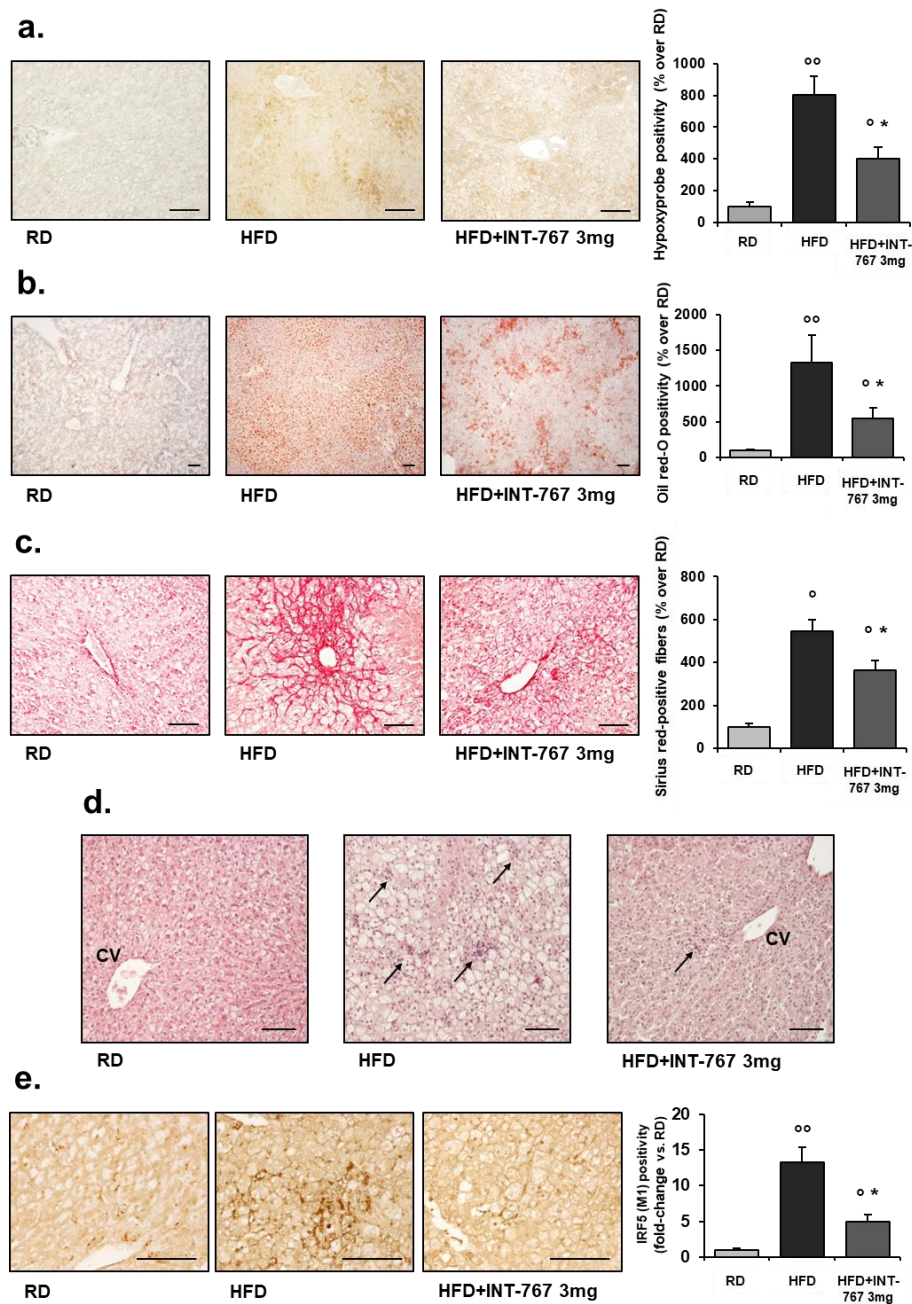


Fig. 21 Il pannello A mostra la colorazione immunohistochemica di addotti ipossici in sezioni epatiche isolate da conigli RD, HFD e HFD+INT-767 (3 mg/kg). La densità ottica misurata negli RD è stata presa come 100% per effettuare l'analisi quantitativa dell'immagine computerizzata; sono stati condotti tre esperimenti indipendenti per ogni gruppo di trattamento (^o P <0,001, ^{oo} P <0,0001 vs RD; * P <0,001 vs HFD). Pannello B mostra l'accumulo di lipidi nelle sezioni del fegato, come rivelato dalla colorazione Oil Red-O. I dati sono riportati come percentuale rispetto agli RD (^o P <0,05, ^{oo} P <0,01 vs RD; * P <0,05 vs HFD). Il pannello C riporta la colorazione Sirius Red delle sezioni epatiche. In ogni sezione, aree positive Picrosirius red sono state misurate in cinque campi a scelta casuali non sovrapposti e sono stati determinati escludendo gli artefatti di colorazione. I dati sono espressi in percentuale rispetto agli RD (^o P <0,0001 vs RD; * P <0,05 vs HFD). Il pannello D mostra immagini rappresentative della colorazione con ematossilina/eosina di sezioni epatiche. Le frecce indicano infiltrati di cellule mononucleate (CV, vena centro lobolare). Il pannello E mostra la localizzazione immunohistochemica di IRF5 (marcatore macrofago M1), la cui positività è quantificata ed espressa come fold-change rispetto agli RD (^o P <0,01, ^{oo} P <0,001 vs RD; * P <0,01 vs HFD). Tutte le immagini sono rappresentative di quelle ottenute da almeno tre conigli per gruppo (barra di scala = 100µM).

La dieta HFD ha mostrato effetti marcati sulla trascrizione genica negli omogenati di fegato (Fig. 14B), inducendo un significativo aumento di geni pro-infiammatori (IL2; IL6; TNF- α) e una diminuzione dell'espressione del cluster di differenziazione 206 (CD206), un marcatore macrofagico di tipo antiinfiammatorio (macrofagi M2). INT-767 ha ridotto in modo significativo l'espressione dell'mRNA di tutti i geni pro-infiammatori sopra menzionati, mentre aumenta significativamente quelli anti-infiammatori, tra cui FOXP3 e IL10 (Fig. 14B). È interessante anche notare come il trattamento con INT-767 aumenti notevolmente i livelli circolanti della citochina anti-infiammatoria IL10 (RD: 16,07 \pm 2,26 pg/mL; HFD: 12,88 \pm 1,60 pg/mL; HFD+INT-767: 32,50 \pm 6,01 pg/mL, P=0,007 vs HFD). INT-767 ha indotto una significativa riduzione dell'espressione epatica dei geni relativi alla sintesi "*de novo*" degli acidi grassi (acetil-CoA carbossilasi 1, ACC1; acido grasso sintasi, FAS), mentre ha aumentato quelli correlati all'assorbimento lipidico (recettore scavenger B1, SRB1) e quelli correlati all'efflusso (trasportatore di cassette ATP-binding 1, ABCA1), al metabolismo (diacilglicerolo O-aciltransferasi 2, DGAT2; PPARA) e alla formazione di gocce lipidiche (PLIN1; proteina 23 associata a sinaptosomiale, SNAP23; STX5; VAMP4) (Fig. 6B). I marcatori della biogenesi (NRF1; PGC1A; PGC1B; TFAM) e funzione mitocondriale (FIS1; MFN1; MFN2; proteina simile alla dinamina, OPA1; SDHB; SLC25A12) erano anche significativamente aumentati dal trattamento con INT-767. Infine, è stata osservata in conigli trattati con INT-767 rispetto a quelli HFD una significativa riduzione dell'agente pro-fibrogenico derivato dagli epatociti (SNAI2, Fig. 14C). Nel fegato, il trattamento con INT-767 ha stimolato l'espressione di geni correlati alla segnalazione dell'insulina, tra cui IRS1 e STAMP2 (Fig. 14C). L'analisi di western blot ha evidenziato come la traslocazione a membrana di GLUT4, significativamente ridotta in animali HFD, sia normalizzata dal trattamento con INT-767 (Fig. 14D).

5. DISCUSSIONE

La limitata capacità degli adipociti di immagazzinare e metabolizzare i nutrienti in eccesso è un elemento chiave nel determinare l'insulino-resistenza, che porta, in ultima istanza, alla deposizione dei lipidi in sedi ectopiche, come il fegato. Conigli alimentati con una dieta HFD per 12 settimane presentano un'importante riduzione della sensibilità all'insulina, associata ad alterazioni ultrastrutturali e delle funzioni dei mitocondri (Maneschi et al., 2016). Sia la morfologia che la dinamicità dei mitocondri rappresentano un tipico carattere della funzionalità mitocondriale (Liesa & Shirihai 2013). Nei mitocondri sani e dinamici, la membrana interna è caratterizzata da abbondanti creste che forniscono una maggiore superficie, consentendo una maggiore eliminazione delle specie reattive dell'ossigeno (ROS) (Newmeyer & Ferguson-Miller 2003). In questa tesi abbiamo descritto come i mitocondri di rPAD derivati da conigli HFD siano piccoli, immobili e molto frammentati, con una riduzione della superficie delle creste mitocondriali e un aumento della formazione del superossido. Il trattamento con INT-767 *"in vivo"* ha migliorato le alterazioni mitocondriali negli rPAD, riducendo il contenuto di superossido e la sintesi di ATP e aumentando il consumo di ossigeno. Questi miglioramenti funzionali dei mitocondri sono stati associati ad un aumento dell'espressione di UCP1 indotto dall'INT-767.

Anche il rimodellamento delle goccioline lipidiche è stato nettamente migliorato dal **trattamento con INT-767 *"in vivo"***. Le goccioline lipidiche interagiscono strettamente con il reticolo endoplasmatico e i mitocondri (Aon et al., 2014) e proteggono gli organelli cellulari dalla potenziale lipotossicità degli acidi grassi (Nguyen et al., 2017), rappresentando così un meccanismo efficace per mantenere bassi i livelli dei ROS, che altrimenti avrebbero effetti detrimentalmente anche sulla sensibilità all'insulina (Kelley et al., 2002, Bach et al. 2003, Toledo et al. 2006, Gao et al. 2010, Mason & Watt 2015). In linea con questa visione, la somministrazione *"in vivo"* di INT-767 non solo migliora la funzione mitocondriale e la formazione delle goccioline lipidiche, ma normalizza anche la sensibilità all'insulina nei preadipociti.

Un risultato interessante di questo studio è che negli rPAD di conigli trattati con INT-767 è stimolata l'espressione di geni correlati sia con l'adipogenesi bruna che con la segnalazione del cGMP, un'importante via che può giocare un ruolo fondamentale nel rimodellamento degli adipociti verso un fenotipo bruno (Haas et al., 2009, Mitschke et al. 2013, Hoffmann et al. 2015, Maneschi et al. 2016). Inoltre, è stata osservata un'importante riduzione dei marcatori relativi all'adipogenesi bianca e un aumento dei marcatori della biogenesi mitocondriale. Questi risultati possono essere giustificati sia da un miglioramento del metabolismo generale che da un effetto diretto sugli adipociti da parte del trattamento con INT-767 "in vivo".

È interessante notare che la fexaramina (Fex), agonista FXR solo a livello intestinale, induce la produzione di FGF15 in topi obesi, senza attivare geni target di FXR nel fegato (Fang et al., 2015). Fex promuove miglioramenti metabolici quali: riduzione dell'aumento ponderale indotto dalla dieta, riduzione del processo di gluconeogenesi e dell'infiammazione diffusa, migliorando così la termogenesi e la browning del tessuto adiposo bianco (Fang et al. 2015). Questi risultati suggeriscono anche che l'attivazione di FXR, limitata all'intestino potrebbe contribuire al miglioramento generale delle alterazioni metaboliche. È interessante notare che è stata evidenziata un'elevata espressione sia di FXR che di TGR5 nell'intestino.

Pertanto, al fine di cercare di chiarire se INT-767 potesse agire direttamente sul tessuto adiposo, sono stati effettuati una serie di esperimenti in vitro. Preadipociti isolati da animali HFD sono stati trattati con INT-767, per 10 giorni, al termine dei quali è stata analizzata l'espressione indotta di UCP1 e il consumo di ossigeno, a cui è risultata associata una riduzione della formazione di ATP. Questo si può spiegare in quanto l'induzione di UCP1 porta ad un aumento del processo di disaccoppiamento della respirazione cellulare dalla fosforilazione, determinando così la dissipazione dell'energia sotto forma di calore (Rousset et al., 2004). Queste osservazioni sono in linea con il modello attualmente accettato secondo cui la regolazione di UCP1 accoppiata alla riduzione della produzione di ATP, rappresentano il punto centrale dell'adipogenesi bruna (Klingenspor et al. 2017, Fromme et al. 2018). Inoltre, nelle cellule trattate con INT-767, è stato

osservato anche un aumento significativo dell'espressione dell'mRNA di NRF1. NRF1 è considerato come un fattore chiave per la regolazione dell'espressione di UCP1 e della funzione termogenica nel BAT (Bartelt et al., 2018). INT-767 ha anche mostrato di indurre l'espressione dei geni relativi alla biogenesi e alla funzione mitocondriale. In questi esperimenti, l'INT-767 si comporta principalmente come un agonista TGR5, attraverso l'attivazione diretta del pathway cAMP/PKA. Infatti gli effetti dell'INT-767 sono stati mimati da una concentrazione equimolare dell'agonista selettivo TGR5, l'INT-777, e dal diretto attivatore della PKA, forskolina, mentre sono stati abrogati dall'inibitore selettivo della PKA, PKI. A supporto di tali risultati è stato mostrato nelle rPAD che INT-767 aumenta la produzione intracellulare di cAMP in maniera dose-dipendente e, che, il trattamento sia "in vitro" che "in vivo" con INT-767 induce l'espressione di geni TGR5 dipendenti. I risultati sono coerenti con la recente osservazione che un altro doppio agonista FXR/TGR5 promuove la trans-differenziazione "in vitro" di preadipociti murini 3T3-L1 verso un fenotipo beige, aumentando il cAMP intracellulare (Carino et al., 2017). Nel BAT, TGR5 è generalmente implicato nell'induzione del dispendio energetico, riducendo nei topi l'obesità e la resistenza all'insulina indotta dalla dieta (Watanabe et al., 2006). Il trattamento in adipociti bruni umani con l'agonista BA o TGR5 (INT-777) migliora significativamente il dispendio energetico e la respirazione mitocondriale attraverso un meccanismo dipendente da UCP1 (Broeders et al., 2015).

I cambiamenti osservati a livello mitocondriale e nelle goccioline lipidiche, insieme alla modulazione del profilo dell'espressione genica, indica che INT-767 potrebbe rimodellare il tessuto adiposo, principalmente attraverso l'attivazione di TGR5, inducendo un programma di differenziazione dei preadipociti verso un fenotipo bruno, che può portare a mitocondri metabolicamente più sani. In omogenati di VAT isolati da animali trattati "in vivo" con INT-767, è stato osservato un aumento di UCP1, rispetto ad animali HFD non trattati, inoltre l'espressione di diversi geni legati alla mitocondriogenesi, alla proliferazione cellulare e la processo di browning risultano aumentati negli omogenati di VAT di conigli trattati con INT-767, rispetto a campioni isolati da HFD.

Questi effetti erano associati ad una maggiore espressione dell'mRNA di geni coinvolti nella formazione delle goccioline lipidiche e di PPAR α , un potente regolatore della differenziazione, dell'ossidazione degli acidi grassi e dell'induzione dell'assorbimento di glucosio indotto dall'insulina (Goto et al., 2011). Nel VAT, l'INT-767 ha mostrato anche di normalizzare la traslocazione a membrana, indotta dalla risposta all'insulina, di GLUT4 (Govers 2014) e RhoA (Kanda et al. 2006), aumentando anche l'espressione di STAMP2 (Wellen et al. 2007). Inoltre, il trattamento "*in vitro*" di rPAD con INT-767 ha significativamente aumentato l'espressione di GLUT4, STAMP2 e IRS1. Questi effetti osservati "*in vitro*" erano mimati da OCA, ma non da INT-777, indicando che l'attivazione di FXR principalmente contribuisce a migliorare la segnalazione dell'insulina da parte di INT-767.

L'uso di conigli come modelli sperimentali presenta alcune limitazioni. In particolare, questo modello non è adatto per studi di knockdown, poiché l'inibizione dell'espressione genica è difficile da riprodurre nei conigli (Kawano e Honda 2017). In particolare, il silenziamento *in vitro* di FXR/TGR5, negli rPAD di coniglio, non può essere eseguito utilizzando gli strumenti commerciali attualmente disponibili per il silenziamento. Un possibile approccio potrebbe essere rappresentato dall'uso della tecnologia CRISPR/Cas9, al fine di chiarire ulteriormente il contributo specifico di ciascun recettore. In questo lavoro è stato deciso di eseguire il silenziamento tramite siRNA di adipociti umani isolati da soggetti obesi sottoposti a chirurgia bariatrica, che rappresentano per l'uomo l'equivalente degli rPAD di coniglio HFD. È stato osservato che il silenziamento dell'espressione dell'mRNA di FXR down-regola l'espressione dell'mRNA di IRS1, come indice di sensibilità all'insulina indotta da FXR. Allo stesso modo, il siRNA diretto verso TGR5 ha indotto una marcata riduzione di FIS1 e dell'espressione dell'mRNA di ADRB3, rispettivamente marcatori di biogenesi mitocondriale e adipogenesi bruna.

Il trattamento "*in vivo*" di INT-767 nei conigli HFD, previene anche altre caratteristiche legate all'insulino-resistenza, come l'ipertrofia e l'ipossia degli adipociti. È stato anche osservato che FXR è altamente espresso non solo negli

adipociti ma anche nelle cellule endoteliali della rete vascolare del VAT. Un gran numero di dati supporta un ruolo di FXR nel processo di rimodellamento vascolare, in parte attraverso un effetto sulle cellule endoteliali (He et al., 2006, Li et al., 2009, Hageman et al., 2010, Miyazaki-Anzai et al. 2010, Vignozzi et al. 2017). Perciò, l'attività di INT-767 sul recettore FXR dovrebbe essere indagata, su cellule diverse dagli adipociti del VAT, come ad esempio, le cellule endoteliali.

Nel complesso, i risultati suggeriscono come l'INT-767 eserciti due azioni distinte sul VAT, promuovendo, da una parte, il segnale di browning mediato da TGR5 e, dall'altra, migliorando la sensibilità all'insulina attraverso FXR. Tuttavia, va sottolineato che anche "*in vitro*" il trattamento con OCA è stato in grado di indurre in rPAD l'espressione di TGR5 e del suo effettore a valle, PKA. Allo stesso modo, la somministrazione "*in vivo*" di OCA up-regola non solo l'espressione di SHP ma anche l'espressione di TGR5 nel VAT. Recentemente, uno studio ha identificato TGR5 come gene bersaglio di FXR, per la presenza dell'elemento responsivo per FXR sul promotore di TGR5 (Pathak et al.2017), suggerendo così un cross-talk tra la segnalazione di FXR e quella di TGR5.

È stato osservato come l'attivazione selettiva di FXR, attraverso l'OCA, sia in grado di ridurre la massa del VAT, migliorando anche la segnalazione dell'insulina negli rPAD. Tuttavia, i dati di questo studio mostrano sui preadipociti un'azione più potente di INT-767 rispetto all' OCA sui preadipociti, non solo nel migliorare la sensibilità all'insulina, ma anche promuovendo la differenziazione bruna.

Inoltre i nostri risultati indicano anche effetti sistemici positivi del trattamento con INT-767 nei conigli affetti da Mets. Infatti, alcune caratteristiche della NASH, quali l'infiammazione, la steatosi, la fibrosi e l'ipossia, erano notevolmente ridotte nei conigli HFD trattati con INT-767.

La steatosi epatica di per sé può innescare lo sviluppo di insulino-resistenza epatica e infiammazione (Petersen& Shulman 2017). INT-767 aumenta la traslocazione a membrana di GLUT4, con conseguente up-regolazione dell'espressione di IRS1 e STAMP2, migliorando così la steatosi epatica e l'insulino resistenza caratteristica della NAFLD (Kim et al., 2015). Questi risultati sono in accordo con i risultati precedenti ottenuti in un modello murino di NASH (McMahan et al., 2013). In questo studio, INT-767 contrastava l'infiammazione

del fegato indotta dall'HFD, attraverso la polarizzazione verso un fenotipo macrofagico anti-infiammatorio M2, che promuoveva anche la regressione della fibrosi epatica (Krenkel & Tacke 2017, Tacke 2017). Inoltre, il trattamento con INT-767 riduce sia la fibrosi epatica che l'espressione di SNAI2, un fattore di trascrizione pro-fibrotica (Wynn & Ramalingam 2012).

Confermando i risultati ottenuti nel VAT, l'analisi dell'espressione dei geni correlati a FXR e TGR5 nel fegato indica che INT-767 si comporta come un doppio agonista FXR/TGR5; in particolare, INT-767 aumenta l'espressione epatica di geni classicamente a valle di TGR5 e FXR, mentre diminuisce l'espressione di CYP7A1. Inoltre, il trattamento con INT-767 stimola il segnale di FGF19 dipendente da FXR non solo nel fegato, ma anche nell'intestino. È interessante notare che l'INT-767 migliora anche l'espressione intestinale di PCSK1, un enzima coinvolto nella biosintesi di GLP-1 e dipendente da TGR5 (Dhanvantari et al., 2001). Il contributo relativo dell'attivazione di FXR e di TGR5 a livello dell'intestino tenue, sul miglioramento generale delle alterazioni metaboliche indotte nell'HFD non può essere escluso dai presenti dati. Saranno necessari ulteriori studi mirati a indagare più a fondo le azioni specifiche degli agonisti FXR/TGR5 sulla via di segnalazione di FGF19.

In sintesi, lo studio condotto dimostra che l'INT-767, doppio agonista FXR e TGR5, migliora l'insulino-resistenza, l'ipercolesterolemia, la disfunzione del VAT e la NASH, proteggendo i conigli dalla Mets indotta da una dieta HFD.

Gli effetti benefici dell'INT-767 sul VAT sono dovuti, almeno in parte, a un effetto diretto sulla differenziazione dei preadipociti. I nostri dati suggeriscono un miglioramento del quadro metabolico promosso dall'INT-767 negli rPAD, principalmente attraverso un aumento della sensibilità all'insulina dipendente da FXR e un miglioramento della funzione mitocondriale e della differenziazione bruna dipendente da TGR5. Infatti, l'INT-767, in quanto doppio agonista FXR e TGR5, è in grado di indurre effetti benefici relativi a entrambi i singoli recettori. Tuttavia, anche altri meccanismi potrebbero cooperare per migliorare il fenotipo metabolico. L'attivazione di FXR e TGR5 nel fegato potrebbe, di per sé, spiegare gli effetti protettivi contro la NASH, esercitati dal trattamento con INT-767. Inoltre, l'effetto dell'INT-767 su FGF19 dipendente da FXR e/o sulla proconvertasi

dipendente da TGR5 nell'intestino, supporta la possibilità che uno o entrambi questi fattori intestinali possano contribuire al miglioramento del fenotipo metabolico. In conclusione, questo studio ha mostrato che l'INT-767 esercita effetti pleiotropici notevoli nella Mets, inducendo un miglioramento della sensibilità all'insulina, un miglioramento della funzione mitocondriale, un'inibizione dello sviluppo della NASH e un miglioramento delle funzioni del tessuto adiposo, che porta a differenziazione dei preadipociti verso un fenotipo metabolicamente sano.

6. BIBLIOGRAFIA

"Press Release - FDA Approves Ocaliva for Rare, Chronic Liver Disease". United States Food and Drug Administration. May 31, 2016. Retrieved 15 November 2016.

Abdul-Ghani M.A., De Fronzo R.A. Mitochondrial dysfunction, insulin resistance, and type 2 diabetes mellitus *Curr. Diab. Rep.* 8 173–178. 2008.

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

Alberti K. G. and Zimmet P. Z. Definition, diagnosis and classification of diabetes mellitus and its complications. Part 1: diagnosis and classification of diabetes mellitus provisional report of aWHO consultation, *DiabeticMedicine*, vol. 15, no. 7, pp. 539–553, 1998.

Anderson PJ, Critchley JA, Chan JC, Cockram CS, Lee ZS, Thomas GN, Tomlinson B. Factor analysis of the metabolic syndrome: obesity vs insulin resistance as the central abnormality *International Journal of Obesity* 25:1782, 2001.

Aon MA, Bhatt N & Cortassa S Mitochondrial & cellular mechanisms for managing lipid excess *Frontiers in Physiology* 31 282, 2014.

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.

Bach D, Pich S, Soriano FX, Vega N, Baumgartner B, Oriola J, Daugaard JR, Lloberas J, Camps M, Zierath JR, Rabasa-Lhoret R, Wallberg-Henriksson H, Laville M, Palacín M, Vidal H, Rivera F, Brand M, Zorzano A. Mitofusin-2 determines mitochondrial network architecture and mitochondrial metabolism. A novel regulatory mechanism altered in obesity *Journal of Biological Chemistry* 278 17190–17197, 2003.

Badimon L, Oñate B, Vilahur G. Adipose-derived Mesenchymal Stem Cells and Their Reparative Potential in Ischemic Heart Disease. *Rev Esp Cardiol (Engl Ed)*. 68(7):599-611, 2015.

Baglioni S1, Francalanci M, Squecco R, Lombardi A, Cantini G, Angeli R, Gelmini S, Guasti D, Benvenuti S, Annunziato F, Bani D, Liotta F, Francini F, Perigli G, Serio M, Luconi M. Characterization of human adult stem-cell populations isolated from visceral and subcutaneous adipose tissue *FASEB Journal* 10 3494–3505, 2009.

Bala V, Rajagopal S, Kumar DP, Nalli AD, Mahavadi S, Sanyal AJ, Grider JR, Murthy KS. Release of GLP-1 and PYY in response to the activation of G protein-coupled bile acid receptor TGR5 is mediated by Epac/PLC- ϵ pathway and modulated by endogenous H₂S. *Front. Physiol.* 5: 420, 2014.

Balkau B. and Charles M. A. Comment on the provisional report from the WHO consultation: European Group for the Study of Insulin Resistance (EGIR), *Diabetic Medicine*, vol. 16, no. 5, pp. 442–443 1999.

Bambace C. M., Pedrotti G., Ferrara M., Zamboni Obesity, adipose tissue and inflammation *Biochimica Clinica* 35(4) 275, 2011.

Bartelt A, Widenmaier SB, Schlein C, Johann K, Goncalves RLS, Eguchi K, Fischer AW, Parlakg l G, Snyder NA, Nguyen TB, Bruns OT, Franke D, Bawendi MG, Lynes MD, Leiria LO, Tseng YH, Inouye KE, Arruda AP, Hotamisligil GS. Brown adipose tissue thermogenic adaptation requires Nrf1-mediated proteasomal activity. *Nature Medicine* 24 292–303, 2018.

Bashan N, Dorfman K, Tarnovscki T, Harman-Boehm I, Liberty IF, Bl her M, Ovdia S, Maymon-Zilberstein T, Potashnik R, Stumvoll M, Avinoach E, Rudich A. Mitogen-activated protein kinases, inhibitory-kappaB kinase, and insulin signaling in human omental versus subcutaneous adipose tissue in obesity. *Endocrinology* 148: 2955–2962, 2007.

Beaven SW, Matveyenko A, Wroblewski K, Chao L, Wilpitz D, Hsu TW, Lentz J, Drew B, Hevener AL, Tontonoz P. Reciprocal regulation of hepatic and adipose

lipogenesis by liver X receptors in obesity and insulin resistance. *Cell Metab.* 2013;18:106-117, 2013.

Berg AH, Scherer PE . Adipose tissue, inflammation, and cardiovascular disease. *Circ Res.* 96 (9): 939-49, 2005.

Bernlohr DA, Jenkins AE, Bennaars AA. Adipose tissue and lipid metabolism. In: Vence JE, Vence D, editors. *Biochemistry of lipids, lipoproteins and membranes.* 4th ed. Elsevier Science: Amsterdam; pp. 263–89, 2002.

Berry, R., and Rodeheffer, M. S. Characterization of the adipocyte cellular lineage in vivo *Nat. Cell Biol.* 15, 302–308, 2013.

Bonet ML, Oliver P, Palou A. Pharmacological and nutritional agents promoting browning of white adipose tissue *Biochim Biophys Acta* 1831: 969–985, 2013.

Bordicchia M., Liu D., Amri E.Z., Ailhaud G., Dessi-Fulgheri P., Zhang C., Takahashi N., Sarzani R., Collins S., Cardiac natriuretic peptides act via p38 MAPK to induce the brown fat thermogenic program in mouse and human adipocytes, *J. Clin. Invest.* 122 1022–1036, 2012.

Boström P, Wu J, Jedrychowski MP, Korde A, Ye L, Lo JC, Rasbach KA, Boström EA, Choi JH, Long JZ, Kajimura S, Zingaretti MC, Vind BF, Tu H, Cinti S, Højlund K, Gygi SP, Spiegelman BM. A PGC-1 α -dependent myokine that drives brown-fat-like development of white fat and thermogenesis *Nature* 481: 463–468, 2012.

Brendel C1, Schoonjans K, Botrugno OA, Treuter E, Auwerx J. The small heterodimer partner interacts with the liver X receptor α and represses its transcriptional activity *Mol. Endocrinol.* 16, 2065–2076, 2002.

Broeders EP, Nascimento EB, Havekes B, Brans B, Roumans KH, Tailleux A, Schaart G, Kouach M, Charton J, Deprez B, Bouvy ND, Mottaghy F, Staels B, van Marken Lichtenbelt WD, Schrauwen P The bile acid chenodeoxycholic acid increases human brown adipose tissue activity *Cell Metabolism* 22 418–426, 2015.

Cannon B, Nedergaard J. Brown adipose tissue: function and physiological significance *Physiol Rev* 84: 277–359, 2004.

Cao Y. Angiogenesis and vascular functions in modulation of obesity, adipose metabolism, and insulin sensitivity *Cell Metab.* 18:478-489, 2013.

Carino A, Cipriani S, Marchianò S, Biagioli M, Santorelli C, Donini A, Zampella A, Monti MC & Fiorucci S BAR502, a dual FXR and GPBAR1 agonist, promotes browning of white adipose tissue and reverses liver steatosis and fibrosis. *Scientific Reports* 7 42801, 2017.

Cariou B1, 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 *J. Biol. Chem.* 281, 11039–11049, 2006.

Casaburi I1, Avena P, Lanzino M, Sisci D, Giordano F, Maris P, Catalano S, Morelli C, Andò S. Chenodoxycholic acid through a TGR5-dependent CREB signaling activation enhances cyclin D1 expression and promotes human endometrial cancer cell proliferation *Cell Cycle.* 11: 2699-2710, 2012.

Cawthorn WP, Scheller EL, MacDougald OA. Adipose tissue stem cells meet preadipocyte commitment: going back to the future” *J Lipid Res* 53: 227–46, 2012.

Christoffolete MA1, Linardi CC, de Jesus L, Ebina KN, Carvalho SD, Ribeiro MO, Rabelo R, Curcio C, Martins L, Kimura ET, Bianco AC. Mice with targeted disruption of the Dio2 gene have cold-induced overexpression of the uncoupling protein 1 gene but fail to increase brown adipose tissue lipogenesis and adaptive thermogenesis” *Diabetes* 53: 577–584, 2004.

Cipolat S., Martins de Brito O., Dal Zilio B., Scorrano L., OPA1 requires mitofusin 1 to promote mitochondrial fusion” *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 101 15927–15932, 2004.

Cleeman J. I., "Executive summary of the 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)," *Journal of the American Medical Association*, vol. 285, no. 19, pp. 2486–2497, 2001.

Comeglio P, Filippi S, Sarchielli E, Morelli A, Cellai I, Corcetto F, Corno C, Maneschi E, Pini A, Adorini L, Vannelli GB, Maggi M, Vignozzi L. Anti-fibrotic effects of chronic treatment with the selective FXR agonist obeticholic acid in the bleomycin-induced rat model of pulmonary fibrosis *Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology* 168 26–37, 2017.

Coppack SW¹, Evans RD, Fisher RM, Frayn KN, Gibbons GF, Humphreys SM, Kirk ML, Potts JL, Hockaday TD. Adipose tissue metabolism in obesity: lipase action in vivo before and after a mixed meal *Metabolism*. 41(3):264-72, 1992.

Crewe C, An YA, Scherer PE. The ominous triad of adipose tissue dysfunction: inflammation, fibrosis, and impaired angiogenesis. *J Clin Invest*. 127:74-82, 2017.

Cypess AM¹, Lehman S, Williams G, Tal I, Rodman D, Goldfine AB, Kuo FC, Palmer EL, Tseng YH, Doria A, Kolodny GM, Kahn CR. Identification and importance of brown adipose tissue in adult humans" *N. Engl. J. Med*. 360, 1509–1517, 2009.

Czech MP, Tencerova M, Pedersen DJ, Aouadi M. Insulin signalling mechanisms for triacylglycerol storage. *Diabetologia*. 56(5):949-64, 2013.

D. Einhorn, G.M. Reaven, R. H. Cobin et al., "American College of Endocrinology position statement on the insulin resistance syndrome," *Endocrine Practice*, vol. 9, no. 3, pp. 237–252, 2003

DeLean A, Munson PJ & Rodbard D Simultaneous analysis of families of sigmoidal curves: application to bioassay, radioligand assay, and physiological dose-response curves" *American Journal of Physiology* 235 E97–E102, 1978.

Després JP¹, Lemieux I, Bergeron J, Pibarot P, Mathieu P, Larose E, Rodés-Cabau J, Bertrand OF, Poirier P. Abdominal obesity and the metabolic syndrome:

contribution to global cardiometabolic risk” *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 28(6):1039-49, 2008.

Dhanvantari S, Izzo A, Jansen E & Brubaker PL Coregulation of glucagon-like peptide-1 synthesis with proglucagon and prohormone convertase 1 gene expression in enteroendocrine GLUTag cells” *Endocrinology* 142 37-42, 2001.

Dodd GT, Decherf S, Loh K et al. Leptin and insulin act on POMC neurons to promote the browning of white fat. *Cell* 2015; 160: 88–104.

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”. *J Clin Invest* 115:1343–1351, 2005.

Duffaut, C., Galitzky, J., Lafontan, M. & Bouloumie, A. Unexpected trafficking of immune cells within the adipose tissue during the onset of obesity. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 384, 482–485, 2009.

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. *J. Biol. Chem.* 280, 29971–29979, 2005.

Duran-Sandoval D, Mautino G, Martin G, Percevault F, Barbier O, Fruchart JC, Kuipers F, Staels B. Glucose regulates the expression of the farnesoid X receptor in liver. *Diabetes* 53, 890–898, 2004.

Eggink HM, Soeters MR, Pols TWH. TGR5 ligands as potential therapeutics in inflammatory diseases. *Int. J. Interferon Cytokine Mediator Res.* 6: 27-38, 2014.

Eijkelenboom, A., Burgering, B.M., 2013. FOXOs: signalling integrators for homeostasis maintenance. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 14:83e97

Elsen M, Raschke S, Tennagels N, Schwahn U, Jelenik T, Roden M, Romacho T, Eckel J BMP4 and BMP7 induce the white-to-brown transition of primary human adipose stem cells. *Am J Physiol Cell Physiol.* 306(5):C431-40, 2014.

Fang S, Suh JM, Reilly SM, Yu E, Osborn O, Lackey D, Yoshihara E, Perino A, Jacinto S, Lukasheva Y, Atkins AR, Khvat A, Schnabl B, Yu RT, Brenner DA, Coulter S, Liddle C, Schoonjans K, Olefsky JM, Saltiel AR, Downes M, Evans RM. Fang S, Suh JM, Reilly SM, Yu E, Osborn O, Lackey D, Yoshihara E, Perino A, Jacinto S, Lukasheva Y, et al. Intestinal FXR agonism promotes adipose tissue browning and reduces obesity and insulin resistance. *Nature Medicine* 21 159-165, 2015.

Farmer, S.R., Transcriptional control of adipocyte formation. *Cell Metab.* 4 (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.

Ferrante Jr AW. Macrophages, fat, and the emergence of immunometabolism. *J Clin Invest.* 123:4992-4993, 2013.

Filippi S, Vignozzi L, Morelli A, Chavalmane AK, Sarchielli E, Fibbi B, Saad F, Sandner P, Ruggiano P, Vannelli GB, et al. Testosterone partially ameliorates metabolic profile and erectile responsiveness to PDE5 inhibitors in an animal model of male metabolic syndrome. *Journal of Sexual Medicine* 6 3274-3288, 2009.

Fonseca-Alaniz MH, Takada J, Alonso-Vale MI, Lima FB. Il tessuto adiposo come centro regolatore del metabolismo. *Arq Bras Endocrinol Metabol.* 50: 216-29, 2006.

Fontana L, Eagon JC, Trujillo ME, et al. Visceral fat adipokine secretion is associated with systemic inflammation in obese humans. *Diabetes*;56:1010-3, 2007.

Forner, F., Kumar, C., Luber, C. A., Fromme, T., Klingenspor, M., and Mann, M.. Proteome differences between brown and white fat mitochondria reveal specialized metabolic functions. *Cell Metab.* 10, 324–335, 2009.

Frayn KN1 Adipose tissue as a buffer for daily lipid flux. *Diabetologia*45(9):1201-10, 2002.

Fromme T, Kleigrewe K, Dunkel A, Retzler A, Li Y, Maurer S, Fischer N, Diezko R, Kanzleiter T, Hirschberg V, Hofmann T, Klingenspor M. Degradation of brown adipocyte purine nucleotides regulates uncoupling protein 1 activity. *Molecular Metabolism* 8 77-85, 2018.

Fuest, M., Willim, K., MacNelly, S., Fellner, N., Resch, G.P., Blum, H.E., et al., 2012. The transcription factor c-Jun protects against sustained hepatic endoplasmic reticulum stress thereby promoting hepatocyte survival. *Hepatology* 55:408e418.

Furukawa S., Fujita T., Shimabukuro M., Iwaki M., Yamada Y., Nakajima Y., Nakayama O., Makishima M., Matsuda M., Shimomura I., Increased oxidative stress in obesity and its impact on metabolic syndrome, *J. Clin. Invest.* 114 1752–1761, 2004.

Gao CL, Zhu C, Zhao YP, Chen XH, Ji CB, Zhang CM, Zhu JG, Xia ZK, Tong ML & Guo XR Mitochondrial dysfunction is induced by high levels of glucose and free fatty acids in 3T3-L1 adipocytes. *Molecular and Cellular Endocrinology* 320 25-33, 2010.

Garcia RA, Roemmich JE, Claycombe KJ. Evaluation of markers of beige adipocytes in white adipose tissue of the mouse. *Nutr Metab* 13: 24, 2016.

Gioiello A, Macchiarulo A, Carotti A, Filippini P, Costantino G, Rizzo G, Adorini L, and Pellicciari R Extending SAR of bile acids as FXR ligands: discovery of 23-N-(carbocinnamyloxy)-3a,7a-dihydroxy-6a-ethyl-24-nor-5b-cholan-23-amine. *Bioorg Med Chem* 19:2650–2658, 2011.

Goodwin B, Jones SA, Price RR, Watson MA, McKee DD, Moore LB, Galardi C, Wilson JG, Lewis MC, Roth ME, Maloney PR, Willson TM, Kliewer SA. A regulatory cascade of the nuclear receptors FXR, SHP-1, and LRH-1 represses bile acid biosynthesis. *Mol. Cell* 6, 517–526, 2000.

Goto T, Lee JY, Teraminami A, Kim YI, Hirai S, Uemura T, Inoue H, Takahashi N & Kawada T Activation of peroxisome proliferator-activated receptor- α stimulates both differentiation and fatty acid oxidation in adipocytes. *Journal of Lipid Research* 52 873-884, 2011.

Govers R Molecular mechanisms of GLUT4 regulation in adipocytes. *Diabetes and Metabolism* 40 400-410, 2014.

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

Gray, S.L., Dalla Nora, E., Vidal-Puig, A.J., Mouse models of PPAR- deficiency: dissecting PPAR's role in metabolic homeostasis. *Biochem. Soc. Trans.* 33, 1053–1058, 2005.

Guimaraes-Camboa, N., and Evans, S. M. Are perivascular adipocyte progenitors mural cells or adventitial fibroblasts? *Cell Stem Cell* 20, 587–589, 2017.

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.

Haas B, Mayer P, Jennissen K, Scholz D, Berriel Diaz M, Bloch W, Herzig S, Fässler R & Pfeifer A Protein kinase G controls brown fat cell differentiation and mitochondrial biogenesis. *Science Signaling* 2 ra78, 2009.

Haffner S. M., Valdez R. A., Hazuda H. P., Mitchell B. D., Morales P. A., and Stern M. P., "Prospective analysis of the insulin resistance syndrome (Syndrome X)," *Diabetes*, vol. 41, no. 6, pp. 715–722, 1992.

Hageman J, Herrema H, Groen AK & Kuipers F A role of the bile salt receptor FXR in atherosclerosis. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology* 30 1519-1528, 2010.

Halberg N, Khan T, Trujillo ME et al. Hypoxia-inducible factor 1alpha induces fibrosis and insulin resistance in white adipose tissue. *Molecular and Cellular Biology*; 29: 4467–4483, 2009.

Hales K.G., Fuller M.T., Developmentally regulated mitochondrial fusion mediated by a conserved, novel, predicted GTPase, *Cell* 90 121–129, 1997.

Hales K.G., The machinery of mitochondrial fusion, division, and distribution, and emerging connections to apoptosis, *Mitochondrion* 4 285–308, 2004.

Hanniman, E.A. et al. Loss of functional farnesoid X receptor increases atherosclerotic lesions in apolipoprotein E-deficient mice. *J. Lipid Res.* 46, 2595–2604, 2005.

Harms M., Seale P. Brown and beige fat: development, function and therapeutic potential. *Nat. Med.* 19, 1252–1263, 2013.

Hayakawa, J., Mittal, S., Wang, Y., Korkmaz, K.S., Adamson, E., English, C., et al., 2004. Identification of promoters bound by c-Jun/ATF2 during rapid large-scale gene activation following genotoxic stress. *Molecular Cell* 16: 521e535.

He F, Li J, Mu Y, Kuruba R, Ma Z, Wilson A, Alber S, Jiang Y, Stevens T, Watkins S, et al. Downregulation of endothelin-1 by farnesoid X receptor in vascular endothelial cells. *Circulation Research* 98 192-199, 2006.

Heinonen S, Buzkova J, Muniandy M, Kaksonen R, Ollikainen M, Ismail K, Hakkarainen A, Lundbom J, Lundbom N, Vuolteenaho K, Moilanen E, Kaprio J, Rissanen A, Suomalainen A, Pietiläinen KH Impaired Mitochondrial Biogenesis in Adipose Tissue in Acquired Obesity. *Diabetes*. 64(9):3135-45, 2015.

Hepler, C., and Gupta, R. K. The expanding problem of adipose depot remodeling and postnatal adipocyte progenitor recruitment. *Mol. Cell. Endocrinol.* 445, 95–108, 2017.

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.

Hoehn K, Marieb EN Anatomy & Physiology (3rd ed.). San Francisco, Calif.: Pearson/Benjamin Cummings” ISBN 978-0-8053-0094-9, 2008.

Hoffmann LS, Etzrodt J, Willkomm L, Sanyal A, Scheja L, Fischer AW, Stasch JP, Bloch W, Friebe A, Heeren J, et al. Stimulation of soluble guanylyl cyclase protects against obesity by recruiting brown adipose tissue. Nature Communications 6 7235, 2015.

Hoffstedt J, Arner E, Wahrenberg H et al. Regional impact of adipose tissue morphology on the metabolic profile in morbid obesity. Diabetologia; 53: 2496–2503, 2010.

Hojlund, Mitochondrial respiration is decreased in skeletal muscle of patients with type 2 diabetes, Diabetes 56 1592–1599 2007.

Hong, K. Y., Bae, H., Park, I., Park, D. Y., Kim, K. H., Kubota, Y., et al. Perilipin+ embryonic preadipocytes actively proliferate along growing vasculatures for adipose expansion. Development 142, 2623–2632, 2015.

Houstis N., E.D. Rosen, E.S. Lander, Reactive oxygen species have a causal role in multiple forms of insulin resistance, Nature 440 944–948, 2006.

Insel PA & Ostrom RS Forskolin as a tool for examining adenylyl cyclase expression, regulation, and G protein signaling. Cellular and Molecular Neurobiology 23 305-314, 2003.

Insull W, Jr: Clinical utility of bile acid sequestrants in the treatment of dyslipidemia: a scientific review. South Med J; 99: 257– 273, 2006.

International Diabetes Federation: The IDF consensus worldwide definition of the metabolic syndrome, <http://www.idf.org/metabolic-syndrome>, 2005

Ishibashi J, Seale P. Medicine. Beige can be slimming. Science.;328:1113–1114, 2010.

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.

Jiang, Y., Berry, D. C., Tang, W., and Graff, J. M. Independent stem cell lineages regulate adipose organogenesis and adipose homeostasis. *Cell Rep.* 9, 1007–1022, 2014.

John Y. L. Chiang. Bile Acid Metabolism and Signaling. *Compr Physiol. Physiol.* 3(3): 1191–1212, 2013.

Kakuma T, Wang ZW, Pan W, Unger RH, Zhou YT. Role of leptin in peroxisome proliferator-activated receptor gamma coactivator-1 expression. *Endocrinology* 2000; 141: 4576–4582.

Kanda T, Wakino S, Homma K, Yoshioka K, Tatematsu S, Hasegawa K, Takamatsu I, Sugano N, Hayashi K & Saruta T Rho-kinase as a molecular target for insulin resistance and hypertension. *FASEB Journal* 20 169-171, 2006.

Kaplan N.M., “The deadly quartet.Upper-body obesity, glucose intolerance, hypertriglyceridemia, and hypertension,” *Archives of Internal Medicine*, vol. 149, no. 7, pp. 1514–1520, 1989.

Kawamata Y, Fujii R, Hosoya M, Harada M, Yoshida H, Miwa M, Fukusumi S, Habata Y, Itoh T, Shintani Y, Hinuma S, Fujisawa Y, Fujino M. A G protein-coupled receptor responsive to bile acids. *J Biol Chem.* 278(11):9435–9440, 2003.

Kawano Y & Honda A Gene targeting in rabbits: single-step generation of knock-out rabbits by microinjection of CRISPR/Cas9 plasmids. *Methods in Molecular Biology* 1630 109-120, 2017.

Kawano Y, Cohen DE. Mechanisms of hepatic triglyceride accumulation in non-alcoholic fatty liver disease. *J Gastroenterol.*48:434-441, 2013.

Keitel, V. et al. The G-protein coupled bile salt receptor TGR5 is expressed in liver sinusoidal endothelial cells. *Hepatology* 45, 695–704, 2007.

Kelley DE, He J, Menshikova EV & Ritov VB Dysfunction of mitochondria in human skeletal muscle in type 2 diabetes. *Diabetes* 51 2944-2950, 2002.

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.

Kerr, T.A. et al. Loss of nuclear receptor SHP impairs but does not eliminate negative feedback regulation of bile acid synthesis. *Dev. Cell* 2, 713–720, 2002.

Kersten S. Mechanisms of nutritional and hormonal regulation of lipogenesis. *EMBO reports*.2:282–6, 2001.

Kiess W, Petzold S, Topfer M, et al. Adipocytes and adipose tissue. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab*.22:135–53, 2008.

Kim HY, Park SY, Lee MH, Rho JH, Oh YJ, Jung HU, Yoo SH, Jeong NY, Lee HJ, Suh S, et al. Hepatic STAMP2 alleviates high fat diet-induced hepatic steatosis and insulin resistance. *Journal of Hepatology* 63 477-485, 2015.

Kintscher, U. et al. T-lymphocyte infiltration in visceral adipose tissue: a primary event in adipose tissue inflammation and the development of obesity-mediated insulin resistance. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 28, 1304–1310, 2008.

Klaus S, Ely M, Encke D, Heldmaier G. Functional assessment of white and brown adipocyte development and energy metabolism in cell culture. Dissociation of terminal differentiation and thermogenesis in brown adipocytes. *Journal of cell science*. 1995;108(Pt 10):3171–3180.

Klingenspor M, Bast A, Bolze F, Li Y, Maurer S, Schweizer S, Willershäuser M & Fromme T Brown adipose tissue. In *Adipose Tissue Biology*, 2nd ed., pp 91–147. Ed ME Symonds. New York, NY, USA: Springer, 2017.

Klötting N, Fasshauer M, Dietrich A et al. Insulin-sensitive obesity. *American Journal of Physiology -Endocrinology and Metabolism* 299: E506–E515, 2010.

Koliaki C, Szendroedi J, Kaul K, et al. Adaptation of hepatic mitochondrial function in humans with non-alcoholic fatty liver is lost in steatohepatitis. *Cell Metab.*21:739-746, 2015.

Koutnikova, H., Cock, T.A., Watanabe, M., Houten, S.M., Champy, M.F., Dierich, A., Auwerx, J., Compensation by the muscle limits the metabolic consequences of lipodystrophy in PPAR Gamma hypomorphic mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 100, 14457–14462, 2003.

Koyama Y, Brenner DA. Liver inflammation and fibrosis. *J Clin Invest.*127:55-64, 2017.

Krampera M, Glennie S, Dyson J, Scott D, Laylor R, Simpson E & Dazzi F Bone marrow mesenchymal stem cells inhibit the response of naive and memory antigenspecific T cells to their cognate peptide. *Blood* 101 3722–3729, 2003.

Krebs M., M. Roden, Molecular mechanisms of lipid-induced insulin resistance in muscle, liver and vasculature, *Diabetes Obes. Metab.* 7 621–632, 2005.

Krenkel O & Tacke F Liver macrophages in tissue homeostasis and disease. *Nature Reviews Immunology* 17 306–321, 2017.

Kristina M. Utzschneider Steven E. Kahn The Role of Insulin Resistance in Nonalcoholic Fatty Liver Disease *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*, Volume 91, Issue 12, 1, Pages 4753–4761, 2006.

Kumar, D.P., Rajagopal, S., Mahavadi, S., et al. Activation of transmembrane bile acid receptor TGR5 stimulates insulin secretion in pancreatic β cells. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 427(3), 600-605, 2012.

Kylin E. Studien ueber das Hypertonie-Hyperglyca "mie- Hyperurika" miesyndrom. *Zentralblatt fuer Innere Medizin* 44 : 105-127, 1923.

Laclaustra M, Corella D, Ordovas JM. Metabolic syndrome pathophysiology: the role of adipose tissue. *Nutr Metab Cardiovasc Dis.*17:125–39, 2007.

Lambert, G. et al. The farnesoid X-receptor is an essential regulator of cholesterol homeostasis. *J. Biol. Chem.* 278, 2563–2570, 2003.

Lee J.Y., Takahashi N., Yasubuchi M., Kim Y.I., Hashizaki H., Kim M.J., Sakamoto T., Goto T., Kawada T., Triiodothyronine induces UCP-1 expression and mitochondrial biogenesis in human adipocytes, *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* 302 C463–C472, 2012.

Lefebvre P, Cariou B, Lien F, Kuipers F, Staels B Role of bile acids and bile acid receptors in metabolic regulation. *Physiol Rev*; 89: 147– 191, 2009.

Lefterova, M.I., Lazar, M.A., New developments in adipogenesis. *Trends Endocrinol. Metab.* 20 (3), 107–114, 2009.

Lei, K., Davis, R.J., JNK phosphorylation of Bim-related members of the Bcl2 family induces Bax-dependent apoptosis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 100:2432e2437, 2003.

Lepper, C., and Fan, C. M. Inducible lineage tracing of Pax7-descendant cells reveals embryonic origin of adult satellite cells. *Genesis* 48, 424–436, 2010.

Li J, Wilson A, Gao X, Kuruba R, Liu Y, Poloyac S, Pitt B, Xie W & Li S Coordinated regulation of dimethylarginine dimethylaminohydrolase-1 and cationic amino acid transporter-1 by farnesoid X receptor in mouse liver and kidney and its implication in the control of blood levels of asymmetric dimethylarginine. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics* 331 234–243, 2009.

Li YT, Swales KE, Thomas GJ, Warner TD, Bishop-Bailey D Farnesoid x receptor ligands inhibit vascular smooth muscle cell inflammation and migration. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.*27(12):2606-11, 2007.

Libby P, Okamoto Y, Rocha VZ, et al. Inflammation in atherosclerosis: transition from theory to practice. *Circ J* 74:213-20, 2010.

Liesa M & Shirihai OS Mitochondrial dynamics in the regulation of nutrient utilization and energy expenditure. *Cell Metabolism* 17 491–506, 2013.

Livak KJ & Schmittgen TD Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-delta delta C(T)) method. *Methods* 25 402–408, 2001.

Lowell B.B., G.I. Shulman, Mitochondrial dysfunction and type 2 diabetes, *Science* (New York, N.Y.) 307 384–387, 2005.

Lumeng CN, Bodzin JL, Saltiel AR. Obesity induces a phenotypic switch in adipose tissue macrophage polarization. *J Clin Invest.*117:175–84, 2007.

Lumeng CN, Deyoung SM, Bodzin JL, Saltiel AR. Increased inflammatory properties of adipose tissue macrophages recruited during diet-induced obesity. *Diabetes*;56:16–23, 2007a.

Ma K, Saha PK, Chan L, Moore DD. Farnesoid X receptor is essential for normal glucose homeostasis. *J Clin Invest.*;116(4):1102-9, 2006.

Makishima, M. et al. Identification of nuclear receptors for bile acids. *Science* 284, 1362–1365, 1999.

Maneschi E, Cellai I, Aversa A, Mello T, Filippi S, Comeglio P, Bani D, Guasti D, Sarchielli E, Salvatore G, et al. Tadalafil reduces visceral adipose tissue accumulation by promoting preadipocytes differentiation towards a metabolically healthy phenotype: studies in rabbits. *Molecular and Cellular Endocrinology* 424 50–70, 2016.

Maneschi E, Morelli A, Filippi S, Cellai I, Comeglio P, Mazzanti B, Mello T, Calcagno A, Sarchielli E, Vignozzi L, et al. Testosterone treatment improves metabolic syndrome-induced adipose tissue derangements. *Journal of Endocrinology* 215 347–362, 2012.

Maneschi E, Vignozzi L, Morelli A, Mello T, Filippi S, Cellai I, Comeglio P, Sarchielli E, Calcagno A, Mazzanti B, Vettor R, Vannelli GB, Adorini L, Maggi M. FXR activation normalizes insulin sensitivity in visceral preadipocytes of a rabbit model of MetS. *Journal of Endocrinology* 218 215–231, 2013.

Marchesini G, Brizi M, Morselli-Labate AM, Bianchi G, Bugianesi E, McCullough AJ et al Association of nonalcoholic fatty liver disease with insulin resistance. *Am J Med* 107:450–455, 1999.

Marcinkiewicz A, Gauthier D, Garcia A, Brasaemle DL The phosphorylation of serine 492 of perilipin a directs lipid droplet fragmentation and dispersion *J Biol Chem*. 2006 Apr 28;281(17):11901-9. Epub 2006 Feb 17, 2006.

Marra F, Svegliati-Baroni G. Lipotoxicity and the gut-liver axis in NASH pathogenesis. *J Hepatol*.68:280-295, 2018.

Maruyama T, Miyamoto Y, Nakamura T, Tamai Y, Okada H, Sugiyama E, Itadani H, Tanaka K. Identification of membrane-type receptor for bile acids (M-BAR). *Biochem Biophys Res Commun*. 298(5):714–719, 2002.

Mason RR & Watt MJ Unraveling the roles of PLIN5: linking cell biology to physiology. *Trends in Endocrinology and Metabolism* 26 144–152, 2015.

McMahan RH1, Wang XX, Cheng LL, Krisko T, Smith M, El Kasmi K, Pruzanski M, Adorini L, Golden-Mason L, Levi M, Rosen Bile acid receptor activation modulates hepatic monocyte activity and improves nonalcoholic fatty liver disease. *Journal of Biological Chemistry* 288 11761–11770, 2013.

Mitschke MM, Hoffmann LS, Gnad T, Scholz D, Kruithoff K, Mayer P, Haas B, Sassmann A, Pfeifer A & Kilic A Increased cGMP promotes healthy expansion and browning of white adipose tissue. *FASEB Journal* 27 1621–1630, 2013.

Miyazaki-Anzai S, Levi M, Kratzer A, Ting TC, Lewis LB & Miyazaki M Farnesoid X receptor activation prevents the development of vascular calcification in ApoE^{-/-} mice with chronic kidney disease. *Circulation Research* 106 1807–1817, 2010.

Miyoshi H, Perfield JW, Souza SC, Shen WJ, Zhang HH, Stancheva ZS, Kraemer FB, Obin MS, Greenberg AS Control of adipose triglyceride lipase action by serine 517 of perilipin A globally regulates protein kinase A-stimulated lipolysis in adipocytes” *J Biol Chem*. 2007 Jan 12;282(2):996-1002, 2007.

Modica S, Straub LG, Balaz M et al. BMP4 promotes a brown to white-like adipocyte switch. *Cell Rep* 16: 2243–2258, 2016.

Mootha V.K., Lindgren C.M., Eriksson K.F., Subramanian A., Sihag S., Lehar J., Puigserver P., Carlsson E., Ridderstrale M., Laurila E., Houstis N., Daly M.J., Patterson N., Mesirov J.P., T.R. Golub, P. Tamayo, B. Spiegelman, E.S. Lander, J.N. Hirschhorn, D. Altshuler, L.C. Groop, PGC-1alpha-responsive genes involved in oxidative phosphorylation are coordinately downregulated in human diabetes, *Nat. Genet.* 34 267–273, 2003.

Morelli A1, Vignozzi L, Maggi M, Adorini L. Farnesoid X receptor activation improves erectile dysfunction in models of metabolic syndrome and diabetes. *Biochim Biophys Acta.* Aug;1812(8):859-66, 2011.

Morino K, Petersen KF, Dufour S, Befroy D, Frattini J, Shatzkes N, Neschen S, White MF, Bilz S, Sono S, Pypaert M, Shulman GI. Reduced mitochondrial density and increased IRS-1 serine phosphorylation in muscle of insulin-resistant offspring of type 2 diabetic parents. *J Clin Invest.*115(12):3587-93, 2005.

Mulder H., Ling C., Mitochondrial dysfunction in pancreatic beta-cells in Type 2 diabetes, *Mol. Cell. Endocrinol.* 297 34–40, 2009.

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.

Nakamura T1, Tokunaga K, Shimomura I, Nishida M, Yoshida S, Kotani K, Islam AH, Keno Y, Kobatake T, Nagai Y, et al. Contribution of visceral fat accumulation to the development of coronary artery disease in non-obese men. *Atherosclerosis*; 107:239-46, 1994.

Nedergaard, J., Bengtsson, T., and Cannon, B. Unexpected evidence for active brown adipose tissue in adult humans. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* 293, E444–E452, 2007

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; 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*. 2015 Mar 14;385(9972):956-65, 2015.

Neuschwander-Tetri BA. Hepatic lipotoxicity and the pathogenesis of nonalcoholic steatohepatitis: the central role of nontriglyceride fatty acid metabolites. *Hepatology*.52:774-788, 2010.

Nevens F, Andreone P, Mazzella G, Strasser SI, Bowlus C, Invernizzi P, Drenth JP, Pockros PJ, Regula J, Beuers U, Trauner M, Jones DE, Floreani A, Hohenester S, Luketic V, Shiffman M, van Erpecum KJ, Vargas V, Vincent C, Hirschfield GM, Shah H, Hansen B, Lindor KD, Marschall HU, Kowdley KV, Hooshmand-Rad R, Marmon T, Sheeron S, Pencek R, MacConell L, Pruzanski M, Shapiro D; POISE Study Group. A Placebo-Controlled Trial of Obeticholic Acid in Primary Biliary Cholangitis *N Engl J Med*. 375(7):631-43, 2016.

Newmeyer DD & Ferguson-Miller S Mitochondria: releasing power for life and unleashing the machineries of death. *Cell* 112 481–490, 2003.

Nguyen A, Bouscarel B. Bile acids and signal transduction: role in glucose homeostasis. *Cell Signal* 20, 2180–2197, 2008.

Nguyen TB, Louie SM, Daniele JR, Tran Q, Dillin A, Zoncu R, Nomura DK & Olzmann JA DGAT1-dependent lipid droplet biogenesis protects mitochondrial function during starvation-induced autophagy. *Developmental Cell* 42 9–21, 2017.

Nicholls, D.G. and Locke, R.M. Thermogenic mechanisms in brown fat. *Physiol. Rev.* 64, 1–64, 1984.

Obregon MJ. Changing white into brite adipocytes. Focus on "BMP4 and BMP7 induce the white-to-brown transition of primary human adipose stem cells. *Am J Physiol Cell Physiol.* 306(5):C425-7, 2014.

Odegaard JI, Ricardo-Gonzalez RR, Goforth MH, Morel CR, Subramanian V, Mukundan L, Red Eagle A, Vats D, Brombacher F, Ferrante AW, Chawla A. Macrophage-specific PPAR γ controls alternative activation and improves insulin resistance. *Nature* 447, 1116–1120, 2007.

Ohno H, Shinoda K, Spiegelman BM, Kajimura S. PPAR γ agonists Induce a White-to-Brown Fat Conversion through Stabilization of PRDM16 Protein. *Cell metabolism.* 15:395–404, 2012.

Okla M, Ha JH, Temei RE, Chung S. BMP7 drives human adipogenic stem cells into metabolically active beige adipocytes. *Lipids*; 50: 111–120, 2015.

Osuga J, Ishibashi S, Oka T, Yagyu H, Tozawa R, Fujimoto A, Shionoiri F, Yahagi N, Kraemer FB, Tsutsumi O, Yamada N. Targeted disruption of hormone-sensitive lipase results in male sterility and adipocyte hypertrophy, but not in obesity. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 97(2):787-92, 2000.

Ottaviani E, Malagoli D, Franceschi C. The evolution of the adipose tissue: a neglected enigma. *Gen Comp Endocrinol* 174: 1-4, 2011.

Otte K, Kranz H, Kober I, Thompson P, Hoefler M, Haubold B, Remmel B, Voss H, Kaiser C, Albers M, Cheruvallath Z, Jackson D, Casari G, Koegl M, Pääbo S, Mous J, Kremoser C, Deuschle U. Identification of farnesoid X receptor b as a novel mammalian nuclear receptor sensing lanosterol. *Mol. Cell. Biol.* 23, 864–872, 2003.

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

Ouchi N, Parker JL, Lugus JJ, Walsh K. Adipokines in inflammation and metabolic disease. *Nat Rev Immunol.*11:85-97, 2011.

Park, J. H., Kang, H. J., Kang, S. I., Lee, J. E., Hur, J., Ge, K., et al. A multifunctional protein, EWS, is essential for early brown fat lineage determination. *Dev. Cell* 26, 393–404, 2013.

Parks DJ, Blanchard SG, Bledsoe RK, Chandra G, Consler TG, Kliewer SA, Stimmel JB, Willson TM, Zavacki AM, Moore DD, Lehmann JM. Bile acids: natural ligands for orphan nuclear receptors. *Science* 284, 1365–1368, 1999.

Pathak P, Liu H, Boehme S, Xie C, Krausz KW, Gonzalez F & Chiang JYL Farnesoid X receptor induces Takeda G-protein receptor 5 crosstalk to regulate bile acid synthesis and hepatic metabolism. *Journal of Biological Chemistry* 292 11055–11069, 2017.

Pellicciari R, Costantino G, Camaioni E, Sadeghpour BM, Entrena A, Willson TM, Fiorucci S, Clerici C, and Gioiello A Bile acid derivatives as ligands of the farnesoid X receptor. Synthesis, evaluation, and structure-activity relationship of a series of body and side chain modified analogues of chenodeoxycholic acid. *J Med Chem* 47:4559–4569, 2004.

Pellicciari R, Fiorucci S, Camaioni E, Clerici C, Costantino G, Maloney PR, Morelli A, Parks DJ, and Willson TM 6 α -ethyl-chenodeoxycholic acid (6-ECDCA), a potent and selective FXR agonist endowed with anticholestatic activity. *J Med Chem* 45:3569–3572, 2002.

Pellicciari R, Gioiello A, Sabbatini P, Venturoni F, Nuti R, Colliva C, Rizzo G, Adorini L, Pruzanski M, Roda A, Macchiarulo A. Avicholic acid: a lead compound from birds on the route to potent TGR5 modulators. *ACS Med. Chem. Lett.* 3:273–277, 2012.

Pellicciari R1, Gioiello A, Macchiarulo A, Thomas C, Rosatelli E, Natalini B, Sardella R, Pruzanski M, Roda A, Pastorini E, Schoonjans K, Auwerx J. Discovery of 6 α -ethyl-23 (S)-methylcholic acid (S-EMCA, INT-777) as a potent and selective agonist for the TGR5 receptor, a novel target for diabetes. *J Med Chem* 52:7958–7961, 2009.

Pellicciari, R., Costantino, G. & Fiorucci, S. Farnesoid X receptor: from structure to potential clinical applications. *J. Med. Chem.* 48, 5383–5403, 2005.

Petersen MC & Shulman GI Roles of diacylglycerols and ceramides in hepatic insulin resistance. *Trends in Pharmacological Sciences* 38 649–665, 2017.

Petrovic N, Walden TB, Shabalina IG, Timmons JA, Cannon B, Nedergaard J. Chronic peroxisome proliferator-activated receptor gamma (PPARgamma) activation of epididymally derived white adipocyte cultures reveals a population of thermogenically competent, UCP1-containing adipocytes molecularly distinct from classic brown adipocytes. *The Journal of biological chemistry.* 285:7153–7164, 2010.

Pfeifer, A., and Hoffmann, L. S. Brown, beige, and white: the new color code of fat and its pharmacological implications. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 55, 207–227, 2015.

Pierantonelli I, Svegliati-Baroni G,. Nonalcoholic fatty liver disease: basic pathogenetic mechanisms in the progression from NAFLD to NASH. *Transplantation.* 2018

Pols, T.W.H., Nomura, M., Harach, T., et al. TGR5 activation inhibits atherosclerosis by reducing macrophage inflammation and lipid loading. *Cell Metabolism* 14, 747-757, 2011.

Porter SA, Massaro JM, Hoffmann U, Vasan RS, O'Donnel CJ, Fox CS Abdominal subcutaneous adipose tissue: a protective fat depot?". *Diabetes Care.* 32 (6): 1068–75, 2009.

Postic C, Girard J Contribution of de novo fatty acid synthesis to hepatic steatosis and insulin resistance: lessons from genetically engineered mice. *J Clin Invest* 118:829–838, 2008.

Putcha GV1, Le S, Frank S, Besirli CG, Clark K, Chu B, Alix S, Youle RJ, LaMarche A, Maroney AC, Johnson EM Jr. JNK-mediated BIM phosphorylation potentiates BAX-dependent apoptosis. *Neuron.* 38(6):899-914, 2003.

Rapizzi E, Fucci R, Giannoni E, Canu L, Richter S, Cirri P & Mannelli M Role of microenvironment on neuroblastoma SK-N-AS SDHBSilenced cell metabolism and function. *Endocrine-Related Cancer* 22 409–417, 2015.

Razak F., S.S. Anand, Impaired mitochondrial activity in the insulin-resistant offspring of patients with type 2 diabetes. Petersen KF, Dufour S, Befroy D, Garcia R, Shulman GI. *N Engl J Med* 350: 664-71, *Vasc. Med.* 9 223–224.87–3593, 2004.

Reaven G. M., “Role of insulin resistance in human disease,” *Diabetes*, vol. 37, no. 12, pp. 1595–1607, 1988.

Ren J, Pulakat L, Whaley-Connell A, Sowers JR. Mitochondrial biogenesis in the metabolic syndrome and cardiovascular disease. *J Mol Med (Berl)*. 88(10):993-1001, 2010.

Rezai-Zadeh K, Yu S, Jiang Y et al. Leptin receptor neurons in the dorsomedial hypothalamus are key regulators of energy expenditure and body weight, but not food intake. *Mol Metab*; 3: 681–693, 2014.

Richard, D. and Picard, F. Brown fat biology and thermogenesis. *Front. Biosci.* 16, 1233–1260, 2011.

Rizzo G1, 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. *Mol Pharmacol.* Oct;78(4):617-30, 2010.

Rosen, E.D., Hsu, C.H., Wang, X., Sakai, S., Freeman, M.W., Gonzalez, F.J., Spiegelman, B.M. C/EBPalpha induces adipogenesis through PPARgamma: a unified pathway. *Genes Dev.* 16, 22–26, 2002.

Rousset S, Alves-Guerra MC, Mozo J, Miroux B, Cassard-Doulcier AM, Bouillaud F & Ricquier D The biology of mitochondrial uncoupling proteins. *Diabetes* 53 S130–S135, 2004.

Rutkowski JM, Davis KE, Scherer PE. Mechanisms of obesity and related pathologies: the macro- and microcirculation of adipose tissue. *FEBS J.* 276: 5738–46, 2009.

Sabio, G., Cavanagh-Kyros, J., Barrett, T., Jung, D.Y., Ko, H.J., Ong, H., et al. Role of the hypothalamic-pituitary-thyroid axis in metabolic regulation by JNK1. *Genes & Development* 24:256e264, 2010.

Sanchez-Gurmaches, J., and Guertin, D. A. Adipocytes arise from multiple lineages that are heterogeneously and dynamically distributed. *Nat. Commun.* 5:4099, 2014.

Sanders FW, Griffin JL. De novo lipogenesis in the liver in health and disease: more than just a shunting yard for glucose. *Biol Rev Camb Philos Soc.* 91:452-468, 2016.

Sartipy P1, Loskutoff DJ Monocyte chemoattractant protein 1 in obesity and insulin resistance. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 100(12):7265-70, 2003.

Sayiner M, Koenig A, Henry L, Younossi ZM. Epidemiology of Nonalcoholic Fatty Liver Disease and Nonalcoholic Steatohepatitis in the United States and the Rest of the World. *Clin Liver Dis.* 20:205-214, 2016.

Schindelin J, Arganda-Carreras I, Frise E, Kaynig V, Longair M, Pietzsch T, Preibisch S, Rueden C, Saalfeld S, Schmid B, Tinevez JY, White DJ, Hartenstein V, Eliceiri K, Tomancak P, Cardona A. Fiji: an open-source platform for biological-image analysis. *Nature Methods* 9 676–682, 2012.

Schipper HS, Prakken B, Kalkhoven E, Boes M. Adipose tissue-resident immune cells: key players in immunometabolism. *Trends Endocrinol Metab.* 23:407–15, 2012.

Schrauwen-Hinderling V.B., Roden M., Kooi M.E., Hesselink M.K., Schrauwen P., Muscular mitochondrial dysfunction and type 2 diabetes mellitus, *Curr. Opin. Clin. Nutr. Metab. Care* 10 698–703, 2007.

Schweiger M, Schreiber R, Haemmerle G, et al. Adipose triglyceride lipase and hormonesensitive lipase are the major enzymes in adipose tissue triacylglycerol catabolism. *J Biol Chem.* 281:40236-40241, 2006.

Seale P. Transcriptional regulatory circuits controlling brown fat development and activation. *Diabetes* 64: 2369–2375, 2015.

Seale, P., Bjork, B., Yang, W. L., Kajimura, S., Chin, S., Kuang, S. H., et al. PRDM16 controls a brown fat/skeletal muscle switch. *Nature* 454, 961–967, 2008.

Sethi JK, Vidal-Puig AJ. Thematic review series: adipocyte biology. Adipose tissue function and plasticity orchestrate nutritional adaptation. *J Lipid Res*; 48:1253–62, 2007.

Shaukat, Z., Liu, D., Hussain, R., Khan, M., Gregory, S.L., 2015. The role of JNK signalling in responses to oxidative DNA damage. *Current Drug Targets* 17:154e163.

Shimizu I, Aprahamian T, Kikuchi R, Shimizu A, Papanicolaou KN, MacLauchlan S, Maruyama S, Walsh K. Vascular rarefaction mediates whitening of brown fat in obesity. *J. Clin. Invest.* 124, 2099–2112, 2014.

Shoelson, S. E., Lee, J. & Goldfine, A. B. Inflammation and insulin resistance. *J. Clin. Invest.* 116, 1793–1801, 2006.

Smith SM, Vale WW. The role of hypothalamic–pituitaryadrenal axis in neuroendocrine responses to stress. *Dialogues Clin Neurosci* 8: 383–395, 2006.

Solinas G1, Vilcu C, Neels JG, Bandyopadhyay GK, Luo JL, Naugler W, Grivennikov S, Wynshaw-Boris A, Scadeng M, Olefsky JM, Karin M. JNK1 in hematopoietically derived cells contributes to diet-induced inflammation and insulin resistance without affecting obesity. *Cell Metabolism* 6:386e397, 2007.

Solinas, G., Karin, M., JNK1 and IKKbeta: molecular links between obesity and metabolic dysfunction. *FASEB Journal* 24:2596e2611, 2010.

Spalding KL, Arner E, Westermark PO et al. Dynamics of fat cell turnover in humans. *Nature* 453: 783–787, 2008.

Spencer M, Unal R, Zhu B et al. Adipose tissue extracellular matrix and vascular abnormalities in obesity and insulin resistance. *Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism* 96: E1990-E1998, 2011.

Spengler EK, Loomba R. Recommendations for diagnosis, referral for liver biopsy, and treatment of nonalcoholic fatty liver disease and nonalcoholic steatohepatitis. *Mayo Clinic Proceedings*.90(9):1233–1246, 2015.

Stedman C1, Robertson G, Coulter S, Liddle C Feed-forward regulation of bile acid detoxification by CYP3A4: studies in humanized transgenic mice. *J. Biol. Chem.* 279, 11336–11343, 2004.

Stepanov V, Stankov K, Mikov M. The bile acid membrane receptor TGR5: a novel pharmacological target in metabolic, inflammatory and neoplastic disorders. *J. Recept. Signal Transduct. Res.* 33: 213-223, 2013.

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.

Subramanian S, Goodspeed L, Wang S, Kim J, Zeng L, Ioannou GN, Haigh WG, Yeh MM, Kowdley KV, O'Brien KD, Pennathur S, Chait A. Dietary cholesterol exacerbates hepatic steatosis and inflammation in obese LDL receptor-deficient mice. *J Lipid Res* 52:1626–1635, 2011.

Sun K, Tordjman J, Clement K, Scherer PE. Fibrosis and adipose tissue dysfunction. *Cell Metab.*18:470-477, 2013.

Sun, C., Berry, W. L., and Olson, L. E. PDGFR α controls the balance of stromal and adipogenic cells during adipose tissue organogenesis. *Development* 144, 83–94, 2017.

Sunny NE, Bril F, Cusi K. Mitochondrial Adaptation in Nonalcoholic Fatty Liver Disease: Novel Mechanisms and Treatment Strategies. *Trends Endocrinol Metab.*28:250-260, 2017.

Sunny NE1, Parks EJ, Browning JD, Burgess SC. Excessive hepatic mitochondrial TCA cycle and gluconeogenesis in humans with nonalcoholic fatty liver disease. *Cell Metab.* 14(6):804-10, 2011.

Tacke F Targeting hepatic macrophages to treat liver diseases. *Journal of Hepatology* 66 1300–1312, 2017.

Thomas C, Gioiello A, Noriega L, Strehle A, Oury J, Rizzo G, Macchiarulo A, Yamamoto H, Matakı C, Pruzanski M, Pellicciari R, Auwerx J, Schoonjans K. Il rilevamento degli acidi biliari mediato da TGR5 controlla l'omeostasi del glucosio. *Cell Metabolism* 10, 167-177, 2009.

Thomas C, Pellicciari R, Pruzanski M, Auwerx J, Schoonjans K. Targeting bile-acid signalling for metabolic diseases. *Nat. Rev. Drug Discov.* 7, 678–693, 2008.

Tiemessen MM1, Jagger AL, Evans HG, van Herwijnen MJ, John S, Taams LS. CD4+CD25+Foxp3+ regulatory T cells induce alternative activation of human monocytes/macrophages. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* 104, 19446–19451, 2007.

Toledo FG, Watkins S & Kelley DE Changes induced by physical activity and weight loss in the morphology of intermyofibrillar mitochondria in obese men and women. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* 91 3224–3227, 2006.

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

Trayhurn P. Hypoxia and adipose tissue function and dysfunction in obesity. *Physiological Reviews* 93: 1–21, 2013.

Unger RH, Clark GO, Schener PE, Orei L. Lipid homeostasis, lipotoxicity and the metabolic syndrome. *Biochim Biophys Acta* 1801 209-14, 2010. [Review]

Vague J., "Sexual differentiation. A factor affecting the forms of obesity," *Presse Medicale*, vol. 30, pp. S39–S40, 1947.

van Marken Lichtenbelt WD, Vanhomerig JW, Smulders NM, Drossaerts JM, Kemerink GJ, Bouvy ND, Schrauwen P, Teule GJ. Cold-activated brown adipose tissue in healthy men. *N. Engl. J. Med.* 360, 1500–1508, 2009.

Van Rooyen DM, Larter CZ, Haigh WG, Yeh MM, Ioannou G, Kuver R, Lee SP, Teoh NC, Farrell GC. Hepatic free cholesterol accumulates in obese, diabetic mice and causes nonalcoholic steatohepatitis. *Gastroenterology* 141(1393–403):1403, 2011.

Vassileva G, Golovko A, Markowitz L, Abbondanzo SJ, Zeng M, Yang S, Hoos L, Tetzloff G, Levitan D, Murgolo NJ, Keane K, Davis HR Jr, Hedrick J, Gustafson EL. Targeted deletion of Gpbar1 protects mice from cholesterol gallstone formation. *Biochem J.* 15;398(3):423-30, 2006.

Vatner DF, Majumdar SK, Kumashiro N, et al. Insulin-independent regulation of hepatic triglyceride synthesis by fatty acids. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 112:1143-1148, 2015.

Vernia S, Cavanagh-Kyros J, Garcia-Haro L, Sabio G, Barrett T, Jung DY, Kim JK, Xu J, Shulha HP, Garber M, Gao G, Davis R The PPARalpha-FGF21 hormone axis contributes to metabolic regulation by the hepatic JNK signaling pathway. *Cell Metabolism* 20:512e525, 2014.

Vienberg S, Geiger J, Madsen S, Dalgaard LT 2 . MicroRNA nel metabolismo. *Acta Physiol (Oxf).* 219 (2): 346-361, 2017.

Vignozzi L, Morelli A, Cellai I, Filippi S, Comeglio P, Sarchielli E, Maneschi E, Vannelli GB, Adorini L & Maggi M Cardiopulmonary protective effects of the selective FXR agonist obeticholic acid in the rat model of monocrotaline-induced pulmonary hypertension. *Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology* 165 277–292, 2017.

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. *J Sex Med.* 8(1):57-77, 2011.

Virtue S, Vidal-Puig A. Adipose tissue expandability, lipotoxicity and the Metabolic Syndrome – an allostatic perspective. *Biochim Biophys Acta* 1801:338–49, 2010.

Vishvanath L, MacPherson KA, Hepler C, Wang QA, Shao M, Spurgin SB, Wang MY, Kusminski CM, Morley TS, Gupta RK. Pdgfrbeta+ mural preadipocytes contribute to adipocyte hyperplasia induced by high-fat-diet feeding and prolonged cold exposure in adult mice. *Cell Metab.* 23, 350–359, 2016.

Wang H, Eckel RH. Lipoprotein lipase: from gene to obesity. *Am J Physiol Endocrinol Metab.* 297(2):E271-88, 2009

Wang QA, Tao C, Gupta RK, Scherer PE. Tracking adipogenesis during white adipose tissue development, expansion and regeneration. *Nat Med.* 19:1338-1344, 2013.

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 XX, Luo Y, Wang D, Adorini L, Pruzanski M, Dobrinskikh E & Levi M A dual agonist of farnesoid X receptor (FXR) and the G protein-coupled receptor TGR5, INT-767, reverses age-related kidney disease in mice. *Journal of Biological Chemistry* 292 12018–12024, 2017.

Wang Y.D., Chen W.D., Huang W., FXR, a target for different diseases in "Histology and Histopathology", 23(5):621-7, 2008.

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(5):1632-43, 2008.

Wang, H., Chen, J., Hollister, K., Sowers, L. C. & Forman, B. M. Endogenous bile acids are ligands for the nuclear receptor FXR/BAR. *Mol. Cell* 3, 543–553 1999.

Wang, Y., Dong, J., Liu, H.Y., Wang, D.Q., Tian, Y.P., Biochemical characteristics and risk factors in non-alcoholic fatty liver. *Front Biosci. (Elite Ed)* 2, 105–110, 2010.

Watanabe M, Houten SM, Wang L, Moschetta A, Mangelsdorf DJ, Heyman RA, Moore DD, Auwerx J. Bile acids lower triglyceride levels via a pathway involving FXR, SHP, and SREBP-1c. *J. Clin. Invest.* 113, 1408–1411, 2004.

Watanabe M1, Houten SM, Matakai C, Christoffolete MA, Kim BW, Sato H, Messaddeq N, Harney JW, Ezaki O, Kodama T, Schoonjans K, Bianco AC, Auwerx J. Bile acids induce energy expenditure by promoting intracellular thyroid hormone activation. *Nature* 439 484–489, 2006.

Weisberg SP, McCann D, Desai M, Rosenbaum M, Leibel RL, Ferrante Jr AW. Obesity is associated with macrophage accumulation in adipose tissue. *J Clin Invest* 112:1796-1808, 2003.

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.

Wellen, K. E. & Hotamisligil, G. S. Inflammation, stress, and diabetes. *J. Clin. Invest.* 115, 1111–1119, 2005.

Wendel AA, Purushotham A, Liu LF, Belury MA. Conjugated linoleic acid induces uncoupling protein 1 in white adipose tissue of ob/ob mice. *Lipids* 2009; 44: 975–982.

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

Wu J, Bostrom P, Sparks LM, Ye L, Choi JH, Giang AH, Khandekar M, Virtanen KA, Nuutila P, Schaart G, et al. Beige adipocytes are a distinct type of thermogenic fat cell in mouse and human. *Cell*. 150:366–376, 2012.

Wynn TA & Ramalingam TR Mechanisms of fibrosis: therapeutic translation for fibrotic disease. *Nature Medicine* 18 1028–1040, 2012.

Wynne K, Stanley S, McGowan B, Bloom S. Appetite control. *J Endocrinol* 184: 291–318, 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. *J. Clin. Invest.* 112, 1821–1830, 2003.

Xue B., Coulter A., Rim J.S., Koza R.A., Kozak L.P. Transcriptional synergy and the regulation of Ucp1 during brown adipocyte induction in white fat depots *Mol. Cell. Biol.* 25 8311–8322, 2005.

Xue R, Wan Y, Zhang S, Zhang Q, Ye H, Li Y. Role of bone morphogenetic protein 4 in the differentiation of brown fat-like adipocytes. *Am J Physiol Endocrinol Metab.* 306(4):E363-72, 2014.

Xue, B., Rim, J. S., Hogan, J. C., Coulter, A. A., Koza, R. A., and Kozak, L. P. Genetic variability affects the development of brown adipocytes in white fat but not in interscapular brown fat. *J. Lipid Res.* 48, 41–51, 2007.

Yamagata K1, 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. *J. Biol. Chem.* 279, 23158–23165, 2004.

Yesilova Z1, Yaman H, Oktenli C, Ozcan A, Uygun A, Cakir E, Sanisoglu SY, Erdil A, Ates Y, Aslan M, Musabak U, Erbil MK, Karaeren N, Dagalp K Systemic markers of lipid peroxidation and antioxidants in patients with nonalcoholic Fatty liver disease. *Am J Gastroenterol.* 100:850-855, 2005.

Youle R.J., van der Blik A.M., Mitochondrial fission, fusion, and stress, *Science* 337 1062–1065 2012.

Yusuf S, Hawken S, Ounpuu S, Bautista L, Franzosi MG, Commerford P, Lang CC, Rumboldt Z, Onen CL, Lisheng L, Tanomsup S, Wangai P Jr, Razak F, Sharma AM, Anand SS; INTERHEART Study Investigators “Obesity and the risk of myocardial infarction in 27,000 participants from 52 countries: a case-control study” *Lancet* 366(9497):1640-9, 2005.

Zannettino AC, Paton S, Arthur A, Khor F, Itescu S, Gimble JM & Gronthos S Multipotential human adipose-derived stromal stem cells exhibit a perivascular phenotype in vitro and in vivo. *Journal of Cellular Physiology* 214 413–421, 2008.

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

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. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 103, 1006–1011, 2006.

Zhang Y, Xie C, Wang H, Foss RM, Clare M, George EV, Li S, Katz A, Cheng H, Ding Y, Tang D, Reeves WH7, Yang LJ. Irisin exerts dual effects on browning and

adipogenesis of human white adipocytes. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 311: E530–E541, 2016.

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.

Zuk PA, Zhu M, Mizuno H, Huang J, Futrell JW, Katz AJ, Benhaim P, Lorenz HP & Hedrick MH Multilineage cells from human adipose tissue: implications for cell-based therapies. *Tissue Engineering* 7 211–228, 2001.