



UNIVERSITÀ  
DEGLI STUDI  
FIRENZE

## DOTTORATO DI RICERCA IN SCIENZE BIOMEDICHE

Curriculum: Biotecnologie Endocrinologiche, Molecolari e Rigenerative

CICLO XXXIII

COORDINATORE Prof. Fabrizio Chiti

### **Gli effetti del glucagone e degli agonisti del GLP-1R in un modello di precursori adiposi umani**

### **Effects of glucagon and GLP-1 receptor agonists on human adipose precursors**

Settore Scientifico Disciplinare MED/13

**Dottorando**

Dr.ssa Martina Trabucco

**Tutore**

Prof.ssa Michaela Luconi

**Coordinatore**

Prof. Fabrizio Chiti

Anni 2017/2020

<b>1. INTRODUZIONE .....</b>	<b>1</b>
1.1 Il tessuto adiposo.....	1
1.1.1 Il tessuto adiposo bianco .....	2
1.1.2 Il tessuto adiposo bruno.....	5
1.1.3 Metabolismo del tessuto adiposo .....	12
1.1.4 Il tessuto adiposo come organo endocrino .....	15
1.2 L'adipogenesi .....	22
1.2.1 Regolazione trascrizionale dell'adipogenesi .....	24
1.2.2 Regolazione extracellulare dell'adipogenesi .....	26
1.3 La cellula staminale .....	31
1.3.1 La cellula staminale mesenchimale .....	33
1.3.2 La cellula staminale adiposa.....	34
1.3.3 Origine del tessuto adiposo: determinazione di lineage .....	36
1.4 Disfunzioni metaboliche legate al tessuto adiposo .....	39
1.4.1 Obesità.....	39
1.4.2 Diabete mellito di tipo 2.....	43
1.5 Incretine .....	47
1.5.1 GIP e GLP-1 .....	47
1.5.2 Il recettore del GLP-1 .....	50
1.5.3 Agonisti del recettore del GLP-1.....	53
1.5.4 Effetti pleiotropici del GLP-1 e degli agonisti del GLP-1R.....	57
1.5.5 Ruolo delle incretine del processo di browning.....	61
1.6 Glucagone .....	63
1.6.1 Fisiopatologia .....	67
1.6.2 Co-agonismo GLP-1R/GcgR.....	69
<b>2. SCOPO DEL LAVORO.....</b>	<b>72</b>
<b>3. MATERIALI E METODI.....</b>	<b>74</b>
3.1 Materiali.....	74
3.2 Casistica .....	74
3.3 Isolamento e coltura di cellule staminali umane adulte derivate da tessuto adiposo.....	75
3.4 Valutazione della proliferazione delle S-ASC .....	76
3.5 Differenziazione in vitro dei precursori adiposi .....	78
3.6 Analisi immunocitochimica mediante immunofluorescenza .....	79
3.7 Real Time Quantitative RT-PCR e Analisi TaqMan .....	79
3.8 Estrazione e determinazione del contenuto proteico.....	80

3.9 Elettroforesi monodimensionale su gel di poliacrilammide (SDS-PAGE) e analisi Western Blot.....	81
3.10 Analisi della funzionalità mitocondriale con Seahorse.....	82
3.11 Microscopia elettronica e trasmissione e morfometria mitocondriale.....	83
3.12 Analisi immunocitochimica mediante fluorescenza.....	83
3.13 Espressione di GCGR e GLP-1R mediante analisi immunocitofluorimetrica.....	84
3.14 Analisi statistica.....	84
<b>4. RISULTATI.....</b>	<b>85</b>
4.1 Effetto anti-proliferativo del glucagone sulle S-ASC.....	85
4.2 Effetto inibitorio del glucagone sull'adipogenesi in vitro.....	90
4.3 Espressione del GLP-1R e del GCGR nelle S-ASC.....	92
4.4 Interazione tra il GCGR e GLP-1R nel mediare gli effetti esercitati dal glucagone.....	94
4.5 Effetto inibitorio di glucagone, liraglutide e GLP-1 nativo sul differenziamento in vitro delle S-ASC.....	97
4.6 Differenziamento adipogenico bruno di B-ASC.....	101
4.7 Espressione di marcatori brite nelle S-ASC e B-ASC a confronto.....	104
4.8 Valutazione del processo di browning nelle S-ASC differenziate in presenza di glucagone, liraglutide e GLP-1.....	105
4.9 Effetto di glucagone, liraglutide e GLP-1 sulla respirazione mitocondriale.....	107
4.10 L'UCP-1 espressa dagli adipociti bruni differenziati in presenza di glucagone e liraglutide è attiva perché è in grado di disaccoppiare la respirazione mitocondriale.....	109
4.11 Alterazioni quantitative morfometriche dei mitocondri indotte da glucagone, liraglutide e GLP-1 nel corso di differenziamento adipocitario.....	110
<b>5. DISCUSSIONE.....</b>	<b>113</b>
<b>6. CONCLUSIONI.....</b>	<b>120</b>
<b>7. BIBLIOGRAFIA.....</b>	<b>121</b>
<b>8. PUBBLICAZIONI.....</b>	<b>144</b>

# 1. INTRODUZIONE

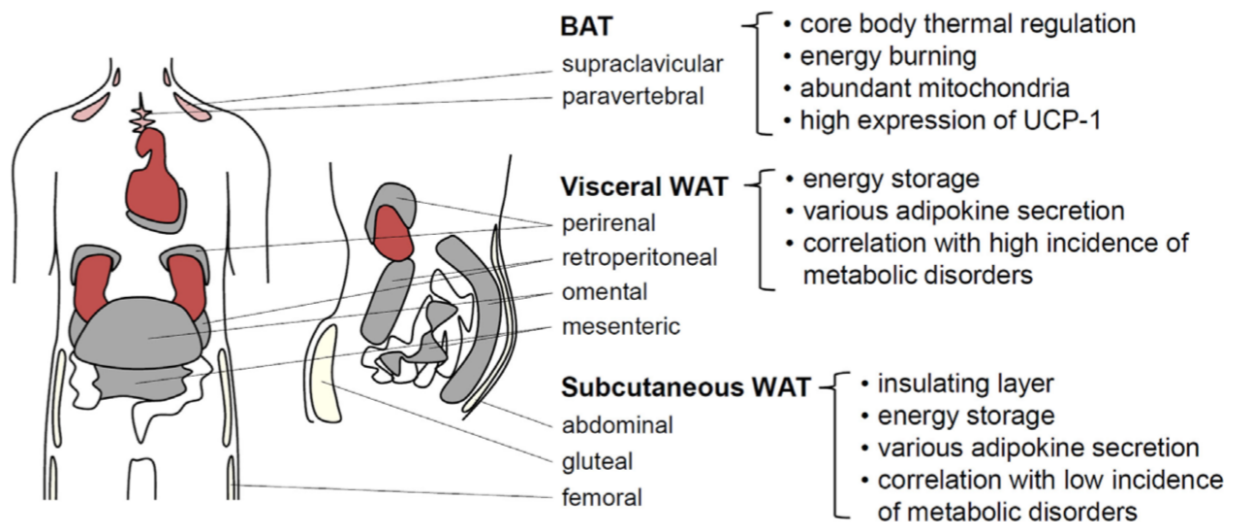
## 1.1 Il tessuto adiposo

Il tessuto adiposo (*Adipose Tissue*, AT) rappresenta nei vertebrati, e in particolare nei mammiferi, la principale riserva energetica dell'organismo. L'energia viene immagazzinata sotto forma di trigliceridi (TGs), costituiti da tre acidi grassi esterificati su una molecola di glicerolo; queste molecole idrofobiche possono essere immagazzinate in grande quantità in assenza di acqua e hanno una resa energetica, per unità di massa, maggiore rispetto ad altri nutrienti. I trigliceridi possono essere scissi in glicerolo ed acidi grassi (*fatty acids*, FA) mediante lipolisi, processo attivato al momento del digiuno, quando vi è richiesta di energia o se la quantità di TGs eccede la capacità di accumulo dell'adipocita (Lafontan & Langin 2009). Il glicerolo e gli acidi grassi liberati dal tessuto adiposo vengono poi trasportati attraverso la circolazione sistemica e rilasciati successivamente a muscolo, fegato ed altri organi, controllando la distribuzione lipidica nell'intero corpo e modulando il bilancio dell'energia totale (Frayn 2002). Durante l'evoluzione, il tessuto adiposo si è specializzato non solo nella funzione trofica, ma anche nel ricoprire un ruolo di protezione meccanica e sostegno per l'organismo. Inoltre, negli ultimi anni, è stata rivalutata la sua funzionalità come organo endocrino in grado di secernere ormoni e citochine che regolano l'omeostasi metabolica (Coelho *et al.* 2013)

Il tessuto adiposo è stato a lungo considerato solo come un tessuto connettivo privo di una particolare organizzazione. In realtà, si tratta di un tessuto altamente organizzato a formare un esteso organo con una struttura definita, precise caratteristiche citologiche, anatomiche e specifiche innervazioni e vascolarizzazioni. Inoltre, presenta elevata plasticità nella sua fisiologia: differenti tipi di stimoli, che siano di tipo nutrizionale o legati a modificazioni nella temperatura ambientale, sono in grado di indurre variazioni anatomiche nell'organo adiposo. Fra i tipi cellulari che lo compongono si trovano elementi del sistema immunitario, cellule endoteliali, fibroblasti, cellule staminali e adipociti a diverso stadio di differenziamento (Cinti 2011).

A seconda delle sue funzioni biologiche e distribuzione, il tessuto adiposo viene classificato in due tipologie principali: tessuto adiposo bianco (*White Adipose Tissue*, WAT) e tessuto adiposo bruno (*Brown Adipose Tissue*, BAT), [figura 1]. Il WAT localizzato nel tessuto sottocutaneo e intorno agli organi viscerali circostanti, rappresenta il principale deposito di grasso nei mammiferi e nell'adulto.

In particolare, si distribuisce intorno all'omento, all'intestino e in sede perirenale, così come nelle natiche, nelle cosce e nell'addome in corrispondenza dei depositi sottocutanei. Può ritrovarsi in molte altre zone, incluse lo spazio retro-orbitale, il viso e le estremità, e nel midollo osseo (Gesta *et al.* 2007). Costituisce un importante organo endocrino che regola la sensibilità all'insulina e il metabolismo lipidico. Il BAT, caratteristico dei piccoli mammiferi e rappresentato nell'uomo principalmente nella vita fetale e neonatale, è localizzato principalmente nelle regioni paracervicale, perirenali e perisurrenali e nella porzione periscapolare. Questo tessuto è specializzato nella produzione di calore (termogenesi), grazie alla presenza specifica dell'enzima disaccoppiante UCP-1 (Adamczak & Wiecek 2013), [figura 1]. Le differenze morfologiche fra i due tipi di tessuto riguardano forma, assetto mitocondriale e gocce lipidiche (Frontini & Cinti 2010).

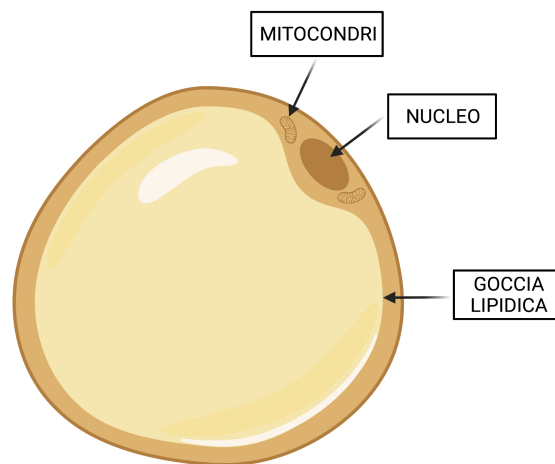


**Figura 1.** Distribuzione dei depositi di BAT e WAT nell'adulto e nel neonato. Tratta e modificata da Choe *et al.* 2016.

### 1.1.1 Il tessuto adiposo bianco

Il tessuto adiposo bianco è costituito da cellule a stretto contatto e presenta scarsa matrice extracellulare, costituita principalmente da collagene e fibre (Ahima 2006). Oltre agli adipociti, che rappresentano il tipo predominante di cellule presenti, il WAT contiene cellule del tessuto connettivo, fibre nervose, stroma vascolare, linfonodi, cellule dell'immunità (linfociti e macrofagi), fibroblasti e preadipociti (cellula adiposa indifferenziata) (Ahima *et al.* 2000).

Gli adipociti bianchi sono cellule uniloculari, di forma sferica e notevoli dimensioni (fino a 150-200  $\mu\text{m}$ ): tale forma è correlata alla loro funzione, permettendo di ottimizzare lo spazio cellulare per immagazzinare i trigliceridi. Gli adipociti sono caratterizzati dalla presenza di una singola grande goccia lipidica costituita da trigliceridi, che occupa circa l'85-90% della massa, comprimendo il nucleo e gli altri organelli verso la membrana plasmatica. Il citoplasma è ridotto ad un sottilissimo strato che circonda il vacuolo lipidico, dove sono visibili il reticolo endoplasmatico e l'apparato di Golgi (Smorlesi *et al.* 2012, Bruun *et al.* 2005). Gli adipociti bianchi possiedono mitocondri piccoli con creste orientate in varie direzioni (Frontini & Cinti 2010), [figura 2].



**Figura 2.** Struttura schematica di una cellula adiposa bianca: il citoplasma è occupato quasi interamente da un'unica goccia lipidica; nell'area residua, delimitata da membrana, sono visibili il nucleo decentrato e gli organuli cellulari. Creata con BioRender.com.

Dal punto di vista funzionale, gli adipociti del WAT costituiscono il più importante sistema di regolazione del bilancio energetico. Sono infatti deputati ad accumulare molecole ad alto contenuto energetico per permettere l'intervallo di tempo fra un pasto e l'altro: immagazzinano TGs durante il consumo di cibo e rilasciano acidi grassi quando la spesa energetica supera l'apporto calorico.

## SAT e VAT

Il tessuto adiposo bianco è diffuso in tutto l'organismo e può essere a sua volta suddiviso, in base alla localizzazione anatomica, in tessuto adiposo sottocutaneo (*Subcutaneous Adipose Tissue*, SAT) e viscerale (*Visceral Adipose Tissue*, VAT).

Il SAT è localizzato sotto l'epidermide, in particolare a livello addominale, nei glutei e nella zona femorale. È composto da grossi fasci di fibre che delimitano una serie di spazi occupati dagli adipociti detti "logge adipose", presenta poche terminazioni nervose, mentre risulta abbondante l'irrorazione sanguigna. La sua funzione principale è il mantenimento della temperatura corporea e la protezione meccanica al derma sottostante. Il SAT presenta una differente distribuzione nei due sessi controllata principalmente dagli ormoni sessuali. Si parla, infatti, di distribuzione di tipo ginoide (nelle donne, in cui la massa adiposa è localizzata nei fianchi e nei glutei) e androide (negli uomini, in cui l'accumulo adiposo si trova concentrato nell'addome al di sopra dell'ombelico).

Il VAT è localizzato negli spazi tra gli organi interni, serve a mantenerli nell'adeguata posizione ed offre loro una protezione meccanica attenuando gli impatti nei movimenti (Guyton *et al.* 2000). A seconda della sede anatomica in cui si localizza il VAT, si distingue in mesenterico, retro-peritoneale e omentale. Rispetto al SAT, è dotato di un'abbondante vascolarizzazione, un'alta densità di fibre nervose e presenta una componente di cellule dell'infiammazione e del sistema immunitario (Bruun *et al.* 2005).

Le funzioni specifiche di SAT e VAT, derivanti dalla diversa localizzazione nell'organismo, sono mediate da differenti meccanismi di regolazione legati in parte all'innervazione locale e all'azione ormonale. Tale regolazione influenza numerosi processi a carico dell'adipocita maturo e del precursore adipocitario, dall'accumulo alla mobilizzazione dei lipidi, dalla risposta all'insulina alla secrezione delle adipochine (Ibrahim 2010, Lazar 2008). L'accumulo di grasso si osserva inizialmente ed in base al *background* genetico a livello sottocutaneo, in genere come risposta fisiologica ad una dieta con alto contenuto energetico non accompagnata da un'adeguata attività fisica. Il SAT agisce così da "deposito metabolico" in cui gli acidi grassi liberi (*free fatty acids*, FFA) e il glicerolo sono immagazzinati sotto forma di TGs negli adipociti. Nel caso di un persistente disequilibrio tra alimentazione e inattività fisica, in particolare nell'ambito di un particolare assetto genetico di suscettibilità, il tessuto sottocutaneo può non essere più in grado di accumulare il

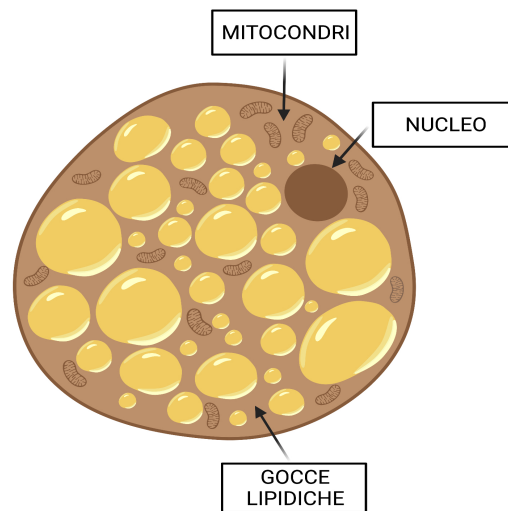
grasso in eccesso, che si accumula quindi nel tessuto viscerale profondo e perfino in sedi ectopiche, come il muscolo e il fegato. Questo determina un'alterazione dell'equilibrio metabolico, portando a disfunzioni patologiche. In questa condizione, il comparto adiposo è sottoposto a stimolo ipertrofico (aumento delle dimensioni cellulari) e iperplastico (aumento del numero di adipociti) (Cannon & Nedergaar 2004).

### 1.1.2 Il tessuto adiposo bruno

Il tessuto adiposo bruno è specializzato nella produzione di calore, processo noto con il nome di termogenesi, che è estremamente sviluppato nel feto e nel neonato e scompare quasi completamente nell'individuo adulto. Il BAT è localizzato nelle aree cervicale, ascellare, interscapolare e tra i muscoli intercostali, sterno, intorno a reni, cuore, aorta e principali arterie e vene, quali carotidi, succlavie e renali. Le zone che contengono prevalentemente adipociti bruni sono fortemente vascolarizzate e innervate con fibre del sistema nervoso simpatico, che ne regolano l'attività mediante il rilascio di noradrenalina (Frontini & Cinti 2010).

Gli adipociti bruni o multiloculari hanno un diametro di circa 30-40  $\mu\text{m}$  e sono cellule più piccole rispetto all'adipocita bianco (Pond 2001). Morfologicamente, tali cellule presentano al loro interno numerose gocce lipidiche di varie dimensioni, un citoplasma abbastanza esteso, un nucleo sferico centrale e molti mitocondri che rilasciano calore mediante l'ossidazione degli acidi grassi (Cannon & Nedergaard 2004), [figura 3]. In queste cellule, i mitocondri presentano una forma ovoidale e sono ricchi di creste laminari, caratteristiche per la presenza della proteina UCP-1 (*Uncoupling Protein-1* o termogenina) responsabile del processo di termogenesi (Rial & Gonzalez-Barroso 2001, Cinti *et al.* 1989)





**Figura 3.** Struttura schematica di una cellula adiposa bruna: nel citoplasma si trovano numerose gocce lipidiche e numerosi mitocondri. Creata con BioRender.com.

L'alta concentrazione di mitocondri e di citocromo ossidasi ad essi associati conferiscono al tessuto la tipica colorazione bruna rispetto al tessuto adiposo bianco e lo rendono facilmente distinguibile dal punto di vista morfologico (Curi *et al.* 2002). Anche la vascolarizzazione di questo tipo di tessuto adiposo contribuisce nel renderlo particolarmente scuro: la densa rete di capillari che circonda gli adipociti bruni è il risultato di una grande produzione del fattore di crescita endoteliale (*Vascular Endothelial Growth Factor*, VEGF) da parte delle cellule stesse. Tale caratteristica è dovuta alla necessità degli adipociti bruni di avere a disposizione alti livelli di ossigeno e nutrienti per sostenere l'attività termogenica e rappresenta il modo ottimale per distribuire il calore prodotto nell'organismo (Farmer 2008).

Lo sviluppo di calore è determinato dall'espressione specifica nel BAT di UCP-1, che si localizza nella membrana mitocondriale interna come un canale protonico: tale proteina determina la dissipazione di parte del gradiente elettrochimico generato nella fosforilazione ossidativa, permettendo ai protoni accumulatisi nello spazio intermembranale di tornare nella matrice mitocondriale. Questo disaccoppiamento della catena respiratoria dalla fosforilazione ossidativa determina una veloce ossidazione del substrato con una esigua produzione di ATP (Enerbäck 2010). L'esposizione a temperature al di sotto della termoneutralità attiva il sistema nervoso simpatico che rilascia noradrenalina, una catecolamina che stimola la funzionalità degli adipociti

bruni interagendo con i recettori  $\beta_3$ -adrenergici. L'interazione tra noradrenalina e recettore  $\beta_3$ , attiva una proteina G associata al recettore, la quale a cascata attiva la via dell'AMPC, che porta alla fosforilazione della PKA. Quest'ultima determina la lipolisi degli acidi grassi contenuti nei vacuoli lipidici utilizzati come substrato energetico nella termogenesi e l'aumento dell'espressione dell'UCP-1.

Negli ultimi anni, è stata scoperta una nuova categoria di adipociti *brown-like* sottostante un differente *pattern* di espressione genica rispetto agli adipociti bianchi o bruni. Questa tipologia di cellule risiede all'interno del WAT, in particolare dei depositi inguinali: si parla in questo contesto di adipociti *beige/brite* o adipociti bruni inducibili (Wu *et al.* 2012).

### *Transdifferenziamento e browning*

L'organo adiposo si presenta come una struttura complessa e dotata di proprietà altamente plastiche, tra le quali la capacità da parte delle sue cellule parenchimali, ossia gli adipociti, di riprogrammare l'espressione genica e "transdifferenziare" in altre cellule con diversa morfologia e fisiologia (intesa come stato fisiologicamente reversibile) (Cinti 2012). Il numero di adipociti bruni e bianchi nell'organo adiposo non è fisso, ma varia in funzione di condizioni fisiologiche e patologiche.

Nonostante si ritenesse che l'esistenza del BAT nell'uomo fosse ristretta al periodo neonatale e della prima infanzia e che questi depositi tendessero ad atrofizzarsi con l'età e con la disfunzione adiposa, recenti evidenze sperimentali hanno dimostrato la coesistenza di adipociti bruni e bianchi all'interno di depositi WAT. La natura delle cellule brune che si formano all'interno dei depositi bianchi sembra essere differente anche dalla cellula adiposa bruna classica (depositi interscapolari, lungo il collo, la colonna vertebrale e perirenali, nell'uomo). Queste cellule, infatti, hanno caratteristiche brune meno spiccate (minor espressione e attività di UCP-1) rispetto all'adipocita classico e per questo sono state denominate *brite* o *beige* (Petrovic *et al.* 2010). L'origine di questi adipociti bruni è stata ipotizzata attraverso differenti modelli, che prevedono comunque un fenomeno definito come *browning* del WAT, cioè di comparsa di adipociti maturi bruni all'interno di tessuto adiposo bianco (Giralt & Villaroya 2013, Barbatelli *et al.* 2010). Essenzialmente ci sono due modelli ipotizzati per spiegare questo fenomeno di *browning*, basati su varie evidenze sperimentali.

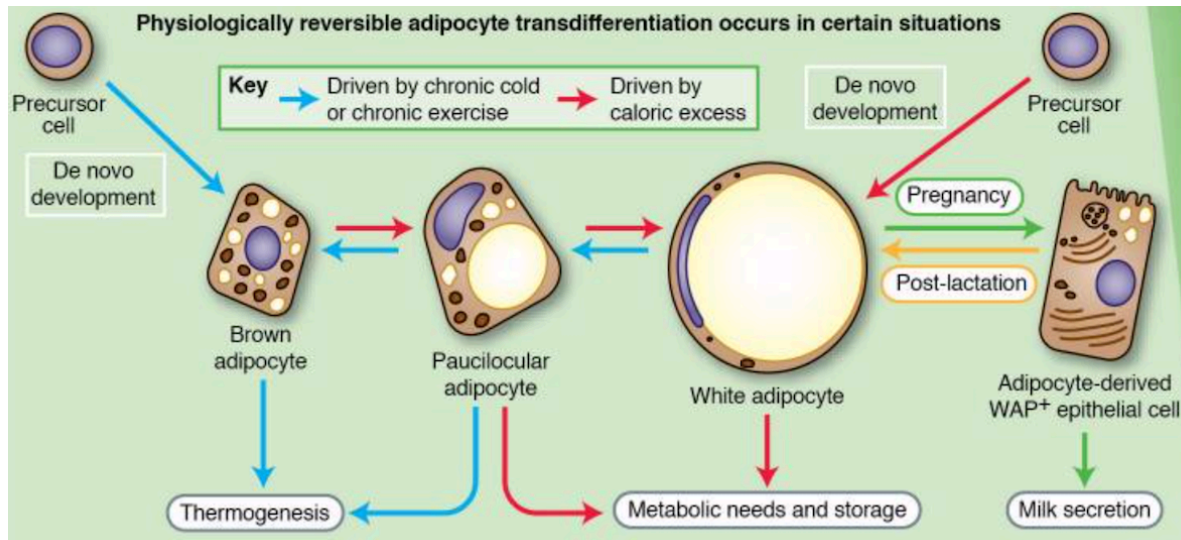
La prima ipotesi che spiega la comparsa di cellule brune all'interno dei depositi di grasso bianco è quella della transdifferenziazione. Si tratta di un fenomeno biologico attraverso il quale, sotto opportuno stimolo, un adipocita maturo bianco si converte in modo diretto, funzionalmente e fenotipicamente, in adipocita maturo bruno senza sottostare a dedifferenziamento e senza che ci sia apoptosi (Cinti 2005). Allo stato basale e in assenza di stimoli, gli adipociti mostrerebbero morfologia uniloculare con un'unica grande goccia lipidica, oltre che un *pattern* di geni del tutto simile a quello degli adipociti bianchi. Tuttavia, a sostegno del transdifferenziamento è stata proposta l'esistenza delle cosiddette cellule "pauciloculari": in seguito a stimolazione indotta ad esempio dalle basse temperature, questi adipociti presenterebbero transitoriamente una "morfologia intermedia", con tanti piccoli vacuoli lipidici che ne circondano uno più grande (Himms-Hagen *et al.* 2000). Queste variazioni risultano infine nell'espressione di UCP-1 e nella caratteristica struttura multiloculare tipica degli adipociti bruni (Sharp *et al.* 2012, Waldén *et al.* 2012, Wu *et al.* 2012). Si tratta di un processo reversibile: come riportato da esperimenti condotti su modelli murini, il passaggio da basse temperature a temperatura ambiente riconverte gli adipociti a bianchi con un basso livello di espressione dei *markers* tipici dell'adipocita bruno. Per queste ragioni è stato concluso che il *browning* (e anche l'inverso, il *whitening*) è un fenomeno interconvertibile dipendente dalle condizioni del microambiente (Rosenwald *et al.* 2013), [figura 4].

La seconda ipotesi suggerisce che il *lineage* bruno presenti un precursore differente dal bianco e differenzia in bruno sotto opportuno stimolo. In questo caso, la comparsa di grasso bruno nei depositi di WAT viene ricondotta ad un'adipogenesi *de novo*, [figura 4]: alcuni induttori (ad esempio TZD, BMP-7 e COX2) potrebbero essere responsabili di un differenziamento verso adipocita *brite* a partire da progenitori residenti, con marcatori precoci differenti dal *lineage* bruno classico quali CD137, TMEM26, Tbx1 (Cawthorn *et al.* 2012).

Questo meccanismo è stato anche confermato da alcuni lavori condotti su modelli transgenici di topo con marcatura di tipo *lineage tracing*, che ha permesso di tracciare la nicchia staminale e le cellule generate dalla stimolazione del differenziamento di tale nicchia (*AdipoChaser mouse*) (Wang *et al.* 2013).

Benché i dati ottenuti fino ad oggi sul fenomeno del *browning* siano cospicui, gli esatti meccanismi molecolari che ne sono alla base non sono ancora stati chiariti e sono tutt'ora oggetto di dibattito tra vari gruppi di ricerca. È altrettanto probabile che le due ipotesi non siano mutualmente

escludenti, e che quindi i meccanismi di transdifferenziamento e l'adipogenesi *de novo* possano coesistere in determinate aree anatomiche, dove differenti stimoli in differenti momenti potrebbero attivare l'uno o l'altro *pathway* (Townsend & Tseng 2012).



**Figura 4.** Plasticità dell'organo adiposo. Tratta e modificata da Cinti 2012.

In realtà, fin dagli anni 80 del '900, nell'uomo adulto era stata già descritta la comparsa di adipociti bruni all'interno di depositi di WAT in alcune condizioni patologiche quali il feocromocitoma, un tumore endocrino della midollare del surrene caratterizzato da alti livelli di produzione di catecolamine: in questo contesto alcuni ricercatori scoprono la presenza di cellule multiloculari, ricche in mitocondri e positive per UCP-1, all'interno dei depositi del grasso bianco viscerale che circondano la lesione. Spiegazione di tutto ciò fu ricondotta al rilascio locale, mediato dal tumore, di catecolamine, fattori trofici per lo sviluppo di BAT (Lean 1986, Ricquier 1982).

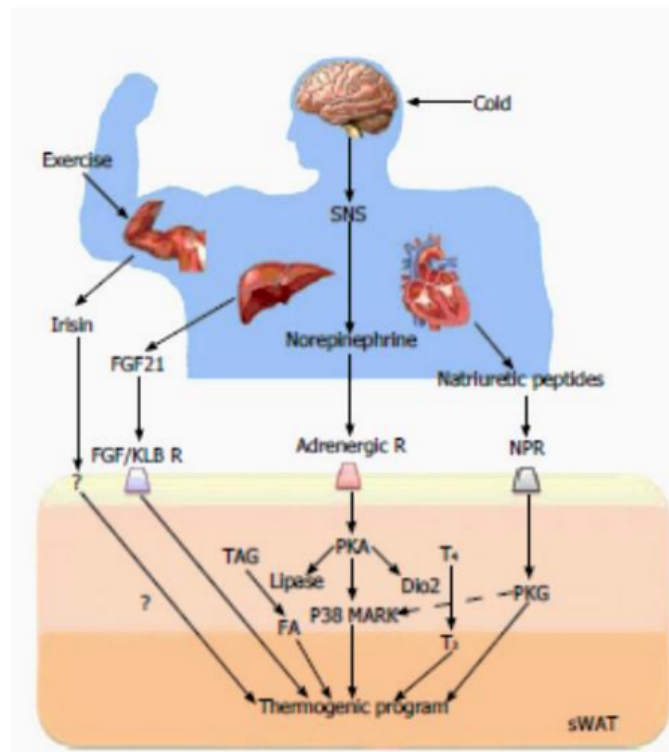
Come accennato in precedenza, sono diversi e di varia natura i fattori che possono essere considerati responsabili del *browning* del WAT. Tra questi, l'esposizione cronica a basse temperature è considerata un potente induttore del fenotipo *brite/beige*, in quanto in grado di apportare incisive variazioni nel metabolismo e nell'espressione genica. Inoltre, è in grado di stimolare il differenziamento dei precursori entro una sola settimana dall'esposizione (Rosenwald *et al.* 2013). L'attività termogenica viene regolata da canonici *pathways* che coinvolgono i recettori  $\beta$ -adrenergici, attraverso il sistema nervoso. Le catecolamine, come la norepinefrina, attivano i recettori  $\beta$ -adrenergici (nell'uomo ne esistono 3 sottotipi, l'1, il 2 e il 3, ma principalmente sono il 3 e l'1 a mediare la risposta alla norepinefrina) che sono accoppiati a proteine G determinando un

aumento dei livelli intracellulari di cAMP. Questo segnale si traduce nella mobilitazione degli acidi grassi ed induce nei mitocondri l'espressione di UCP-1 nella cosiddetta termogenesi "non da brivido". In conclusione, le catecolamine o gli agonisti dei recettori  $\beta$ -adrenergici sono in grado di mimare la maggior parte degli effetti termogenici (Giacobino 1995, Lafontan & Berlan 1993, Himms-Hagen 1990). Altri agenti come i tiazolidinedioni, attivatori di PPAR $\gamma$ , sono in grado di promuovere il browning del WAT (Ohno *et al.* 2012).

Inoltre, sono stati più recentemente descritti alcuni mediatori fisiologici non adrenergici capaci di stimolare l'attività del tessuto bruno ed il *browning* (Villarroya & Vidal-Puig 2013). Sebbene alcune di queste molecole agiscano indirettamente, modulando l'attivazione del simpatico e i successivi *pathways* noradrenergici, la maggior parte di questi agenti, tra cui FGF21 (*Fibroblast Growth Factor-21*) e i peptidi cardiaci ANP/BNP, sembra avere degli effetti diretti sugli adipociti bruni e sul meccanismo di transdifferenziamento (Bordicchia *et al.* 2012, Fisher *et al.* 2012).

Più recentemente è stata descritta l'irisina, un nuovo fattore ormonale in grado di convertire grasso bianco in *brite*, più propenso a fare termogenesi. L'irisina è secreta e rilasciata dal muscolo durante l'esercizio fisico, e sembra condizionare il processo di *browning* del WAT ma non la classica attivazione del BAT (Boström *et al.* 2012), [figura 5].

Oltre a questi stimoli, altri fattori sono in grado di potenziare il reclutamento di cellule *brite*, tra i quali le prostaglandine, generate localmente dalla COX-2, BMP8b, il fattore di trascrizione FOX2c e la guanosina monofosfato ciclico (Jennissen 2012, Whittle *et al.* 2012, Yang *et al.* 2003). Infine, anche l'iper-espressione di BMP4 sembra promuovere il *browning* (Qian *et al.* 2013).



**Figura 5.** Principali regolatori del processo di browning e loro meccanismi d'azione. Tratta da Park et al. 2014.

La stimolazione della conversione WAT-BAT può rappresentare una nuova strategia terapeutica nelle malattie di tipo metabolico. In merito a questa possibilità, due recenti studi hanno dimostrato per la prima volta che cellule staminali adipose ottenute da grasso sottocutaneo ed indotte a adipociti del *lineage brite/beige* tramite VEGF, possono apportare incisivi miglioramenti nella tolleranza al glucosio e nella steatosi epatica se trapiantate in topi NSG (*NOD scid gamma*) (Wang & Scherer 2016, Min et al. 2015). Questi dati hanno aperto nuovi orizzonti per l'utilizzo terapeutico del *browning* che potrebbe essere un utile strumento per affrontare i problemi legati alle terapie farmacologiche contro l'obesità (Cypess & Kahn 2010). Nonostante ciò, l'attivazione farmacologica del sistema nervoso simpatico non sembra essere utile nel promuovere la perdita di peso tramite il potenziamento dell'attività del BAT per via dei numerosi effetti collaterali (Yen & Ewald 2012). Inoltre, potrebbe essere considerata una nuova proprietà cellulare fisiologica di vasta applicazione in campo biomedico (Cinti 2011).

### 1.1.3 Metabolismo del tessuto adiposo

Come principale riserva energetica, il tessuto adiposo ha la funzione di immagazzinare trigliceridi e rilasciare acidi grassi mediante, rispettivamente, i processi metabolici di lipogenesi e lipolisi.

In sintesi, durante la fase di alimentazione viene stimolato il *pathway* di lipogenesi, facendo sì che i TGs si depositino all'interno degli adipociti; nella fase di digiuno viene al contrario incentivato il processo di lipolisi, che promuove l'idrolisi dei TGs e il rilascio di acidi grassi (Luo & Liu 2016). Il bilancio tra lipogenesi e lipolisi a livello del tessuto adiposo è fondamentale ai fini del mantenimento dell'omeostasi energetica e della sensibilità insulinica.

La lipogenesi è il processo che comprende la sintesi *de novo* degli acidi grassi e la biosintesi dei trigliceridi, [figura 6]. Per la biosintesi dei trigliceridi i substrati richiesti sono una molecola di glicerolo-3-fosfato e 3 molecole di acidi grassi. Per produrre glicerolo 3-fosfato sono necessari glucosio e i suoi trasportatori (*Glucose Transporter*). Nella fase post-prandiale, in seguito a stimolazione insulinica, si verifica la traslocazione sulla membrana del trasportatore di glucosio (GLUT4) determinando l'*uptake* di glucosio dal circolo sanguigno nell'adipocita. Il glucosio viene metabolizzato in acetil-CoA, che in parte viene trasformato dall'enzima acetil-CoA carbossilasi per la sintesi *de novo* degli acidi grassi (Luo & Liu 2016). Oltre alla captazione di glucosio all'interno degli adipociti, l'insulina attiva enzimi glicolitici e lipogenici e induce l'espressione del gene SREBP1 (*Sterol Regulatory Element-Binding Protein 1*), che regola l'espressione di geni richiesti per la sintesi di colesterolo, acidi grassi, TGs e fosfolipidi (Ferre & Foufelle 2007, Assimacopoulos-Jeannet *et al.* 1995). Oltre a SREBP1, anche il fattore di trascrizione ChREBP (*Carbohydrate Response Element-Binding Protein*) induce l'espressione di geni coinvolti nella lipogenesi *de novo*, modulando il metabolismo glucidico e lipidico del tessuto epatico e del tessuto adiposo (Eissing *et al.* 2013, Herman *et al.* 2012).

Gli acidi grassi, sintetizzati *de novo* a partire dall'acetil-CoA o presenti in circolo associati alle lipoproteine ricche in trigliceridi, quali chilomicroni e VLDL (*Very Low Density Protein*), che vengono internalizzati negli adipociti, sono quindi esterificati con glicerolo-3-fosfato per formare i trigliceridi (Coelho *et al.* 2013). L'enzima lipoproteina lipasi (LPL) secreto dagli adipociti, trasloca nel lume vasale, idrolizza i trigliceridi contenuti nelle lipoproteine in circolo e consente l'ingresso degli acidi grassi negli adipociti (Kersten 2014). L'enzima diacilglicerolo-aciltrasferasi (DGAT) catalizza l'ultima tappa del processo di esterificazione degli acidi grassi ed è responsabile del

deposito dei lipidi nel tessuto adiposo (Harris *et al.* 2011, Smith *et al.* 2000).

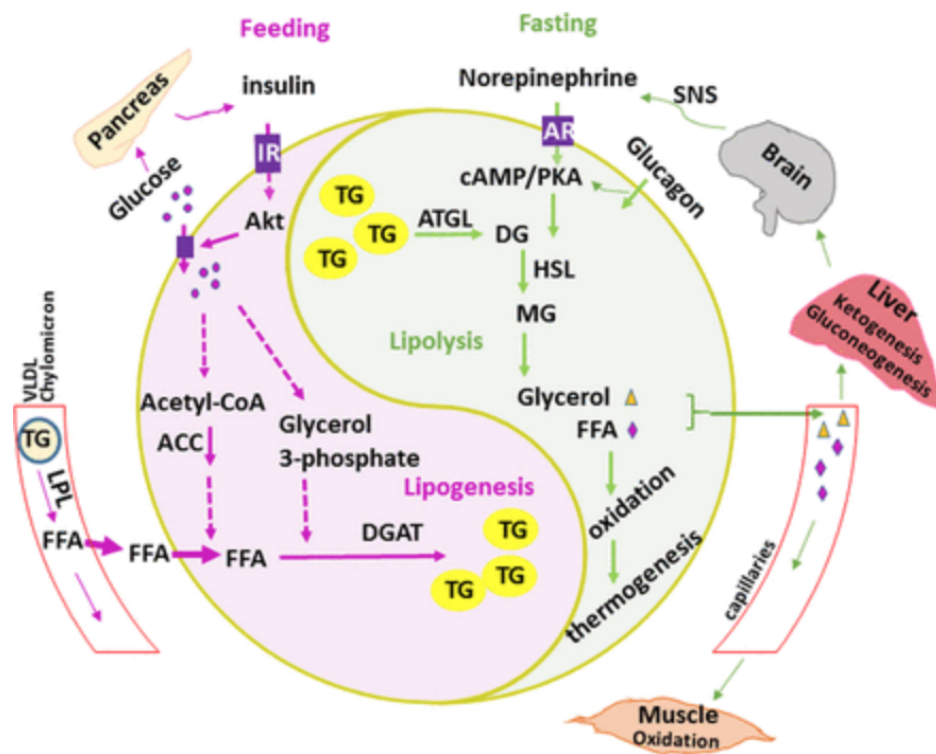


Figura 6. Processi metabolici di lipogenesi e lipolisi nel tessuto adiposo. Tratta da Luo & Liu 2016.

All'opposto della lipogenesi, la lipolisi è il processo catabolico che porta alla demolizione dei trigliceridi immagazzinati negli adipociti e successivamente al rilascio di glicerolo e acidi grassi liberi (Carmen & Víctor 2006, Langin & Arner 2006, Zechner *et al.* 2005), [figura 6]. Quest'ultimi viaggeranno attraverso il flusso sanguigno fino al fegato, ai muscoli e verso altri organi per essere ossidati e ricavare energia (Coelho *et al.* 2013).

Nella fase di digiuno, l'abbassamento della concentrazione di glucosio nel sangue porta alla secrezione di glucagone e riduce il rilascio di insulina da parte del pancreas. Il glucagone, a concentrazioni elevate, è responsabile dell'attivazione della via di segnalazione della protein chinasi A (PKA) c-AMP dipendente e della lipolisi negli adipociti. I primi enzimi attivati durante la lipolisi sono la lipasi adiposa del trigliceride (*Adipose Triglyceride Lipase*, ATGL) e la lipasi ormone sensibile (*Hormone Sensitive Lipase*, HSL) (Haemmerle *et al.* 2002). La ATGL è responsabile della conversione dei trigliceridi a di-gliceridi. L'HSL converte i di-gliceridi a mono-gliceridi e idrolizza quest'ultimi ad acidi grassi liberi e glicerolo.



Gli acidi grassi detti "liberi", perché non più esterificati, prendono anche il nome di FFA o NEFA (*Free Fatty Acids o Non-Esterified Fatty Acids*). Queste molecole vengono rilasciate nel plasma sanguigno, trasportate dall'albumina (proteina trasportatrice), così che possano rendersi disponibili a livello dei vari tessuti.

Il sistema nervoso centrale gioca un ruolo importante nella regolazione dei processi di lipogenesi e lipolisi attraverso un meccanismo sia diretto che indiretto. Il sistema simpatico promuove, attraverso la stimolazione  $\beta$ -adrenergica, l'attività catabolica; l'HSL viene attivata in risposta a stimoli  $\beta$ -adrenergici dalle catecolamine (adrenalina, noradrenalina) e viene disattivata dalla defosforilazione in risposta all'insulina e ad altri agenti anti-lipolitici (cioè che impediscono la mobilizzazione del grasso) (Pénicaud *et al.* 2000). Al contrario il sistema parasimpatico stimola l'attività anabolica attraverso l'aumento della produzione di insulina, dei livelli di glucosio e l'immagazzinamento degli acidi grassi (Kreier *et al.* 2002).

#### 1.1.4 Il tessuto adiposo come organo endocrino

Per molto tempo il tessuto adiposo è stato considerato un organo con funzioni semplici, rappresentate dalla capacità di fornire un isolamento termico e meccanico e di immagazzinare l'eccesso di energia sotto forma di trigliceridi, per restituirla, secondo i bisogni, come acidi grassi liberi. Tuttavia, negli ultimi 20 anni le funzioni biologiche del tessuto adiposo sono state riviste e oggi è considerato come un vero e proprio organo dinamico, coinvolto in un'ampia gamma di processi biologici e metabolici. Il tessuto adiposo è infatti un organo endocrino, capace di secernere una serie di ormoni, fattori di crescita e del complemento, enzimi nel complesso chiamati adipochine.

La natura endocrina del tessuto adiposo è stata confermata con l'identificazione e la caratterizzazione della leptina nel 1994 (Zhang *et al.* 1994), mentre, solo due anni dopo, è stato definito per la prima volta "organo endocrino" sulla base del ruolo della leptina stessa (Smith 1996). Studi successivi hanno permesso di identificare una serie di sostanze ad azione endocrina e paracrina (Nedergaard *et al.* 2005).

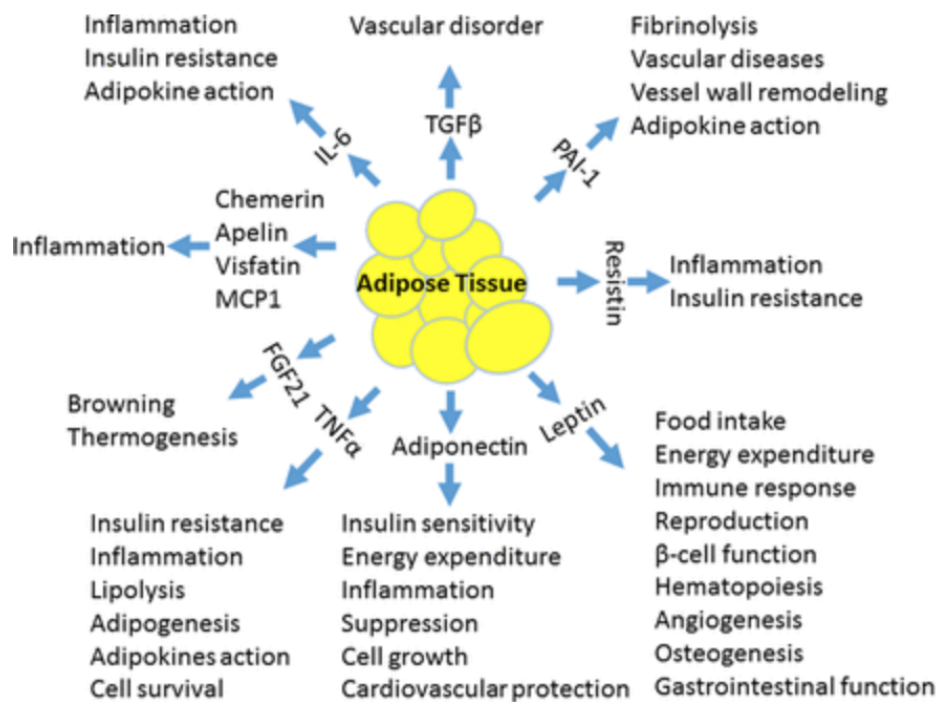
Il termine "adipocitochine" viene utilizzato per la prima volta nel 1999, ad indicare una serie di proteine biologicamente attive secrete dagli adipociti e implicate nei processi infiammatori (Funahashi *et al.* 1999). Sebbene molti di questi peptidi siano correlati con l'infiammazione, questa definizione non è sembrata esaustiva in quanto inquadra solo in parte l'ampio spettro di funzioni svolte da queste molecole; ad oggi si preferisce infatti utilizzare il termine di "adipochine" per identificare tutte le molecole sintetizzate e secrete dal tessuto adiposo (Wang *et al.* 2008, Trayhurn & Wood 2004). Tuttavia, studi hanno dimostrato che un numero considerevole di adipochine viene secreto principalmente dalla frazione vasculo-stromale, ma non dagli adipociti (Fain & Madan 2005, Fain *et al.* 2004, Xu *et al.* 2003). Quindi, secondo una definizione più rigorosa, il termine "adipochine" si riferirebbe solo alle proteine secrete in maniera specifica dalle cellule adipose o da preparazioni arricchite in adipociti (Wang *et al.* 2008, Rajala & Scherer 2003).

#### *Adipochine*

Le adipochine sono un gruppo eterogeneo di proteine che hanno strutture e funzioni diverse, [figura 7]. Fino ad oggi sono state identificate più di 20 differenti (Ebtessam 2013), tra le quali:

- proteine coinvolte nel sistema immunitario e nei processi infiammatori come il fattore di

- necrosi tumorale (*Tumor Necrosis Factor- $\alpha$* , TNF- $\alpha$ ) e l'interleuchina-6 (*Interleukin-6*, IL-6);
- fattori di crescita come il fattore di crescita trasformante- $\beta$  (*Transforming Growth Factor-  $\beta$* , TGF- $\beta$ );
- proteine coinvolte nella cascata alternativa del complemento come l'adipsina;
- angiotensinogeno che svolge un ruolo cardine nella regolazione della pressione arteriosa;
- inibitore-1 dell'attivatore del plasminogeno (*Plasminogen Activator Inhibitor-1*, PAI-1) coinvolto nella coagulazione del sangue;
- adiponectina, resistina e leptina coinvolte nella regolazione dell'omeostasi glicemica;
- fattore di crescita dell'endotelio vascolare (*Vascular Endothelial Growth Factor*, VEGF), coinvolto nell'angiogenesi vascolare.



**Figura 7.** Rappresentazione schematica delle funzioni fisiologiche svolte dalle adipochine. Tratta da Luo & Liu 2016.

Alcune di queste adipochine, sono prodotte esclusivamente nel tessuto adiposo, quali la leptina e l'adiponectina, mentre altre sono citochine infiammatorie. Le adipochine funzionano come classici ormoni circolanti che comunicano con altri organi incluso il cervello, il fegato, il muscolo, il sistema immunitario e lo stesso tessuto adiposo (Kwon & Pessin 2013). Agiscono sia localmente che a livello sistemico con un'azione endocrina, paracrina e autocrina (Adamczak & Wiecek 2013). Oltre a questa miriade di segnali efferenti, il tessuto adiposo esprime un ampio pannello recettoriale che gli permette di rispondere attivamente agli stimoli ormonali e di comunicare con gli organi più

distanti e con il sistema nervoso centrale.

Le adipochine sono implicate in svariate funzioni fisiologiche: contribuiscono alla regolazione della risposta immunitaria, della pressione arteriosa, dell'angiogenesi, del metabolismo lipidico e dell'emostasi. Hanno un ruolo centrale nel controllo dell'energia metabolica, dello stato di nutrizione dell'organismo, incluso l'apporto e la spesa energetica, oltre alla sensibilità insulinica. Costituiscono, quindi, una rete di regolazione dell'infiammazione, dell'attività insulinica e del metabolismo glucidico a livello locale e sistemico. Un'alterata secrezione di molte adipochine è associata all'instaurarsi di processi infiammatori legati poi allo sviluppo e progressione di disordini metabolici come l'obesità, l'aterosclerosi, l'insulino-resistenza e il diabete mellito di tipo 2 (Ebtesam 2013). L'obesità, caratterizzata da un'espansione disfunzionale del tessuto adiposo, infatti, si associa ad uno squilibrio della secrezione di adipochine. Molti esperimenti *in vitro* e *in vivo* hanno confermato le numerose importanti funzioni delle adipochine nell'organismo.

La leptina è un ormone proteico di 16 kDa, è considerata una citochina pro-infiammatoria ed appartiene alla famiglia dell'IL6. È stata la prima adipochina ad essere identificata nel 1994 come prodotto del gene "*lep*", omologo del gene murino "*ob*" (Zhang *et al.* 1994). Studi di immunostochimica hanno dimostrato che l'ormone è presente negli adipociti maturi all'interno di vescicole di secrezione e viene rilasciato rapidamente in seguito ad assunzione di cibo (Bornstein *et al.* 2000).

La leptina è l'adipochina più caratterizzata: i primi studi sono stati effettuati in modelli murini (*ob/ob*) mutati in cui la mancata produzione di questa proteina era associata a incapacità nel mantenere/produrre calore, deficit nella crescita, aumentato ipogonadismo, accentuato senso di appetito che nel complesso portano all'obesità, insulino-resistenza e al diabete mellito di questi topi (Zhang *et al.* 1994).

Anche nell'uomo il deficit congenito di leptina determina un'obesità grave, con alterata termogenesi e insulino-resistenza (Farooqi *et al.* 2002). La leptina svolge infatti un ruolo importante nella regolazione del bilancio energetico agendo a livello ipotalamico sui neuroni del nucleo arcuato dell'ipotalamo stimolando neuropeptidi che inibiscono l'assunzione di nutrienti e favoriscono un aumentato consumo energetico (Ahima *et al.* 2000). Nella fase di digiuno, il gene *lep* viene down-regolato, con una conseguente diminuzione di leptina circolante, la cui espressione risulta aumentata in seguito ad assunzione di cibo (Trayhurn *et al.* 2001).

Tuttavia, altri fattori sia metabolici che endocrini contribuiscono alla regolazione della sua trascrizione: insulina, glucocorticoidi, estrogeni e citochine infiammatorie come il TNF- $\alpha$  aumentano i livelli di leptina, mentre la bassa temperatura (Bing *et al.* 1998), gli stimoli adrenergici, l'ormone della crescita (GH), ormoni tiroidei e il fumo ne riducono i livelli (Trayhurn *et al.* 1999).

In aggiunta a queste importanti funzioni, quest'ormone regola la riproduzione, l'angiogenesi, la pressione arteriosa, l'osteogenesi e l'attività dell'asse ipotalamo-ipofisi-gonadi (Adamczak *et al.* 2013); nella risposta immunitaria la leptina è responsabile dell'aumentata capacità di produzione di citochine, fagocitosi dei macrofagi e della proliferazione delle cellule T.

L'adiponectina (APN) è un ormone proteico di 30 kDa, prodotto dal gene *apM1*, che è stato descritto per la prima volta nel 1995 ed è localizzato sul cromosoma 3 nella regione q27 (Coelho *et al.* 2013). Può circolare in forma di trimero a basso peso molecolare (LMW), di esamero a medio peso molecolare (MMW) o come complesso di maggiori dimensioni ad elevato peso molecolare (HMW). Ciascun monomero di adiponectina consta di 3 domini: una regione N-terminale variabile, un dominio a  $\alpha$ -elica di tipo collagenoso e un caratteristico dominio globulare al C- terminale (Kaser *et al.* 2008).

L'adiponectina è secreta quasi esclusivamente dagli adipociti ed ha proprietà insulina-sensibilizzanti (Adamczak *et al.* 2013): rappresenta la più abbondante proteina prodotta dal tessuto adiposo e la sua concentrazione varia da 5 a 30  $\mu\text{g}/\text{ml}$  e rappresenta circa lo 0,01% delle proteine plasmatiche totali (Arita *et al.* 1999). Questa adipochina gioca un ruolo chiave nel metabolismo di carboidrati e lipidi; la sua produzione è stimolata dall'insulina ed è inibita da TNF- $\alpha$  ed IL-6 (Kuryszko *et al.* 2016).

Ad oggi sono stati identificati due recettori dell'adiponectina, entrambi a sette domini transmembrana, ma differenti sia per la struttura che per la funzione. Il recettore di tipo 1 (ADIPO-R1) è principalmente espresso nel muscolo mentre ADIPO-R2 è principalmente espresso nel fegato. Gli effetti biologici sono collegati non solo alla concentrazione plasmatica ma anche alla specificità del tessuto (Oh *et al.* 2007). L'adiponectina non mostra comunque grandi fluttuazioni nella sua concentrazione plasmatica, a dimostrazione del fatto che il suo rilascio non è "acuto" ma regolato da variazioni metaboliche a lungo termine (Coelho *et al.* 2013).

Diversi studi hanno dimostrato che vi è una correlazione inversa tra i livelli dell'ormone in circolo e il rischio di obesità, di insulino-resistenza e patologie cardiovascolari. Al contrario della leptina, la

concentrazione plasmatica di adiponectina è più bassa negli obesi rispetto ai soggetti sani. La concentrazione plasmatica di adiponectina è più bassa anche nei maschi rispetto alle femmine e nei pazienti con diabete mellito di tipo 2 rispetto a soggetti sani (Adamczak *et al.* 2013). Nell'uomo, il fatto che i livelli circolanti di APN, prodotta dal tessuto adiposo, siano ridotti proprio negli individui obesi, che presentano invece uno sviluppo del comparto adiposo, risulta un paradosso: in realtà tale contraddizione può essere spiegata dal fatto che sembra esistere un meccanismo a *feedback* negativo sulla produzione di APN, che si attiva nel momento in cui si sviluppa l'obesità (Tilg *et al.* 2006). Si può quindi ipotizzare che l'anomalo sviluppo del tessuto adiposo determini una disfunzione nella secrezione di tale adipochina.

L'APN svolge numerose funzioni, alcune delle quali appaiono ancora oggi controverse. Certamente, un ruolo importante è correlato all'aumento di sensibilità all'insulina, poiché incrementa l'*uptake* di glucosio nel muscolo scheletrico, favorendo l'ossidazione degli acidi grassi attraverso la via dell'enzima adenosina mono-fosfato chinasi (AMP-K), e inibendo la produzione di glucosio da parte del fegato (Schondorf *et al.* 2005). Topi *knock-out* per il gene dell'adiponectina mostrano un'elevata resistenza insulinica (Maeda *et al.* 2002), fenomeno revertito in seguito a somministrazione di APN ricombinante (Yamauchi *et al.* 2001).

È stato dimostrato che l'adiponectina ha potenti proprietà anti-infiammatorie (Hyokjoon *et al.* 2013): questa adipochina è anche un importante mediatore nella risposta immunitaria, in grado di interagire con le cellule del sistema immunitario come macrofagi e monociti, inoltre favorisce la produzione di citochine anti-infiammatorie da parte dei monociti, macrofagi e cellule dendritiche (Tilg *et al.* 2006).

Per quanto riguarda i macrofagi, l'APN determina un'inibizione della produzione di citochine pro-infiammatorie (IL-6 e TNF- $\alpha$ ) attraverso l'inibizione di NF-kB (*Nuclear Factor kB*) e stimolando la produzione di un'altra citochina anti-infiammatoria, IL-10. Inoltre, l'APN modula l'attivazione delle cellule T e la funzione infiammatoria delle cellule NK (Hyokjoon *et al.* 2013); infine induce anche la fagocitosi per rimuovere le cellule apoptotiche (Takemura *et al.* 2007).

La proteina C reattiva ad alta sensibilità (*high sensitivity C Reactive Protein*, hs-CRP) è un marker di rischio per l'aterosclerosi coronarica ed è espressa anche nel tessuto adiposo. Una relazione inversa tra APN e CRP è stata rilevata in persone con aterosclerosi. Tale correlazione supporta l'ipotesi che l'APN è un antagonista dello sviluppo dell'aterosclerosi e dell'infiammazione vascolare. L'adiponectina inibisce l'adesione dei monociti all'endotelio, la produzione di citochine da parte dei macrofagi e la fagocitosi. In più, inibisce la produzione e l'attività del TNF- $\alpha$  e blocca la

trasformazione dei macrofagi in cellule schiumose (Lago *et al.* 2007).

La resistina è un ormone che deriva dagli adipociti, costituita da 114 aminoacidi e identificata per la prima volta nel topo obeso. È così chiamata a causa della sua resistenza all'azione dell'insulina (Ebtesam *et al.* 2013).

Nell'uomo, il gene della resistina è localizzato sul cromosoma 19 nella regione p13.2; viene secreto dagli adipociti in quantità notevoli durante l'adipogenesi. L'espressione di resistina è maggiore nel tessuto adiposo bianco rispetto al tessuto adiposo bruno, ed in particolare nel tessuto viscerale. Molti studi supportano l'ipotesi che ci sia un'associazione tra la resistina e l'insulino-resistenza: in esperimenti su modelli di topi obesi, dove tale ormone era stato neutralizzato usando un anticorpo, era stato osservato un aumento della tolleranza al glucosio e della sensibilità all'insulina. Al contrario iniezioni di resistina provocavano negli animali intolleranza al glucosio e iperinsulinemia (Banerjee 2003). Si ipotizza che l'ormone moduli le vie di segnalazione insulino-indipendenti (Hotamisligil 2003). La funzione della resistina non è quella di bloccare l'azione dell'insulina quando c'è disponibilità di alimenti, ma piuttosto di far adattare l'organismo ai momenti di digiuno, quando il livello di glucosio nel sangue diminuisce e viene favorita la mobilitazione degli acidi grassi. È stato osservato che negli obesi i livelli di resistina nel sangue sono aumentati (Ebtesam 2013); elevati livelli dell'ormone in circolo sono associati anche a processi aterogenici e alle relative complicanze (Piestrzeniewicz *et al.* 2008). La resistina è considerata una molecola pro-infiammatoria, che svolge un ruolo importante nella patogenesi del diabete e delle sue complicanze.

Il tessuto adiposo secerne fra le citochine pro-infiammatorie il TNF- $\alpha$  che svolge numerose funzioni, ad esempio è attivamente coinvolto nel processo infiammatorio, induce la produzione di altre citochine infiammatorie (IL-1 e IL-6) e favorisce l'insulino-resistenza (Fonseca-Alaniz *et al.* 2007). Più in particolare, agisce sui processi insulino-dipendenti, fra cui l'omeostasi dei carboidrati e il metabolismo dei lipidi (Sethi *et al.* 1999); inoltre inibisce la lipogenesi e stimola la lipolisi.

Il TNF- $\alpha$  è una citochina tipicamente pro-infiammatoria i cui livelli aumentano nei roditori e negli esseri umani obesi (Hyokjoon *et al.* 2013).

Sono molte altre le adipochine secrete dagli adipociti, fra cui ricordiamo:

- interleuchina-6 (IL-6), molecola proteica secreta da macrofagi e dai linfociti T, stimola la produzione di IgG e in dose limitata provoca la lipolisi. È altamente espressa nel tessuto adiposo e correla positivamente con l'obesità;

- la proteina che stimola l'acilazione (*Acylation-Stimulating Protein, ASP*) aumenta la lipogenesi e inibisce la lipolisi;
- l'inibitore-1 dell'attivatore del plasminogeno (*PAI-1*), che provoca la formazione di trombi e la rottura di placche aterogeniche instabili;
- angiotensinogeno, renina e l'enzima di conversione dell'angiotensina (*Angiotensin-Converting Enzyme, ACE*), che prendono parte alla differenziazione degli adipociti e alla lipogenesi;
- visfatina, che regola l'omeostasi glicemica;
- apelina, è coinvolta nella regolazione dell'ingresso nutrizionale ed ha inoltre diverse funzioni fisiologiche di regolazione dell'omeostasi dei fluidi, frequenza cardiaca e funzioni metaboliche. È prodotta dagli adipociti, e i livelli plasmatici aumentano nei roditori e negli esseri umani obesi.



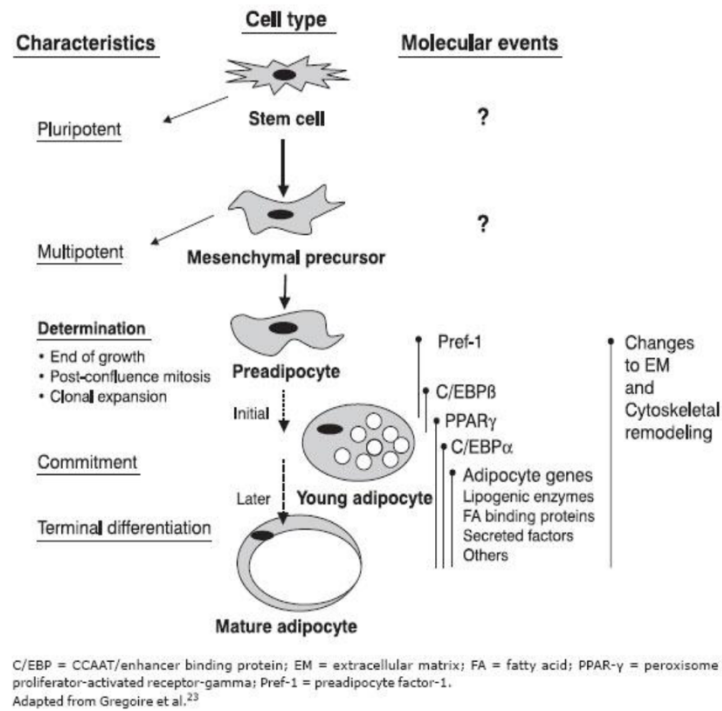
## 1.2 L'adipogenesi

L'adipogenesi rappresenta il processo di differenziamento che porta alla formazione di adipociti maturi a partire da precursori cellulari indifferenziati: i preadipociti sono piccole cellule con morfologia simile a quella dei fibroblasti che, dopo un'adeguata stimolazione, vengono convertiti in cellule adipose mature (Luo & Liu 2016, Ràfols 2014). Questo processo inizia in epoca fetale e prosegue dopo la nascita; è un meccanismo fondamentale per lo sviluppo del tessuto adiposo e nel mantenimento dell'omeostasi energetica sistemica. Durante l'infanzia e la pubertà il tessuto adiposo subisce una rapida espansione, dal momento che aumentano sia le dimensioni che il numero di cellule adipose. Durante la vita adulta il numero di adipociti rimane costante, salvo minime variazioni: ciò dimostra l'esistenza di un continuo processo di *turnover* cellulare che rigenera adipociti maturi indipendentemente dal bilancio energetico (Spalding *et al.* 2008).

Gli adipociti originano dalle cellule staminali mesenchimali (MSCs) che risiedono nello stroma del tessuto adiposo: essendo cellule multipotenti, esse possono differenziare verso fenotipo condrogenico, osteogenico, miogenico e adipogenico (Otto & Lane 2005); *in vitro* è stato poi dimostrato che, opportunamente stimolate, sono in grado di generare cellule differenziate anche di foglietti embrionali diversi dal mesodermico (Baglioni *et al.* 2009).

Sebbene l'esatto numero di stadi intermedi tra una cellula staminale mesodermica/mesenchimale e un adipocita maturo resti incerto, oggi si ritiene che la MSC sia in grado di generare un precursore precoce comune chiamato adipoblasto, che di seguito sviluppa preadipociti commissionati bianchi e bruni, i quali, sotto appropriate condizioni stimolatorie, differenziano in adipociti maturi di diversa tipologia (Gesta *et al.* 2007).

L'adipogenesi è un processo finemente controllato e prevede delle fasi distinte di commissionamento, espansione clonale e differenziamento terminale (Tang & Lane 2012, Ali *et al.* 2013), [figura 8].



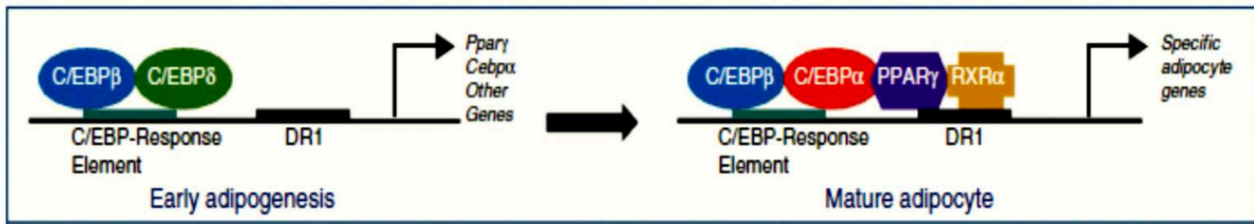
**Figura 8.** Rappresentazione schematica del differenziamento adipocitario. Tratta da Fonseca-Alaniz et al. 2007.

Il commissionamento indirizza la cellula staminale pluripotente verso la linea adipocitaria generando cellule precursori, i preadipociti, in risposta a stimoli che la inducono a differenziare (Tang & Lane 2012). I preadipociti, dopo un iniziale blocco della crescita, rientrano nel ciclo cellulare e vanno incontro ad un'espansione clonale, che determina un aumento del numero di cellule precursori, grazie ad un'appropriata combinazione di segnali mitogeni e adipogenici.

Durante il processo adipogenico la cellula cambia profondamente dal punto di vista morfologico passando da una forma allungata fibroblastoide, a quella sferica tipica degli adipociti. Le modificazioni morfologiche sono poi accompagnate da variazioni dei componenti della matrice extracellulare (ECM) e del citoscheletro (Gregoire *et al.* 1998).

Infine, il differenziamento terminale determina l'arresto della proliferazione e la graduale acquisizione delle caratteristiche della cellula matura. Questa fase è sostenuta dall'attivazione della cascata trascrizionale, tramite cui i preadipociti acquisiscono gradualmente le caratteristiche delle cellule mature, accumulando gocce lipidiche e acquistando la capacità di rispondere agli ormoni. Inoltre, esprimono, importanti proteine coinvolte nella sintesi dei trigliceridi, nell'aumento del numero dei trasportatori del glucosio e nell'incremento della sensibilità dei recettori dell'insulina (Tang & Lane 2012). L'adipocita neoformato è poi diventata una cellula endocrina altamente specializzata, capace di secernere importanti ormoni correlati alla regolazione dell'omeostasi energetica (Gregoire *et al.* 1998).

Questa fase di differenziamento terminale è sostenuta da una cascata di eventi trascrizionali (Rosen & MacDougald 2006); la prima ondata induce un'attivazione transiente di CCAAT/enhancer-binding protein- $\beta$  (C/EBP- $\beta$ ) e - $\delta$  (C/EBP- $\delta$ ), che a turno inducono direttamente l'espressione di C/EBP- $\alpha$  e PPAR $\gamma$  (peroxisome proliferator-activated receptor  $\gamma$ ), i due regolatori trascrizionali dell'adipogenesi (Ràfols 2014), [figura 7].



**Figura 7.** La cascata segnalatoria innescata da membri della famiglia C/EBP, culminante con l'attivazione di PPAR $\gamma$ , porta alla formazione dell'adipocita maturo. Tratta da Ràfols 2014.

### 1.2.1 Regolazione trascrizionale dell'adipogenesi

#### CCAAT/Enhancer Binding Proteins (C/EBP)

I tre membri della famiglia C/EBP- $\alpha$ , - $\beta$  e - $\delta$  sono i primi fattori di trascrizione ad essere coinvolti nella differenziazione adipocitaria (Otto & Lane 2005); l'espressione temporale di questi fattori rappresenta il principale meccanismo di regolazione durante il differenziamento adipocitario (Rosen & MacDougald, 2006). C/EBP- $\beta$  e C/EBP- $\delta$  sono due regolatori precoci del differenziamento, dal momento che la loro espressione viene indotta rapidamente: già dopo poche ore dall'innescamento dello stimolo adipogenico, si osservano concentrazioni molto elevate delle due proteine (Otto & Lane 2005). L'attivazione trascrizionale di C/EBP- $\beta$  è sotto il controllo di CREB (*cAMP response element binding protein*). Da uno studio condotto durante le fasi iniziali del differenziamento, è emerso che CREB viene fosforilato e quindi attivato in relazione all'espressione di C/EBP- $\beta$  (Zhang *et al*, 2004). Questa prima fase è sotto il controllo ormonale di due fattori che promuovono il differenziamento adipocitario, insulina e AMP ciclico (cAMP), che fosforilano e attivano la via di CREB (Otto & Lane 2005). C/EBP $\alpha$  è un fattore di trascrizione pleiotropico, in grado di attivare numerosi geni tessuto adiposo-specifici, che infatti contengono a livello del promotore le sequenze consenso per C/EBP (Otto & Lane 2005). Svolge anche una funzione anti-mitotica, bloccando

l'espansione clonale dei pre-adipociti, requisito indispensabile per un corretto differenziamento (Otto & Lane 2005). Bloccando l'espressione di questo gene si osserva un'inibizione dell'adipogenesi; inoltre, topi deleti per C/EBP- $\alpha$  mostrano dei difetti nell'accumulo di lipidi. Questi dati provano quanto sia importante la presenza di C/EBP- $\alpha$  che costituisce un fattore necessario per il differenziamento adipocitario. Tuttavia, i fattori di trascrizione C/EBPs non possono funzionare in modo efficiente in assenza di PPAR $\gamma$  (Rosen & MacDougald 2006).

### *Perixosome Proliferator-Activated Receptors (PPARs)*

PPAR $\gamma$  è un fattore trascrizionale appartenente alla superfamiglia dei recettori nucleari ormonali, che comprende il recettore dell'acido retinoico, il recettore degli ormoni tiroidei e i recettori per la vitamina D<sub>3</sub>. Esistono due isoforme di PPAR $\gamma$  (PPAR $\gamma$ 1 e PPAR $\gamma$ 2), generate da uno splicing alternativo dell'RNA messaggero (Tang & Lane 2012), entrambe risultano essere espresse a livello del tessuto adiposo, ma solo l'isoforma 2 costituisce un marcatore specifico del tessuto adiposo (Fajas *et al.* 1997). Una volta riconosciuto il ligando, il complesso forma un eterodimero con il recettore per l'acido retinoico RXR (*Retinoic X Receptor*) e lega le sequenze PPREs (*PPAR $\gamma$  Responsive Elements*) presenti nei promotori dei geni target, grazie anche all'aiuto di co-regolatori tessuto specifici, inducendone la trascrizione (Luconi *et al.* 2010). PPAR $\gamma$  rappresenta il regolatore trascrizionale principale del processo di adipogenesi (Martina *et al.* 2014): è stato, infatti, dimostrato che l'attivazione di PPAR $\gamma$  è necessaria e sufficiente per la differenziazione cellulare (Tontonoz & Spiegelman 2008) e, ad oggi, non è stato identificato nessun fattore in grado di promuovere l'adipogenesi in assenza di PPAR $\gamma$ . Quest'ultimo viene espresso durante il differenziamento ed è responsabile dell'attivazione trascrizionale di numerosi geni coinvolti nell'*uptake* e nel trasporto degli acidi grassi (*Fatty Acid Binding Protein*, FABP-4) e dei geni per la lipasi delle lipoproteine, per l'acilCoA sintasi e per la PEPCK (Tontonoz *et al.* 1994).

L'importanza che PPAR $\gamma$  riveste nel processo adipogenico è ampiamente documentata in letteratura.

Ipers-esprimendo il recettore si può osservare che anche cellule non-adipogeniche intraprendono la via differenziativa (Tontonoz *et al.*, 1994), inoltre, almeno per il momento, non è stato scoperto alcun fattore in grado di promuovere l'adipogenesi in assenza di PPAR $\gamma$  (Rosen & MacDougald, 2006). È stato dimostrato che topi con delezioni specifiche sul gene del PPAR $\gamma$  sono affetti da lipodistrofia, mentre varianti dominanti negative di PPAR $\gamma$  inibiscono la conversione dei

preadipociti in adipociti maturi (Vázquez-Vela *et al.* 2008).

PPAR $\gamma$  è anche richiesto nel mantenimento degli stadi di differenziamento terminali degli adipociti, tanto che alterazioni nella sua funzione dovute all'iper-espressione di una forma di dominante negativo del gene comportano la downregolazione di geni cruciali nel metabolismo lipidico e nella segnalazione insulinica, oltre che una riduzione della dimensione cellulare e nel contenuto in grassi di adipociti differenziati della linea cellulare 3T3-L1 (Tamori *et al.* 2002). In supporto di questi dati, l'ablazione selettiva di PPAR $\gamma$  in adipociti maturi bianchi e bruni porta alla morte di queste cellule, pur avendo effetto minimo sulla differenziazione dei preadipociti (Imai *et al.* 2004).

PPAR $\gamma$  viene attivato da C/EBP- $\beta$  e C/EBP- $\delta$  e regola assieme a C/EBP- $\alpha$  l'espressione dei geni target, tra i quali ritroviamo lo stesso C/EBP $\alpha$  che svolge un'azione di *feedback* positivo sul processo in quanto si lega direttamente al promotore di PPAR $\gamma$ , inducendone l'espressione genica (Wu *et al.* 1996). Tuttavia, anche in assenza di C/EBP $\alpha$ , PPAR $\gamma$  è in grado di indurre una normale differenziazione, sebbene gli adipociti così differenziati presentino una ridotta sensibilità insulinica (Farmer 2006). Al contrario, C/EBP $\alpha$  da solo non è in grado di indurre adipogenesi. Si può quindi concludere che il PPAR $\gamma$  è quindi un fattore non solo necessario ma anche sufficiente per la differenziazione delle cellule adipose (Rosen & MacDougald 2006).

### 1.2.2 Regolazione extracellulare dell'adipogenesi

#### *Segnalazione Wnt*

WNTs (*Wingless-type MMTV integration site family members*) sono una famiglia di 19 glicoproteine che agiscono in modo autocrino e paracrino nel regolare l'omeostasi e il rimodellamento dei tessuti adulti (Logan & Nusse 2004). I WNTs producono i loro effetti attraverso vie di segnalazione canoniche e non-canoniche, grazie alle quali esercitano un controllo sulla proliferazione, la sopravvivenza, il destino e il comportamento cellulare. In particolare, WNTs sembrano mediare il *crossstalk* fra le cellule adipose e sono in grado di regolare il *self-renewal* delle cellule staminali mesenchimali (MSC) e la capacità proliferativa e differenziativa dei preadipociti (Christodoulides *et al.* 2009). Le proteine Wnts si legano a recettori della famiglia Frizzled, che di seguito attivano cascate di segnalazione  $\beta$ -catenina dipendenti e indipendenti. Sebbene il *pathway* di Wnt sia implicato nello sviluppo del mesoderma, una volta che la MSC è formata Wnt agisce come inibitore del differenziamento in senso adipogenico, favorendo quello in senso osteogenico o miogenico (Kennell & MacDougald 2005). In particolare, la sostenuta attivazione della via di

segnalazione di Wnt, garantita dall'iper-espressione di Wnt10b, Wnt1 o di forme mutanti di  $\beta$ -catenina, previene il differenziamento adipogenico per via del blocco dell'espressione dei vari geni regolati da C/EBP $\alpha$  e PPAR $\gamma$ .

Wnt10b è altamente espresso nelle cellule stromali del tessuto adiposo e la sua espressione diminuisce rapidamente dopo l'inizio dell'adipogenesi (Ross *et al.* 2000). L'inibizione del *signalling* di Wnt è un prerequisito fondamentale per la differenziazione dei preadipociti umani e dei preadipociti murini 3T3-L1, attraverso l'induzione di PPAR $\gamma$  e C/EBP $\alpha$  (Christodoulides *et al.* 2006). Esperimenti di iper-espressione di Wnt10b nei topi hanno dimostrato una forte riduzione dell'adipogenesi (Wright *et al.* 2007). Al contrario, l'inibizione del *signalling* di Wnt causa il differenziamento spontaneo dei preadipociti e topi "knock-out" per Wnt10b mostrano un incremento del potenziale adipogenico nei mioblasti (Vertino *et al.* 2005). Una molecola importante coinvolta nell'inibizione di Wnt e nell'induzione adipogenica delle cellule staminali mesenchimali è Pref-1: se espressa costitutivamente in linee cellulari murine 3T3-L1 blocca il *signalling* Wnt/ $\beta$ -catenina e promuove l'adipogenesi (Christodoulides *et al.* 2006).

#### TGF- $\beta$ e BMPs

Le proteine BMPs (*bone morphogenetic proteins*) sono membri della superfamiglia dei TGF- $\beta$  (*Transforming Growth Factor- $\beta$* ) e giocano un ruolo critico nel commissionamento delle MSCs verso il *lineage* adipocitario. Sono stati descritti 14 elementi all'interno di questa famiglia (dalla BMP-2 alla BMP-15): tra questi, BMP-4 è in grado di stimolare la differenziazione della staminale mesenchimale in senso adipocitario (Tang *et al.* 2004). Al contrario, BMP-2 e BMP-7 promuovono una differenziazione in senso osteogenico della MSC bloccando l'adipogenesi, per quanto questi effetti siano variabili e dipendenti dalla loro concentrazione (Tang *et al.* 2004, Wang *et al.* 1993).

Allo stesso modo modelli murini deleti per Shn-2 (*Drosophila Schnurri-2*), una proteina contenente un dominio *zinc finger* che in seguito a stimolo di BMP-2 opera in cooperazione con SMAD 1, SMAD 4 e C/EBP $\alpha$  per l'attivazione di PPAR $\gamma$ , hanno mostrato una ridotta massa di tessuto adiposo bianco e, in misura minore, anche di grasso bruno, suggerendo che la via di *signalling* Shn-BMP ricopre un ruolo chiave per l'adipogenesi (Jin *et al.* 2006).

## FGFs

Il sistema FGFs (*Fibroblast Growth Factors*) consiste di 4 recettori e di almeno 23 fattori di crescita; di questi, la maggior parte è implicata nello sviluppo e nella differenziazione dei tessuti mesodermici. Nello specifico FGFs 1, 10, 16 e 19 sono coinvolti nella formazione del tessuto adiposo. FGF-10 agisce come fattore di crescita per i preadipociti del WAT; al contrario, FGF-16 è espresso predominantemente nel BAT (Konishi *et al.* 2000, Yamasaki *et al.* 1999). FGF-19 è responsabile dell'accrescimento della massa di BAT e della conseguente ridotta suscettibilità all'obesità indotta dalla dieta; FGF-1 stimola l'adipogenesi dei preadipociti umani e supporta anche lo sviluppo della vascolarizzazione all'interno degli accumuli adiposi (Hutley *et al.* 2004, Tomlinson *et al.* 2002).

Altro caratteristico membro di questa famiglia è FGF-21: per quanto non direttamente coinvolto nel processo di adipogenesi, questo fattore tramite meccanismi autocrini e/o paracrini induce l'up-regolazione di PGC1 $\alpha$  (*Peroxisome proliferator-activated receptor- $\alpha$  coactivator*), implicato nella regolazione del metabolismo energetico. Inoltre, in seguito a stimolo generato dalle basse temperature, FGF-21 può stimolare il fenomeno di browning e l'espressione di geni adibiti alla termogenesi nel BAT e nel WAT inguinale (Lee *et al.* 2014, Fisher *et al.* 2012, Hondares *et al.* 2011).

## Segnalazione Hedgehog e fattori di trascrizione GATA

Gli omologhi di Hedgehog (Hh) dei mammiferi, ossia Sonic hedgehog (Shh), Indian hedgehog (Ihh) e Desert hedgehog (Dhh), influenzano fortemente il destino delle MSCs: l'attivazione del *pathway* Hh da parte di Shh e Ihh può bloccare la progressione della cellula mesenchimale verso il *lineage* adipocitario, mentre l'inibizione della segnalazione Hh con un antagonista del recettore Hh, *smoothed (smo)*, o con una forma di dominante negativo per il gene del fattore di trascrizione a valle, Gli2, stimola l'adipogenesi (Suh *et al.* 2006).

La funzione anti-adipogenica di Hh viene mediata dai fattori di trascrizione della famiglia GATA e si realizza attraverso l'interazione tra i GATAs e C/EBP- $\alpha$  o C/EBP- $\beta$ , che si traduce nella soppressione dell'attività di promotore di PPAR $\gamma$ 2. A dimostrazione di questo fatto, le cellule staminali embrionali mancanti di entrambe le copie del gene GATA-3 possiedono un'aumentata capacità di differenziare verso adipociti maturi *in vitro* (Tong *et al.* 2005).

### *Via di signaling di Notch*

Notch è un recettore transmembrana che lega la famiglia di ligandi Delta-like/Jagged connessi alla membrana. L'attivazione del *signaling* di Notch prevede un taglio proteolitico e la traslocazione del dominio intracellulare nel nucleo. Tale via di segnalazione gioca un ruolo chiave in numerosi processi, come lo sviluppo immunologico, la neurogenesi, l'osteogenesi e l'adipogenesi (Aminova & Wilson 2007). Bloccando Notch si osserva infatti un'inibizione dell'espressione di PPAR $\gamma$  e C/EBP $\alpha$ . Inoltre, l'espressione costitutiva del dominio intracellulare di Notch interferisce con il *signaling* di Wnt, inducendo la differenziazione verso adipociti maturi (Sciaudone *et al.* 2003). L'attivazione di Notch guida anche la down-regolazione di Pref-1 (Ross *et al.* 2004).

### *DLK/Pref-1*

Pref-1 (*Preadipocyte Factor-1*), anche conosciuto come DLK-1 (*Drosophila Homolog-Like 1*) viene considerato il marcatore dei preadipociti e costituisce un regolatore negativo dell'adipogenesi (Rosen & MacDougald 2006). Pref-1 viene espresso ad elevati livelli sia nei preadipociti bianchi che bruni e decresce marcatamente nel corso del differenziamento (Kim *et al.* 2007). Pref-1 è un membro della famiglia Notch, viene sintetizzato inizialmente come proteina transmembrana e poi successivamente processato fino a dare una proteina solubile che agisce come inibitore dell'attività del PPAR $\gamma$  e quindi dell'adipogenesi. Per questo motivo la repressione dei livelli di Pref-1 rappresenta lo step permissivo nella fase di passaggio da preadipocita a adipocita maturo. Infatti, l'iper-espressione della proteina Pref-1 in animali da esperimento ha mostrato una riduzione dell'adipogenesi, mentre la sua soppressione ha dimostrato un accumulo di tessuto adiposo (Moon *et al.* 2002).

### *Insulina e IGF-1*

L'insulina è un fattore indispensabile per l'adipogenesi. Nelle prime fasi del differenziamento l'insulina funziona soprattutto attraverso la via di *signaling* a valle del recettore del fattore di crescita IGF-1 (*insulin like growth factor-1*), dal momento che nei preadipociti il recettore dell'IGF-1 è molto più espresso del recettore insulinico (IR), (Smith *et al.* 1988). Anche i componenti a valle del *signaling* dell'insulina/IGF-1 sono importanti per il differenziamento adipogenico: infatti, in assenza delle proteine IRS (*insulin receptor substrate*) è stato dimostrato un arresto



dell'adipogenesi (Rosen & MacDougald 2006).

Altro gene coinvolto nella regolazione dell'adipogenesi risulta essere SREBP-1c (*Sterol Regulatory Element-Binding Proteins-1c*), che ha un ruolo pro-adipogenico in quanto promuove l'accumulo di lipidi, la loro captazione e la biosintesi. Nel programma di differenziazione, l'espressione di SREBP-1c è attivata a valle dell'espressione di C/EBP $\alpha$  e PPAR, quindi è implicato negli eventi terminali della differenziazione degli adipociti (Tang & Lane 2012).

In aggiunta ai numerosi fattori trascrizionali che controllano l'adipogenesi, sono stati descritti anche diversi nuovi meccanismi di regolazione, che comprendono le modificazioni degli istoni, il rimodellamento della cromatina ed i microRNA. Le analisi genomiche delle modificazioni della cromatina, dell'espressione dell'mRNA e dei fattori di trascrizione hanno mostrato come il rimodellamento della cromatina influisca sull'espressione genica adipogenica. Ad esempio, il selettivo reclutamento da parte di PPAR $\gamma$  di differenti HATs (*Histone Acetyltransferasi*) e HDACs (*Histone Deacetylase*) permette di avere divergenti effetti su differenti promotori (Guan *et al.* 2005). Anche un gran numero di microRNA è stato visto essere coinvolto nel controllo di tale espressione (Lowe *et al.* 2011). Alcuni microRNA sembrano accelerare l'adipogenesi, mentre altri sembrano regolarla negativamente.

### 1.3 La cellula staminale

Le cellule staminali (*Stem Cells*, SC) sono per definizione cellule indifferenziate dotate di due caratteristiche fondamentali:

- capacità di auto rinnovamento (*self-renewal*), ovvero la capacità di generare cellule con le medesime caratteristiche della cellula madre ad ogni duplicazione cellulare;
- potenzialità di differenziazione *multilineage*, quindi la possibilità di dare origine a diversi tipi cellulari attraverso il processo di differenziamento (Avasthi *et al.* 2008).

In base alla potenzialità differenziativa, si possono distinguere quattro sottogruppi di cellule staminali (Ratajczak *et al.* 2008):

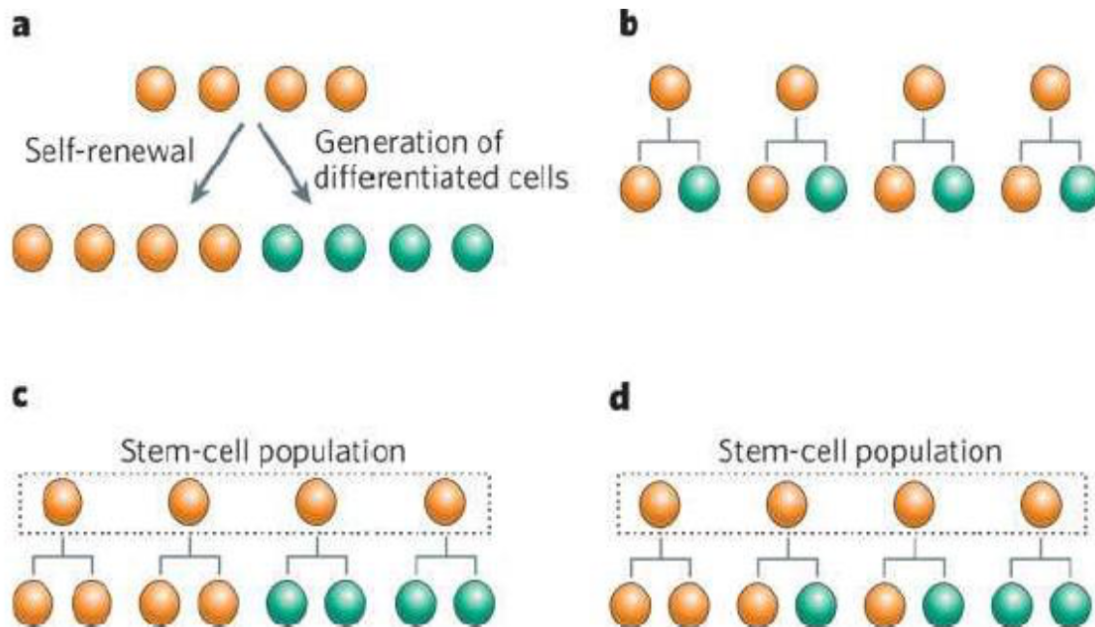
- totipotenti, in grado di differenziare verso qualsiasi tipo cellulare dei foglietti embrionali primitivi (endoderma, ectoderma e mesoderma) e dei tessuti extraembrionali (placenta e cordone ombelicale);
- pluripotenti, che mantengono una capacità differenziativa multiforme potendo dare origine a numerose tipologie cellulari specializzate, appartenenti ai tre foglietti embrionali ma non ai tessuti extra-embriionali;
- multipotenti, che possono generare diverse tipologie cellulari appartenenti ad un unico foglietto embrionale (endoderma, ectoderma o mesoderma);
- unipotenti, in grado di rigenerare una specifica tipologia di cellule differenziate.

In base al tessuto di origine, le cellule staminali possono essere suddivise in:

- cellule staminali embrionali (*Embryonal Stem Cells*, ESCs), derivate dalla "*Inner Cell Mass*" (ICM) della blastocisti, hanno potenziale totipotente;
- cellule staminali adulte (*Adult Stem Cells*, ASCs), residenti nella maggioranza dei tessuti dell'individuo adulto e possono includere anche quelle di derivazione fetale e quelle del sangue di cordone ombelicale (Zuk 2010), hanno potenziale differenziativo più ridotto da pluripotenti a unipotenti.

Le cellule staminali risiedono in particolari microambienti chiamati "nicchie" dove possono risultare quiescenti per lungo tempo, fino a quando, opportuni stimoli non ne inducono l'ingresso nel ciclo cellulare. Una volta riattivate, vanno incontro a divisione asimmetrica generando due cellule figlie: una cellula figlia sarà identica alla madre e servirà a mantenere inalterato il *pool* di

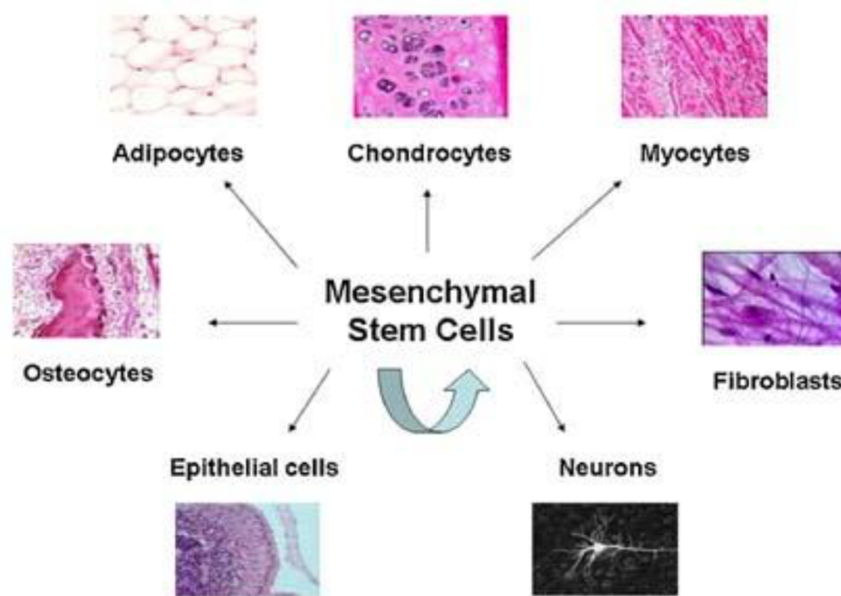
cellule staminali, l'altra invece andrà incontro a differenziamento (Knoblich 2008), [figura 10]. Nicchie di cellule staminali si possono ritrovare nei tessuti adulti, dove garantiscono un continuo apporto di cellule capaci di differenziare nel fenotipo maturo per far fronte al rimodellamento o all'omeostasi tissutale.



**Figura 10.** Strategie di divisione asimmetrica di cellule staminali. La cellula staminale (arancio) ha il doppio compito di autorinnovare il comparto e di generare cellule differenziate (verde). Tratta da Morrison & Kimble 2006.

Le principali fonti di cellule staminali, oltre all'embrione e al sangue del cordone ombelicale, sono i tessuti e gli organi adulti, la maggior parte dei quali sembra disporre di una propria componente staminale. Il midollo osseo (*bone marrow, BM*) rappresenta uno degli esempi più emblematici, tale tessuto presenta tre diversi tipi di cellule staminali:

- cellule staminali ematopoietiche (*Hematopoietic Stem Cells, HSCs*) che danno origine ai vari tipi di cellule del sangue (leucociti, eritrociti e piastrine);
- cellule staminali endoteliali (che diventeranno poi cellule endoteliali);
- cellule staminali mesenchimali (*Mesenchymal Stem Cells, MSCs*), popolazione eterogenea di cellule pluripotenti che hanno la capacità di differenziare sia *in vivo* che *in vitro* in vari tipi cellulari, quali adipociti, osteociti, condrociti, miociti, fibroblasti, cellule endoteliali e neuroni (Liu *et al.* 2009), [figura 11].



**Figura 11.** Potenziale multidifferenziativo di una cellula staminale mesenchimale pluripotente. Tratta da Liu *et al.* 2009.

### 1.3.1 La cellula staminale mesenchimale

Le cellule staminali mesenchimali, scoperte più di 40 anni fa (Friedenstein *et al.* 1966), vengono identificate come cellule clonogeniche derivanti da midollo e contraddistinte da una serie di caratteristiche *in vitro*, tra cui la presenza di alcuni *markers* fenotipici peculiari e proprietà funzionali e di differenziamento multipotente (Liu *et al.* 2009). Le MSCs sono state descritte come cellule aderenti alla plastica e che presentano una morfologia fibroblastoide (Haniffa *et al.* 2009). Inoltre, hanno la peculiare capacità di differenziare spontaneamente in tutti i tessuti specializzati di derivazione embrionale mesodermale (tessuto osseo, tessuto cartilagineo e tessuto adiposo). Le MSC del midollo osseo presentano uno specifico pattern antigenico, molecolare e funzionale.

Dall'analisi immunofenotipica, queste cellule sono caratterizzate dall'assenza di espressione di *markers* di contaminazione ematopoietica (CD45, CD14, CD34) ed endoteliale (CD31), hanno bassa immunogenicità, dal momento che non esprimono HLA-II (*histocompatible locus antigen-II*), e possiedono elevate capacità immunosoppressive (Wang *et al.* 2005). Queste cellule esprimono antigeni specifici, tra cui CD29, CD44, CD73, CD90, CD105 e l'HLA-I (*histocompatible locus antigen-I*), (Zannettino *et al.* 2008, Pittenger *et al.* 1999). Le BM-MSCs esprimono inoltre geni caratteristici della staminalità, tra i quali ricordiamo i fattori di trascrizione Oct4 e Nanog, che mantengono le

cellule in uno stato indifferenziato (Hua *et al.* 2009, Pei 2009).

Oltre che dal midollo osseo, successivamente, le MSCs sono stata isolate in maniera quasi ubiquitaria, tanto da fare ipotizzare la loro presenza in tutti gli organi ed i tessuti postnatali. Infatti, nonostante la principale fonte di MSCs rimanga il midollo osseo, queste possono essere anche estratte da sangue del cordone ombelicale, dalla placenta, da sangue periferico e dal tessuto adiposo; questa ultima fonte di MSCs è considerata molto promettente dato che è possibile ottenere una grande quantità di cellule in modo scarsamente invasivo mantenendo lo stesso potenziale differenziativo delle MSCs da midollo (Kuhbier *et al.* 2010).

### 1.3.2 La cellula staminale adiposa

Allo scopo di ricercare nuove fonti di staminali, all'inizio del ventunesimo secolo ci si è concentrati sulla ricerca delle cellule staminali d'organo adulto, in particolare di tessuti dove il reperimento delle staminali non sia invasivo, come nel caso del tessuto adiposo (Frese *et al.* 2016, Zuk *et al.* 2002).

Il tessuto adiposo, come il midollo osseo, è un tessuto di derivazione mesenchimale e contiene uno stroma di sostegno che risulta facile da isolare e con una buona resa in termini di quantità. L'organo adiposo presenta cellule staminali (0,1% della massa) in grado di differenziare mantenendo ed espandendo in alcuni casi la massa adiposa. L'origine e le caratteristiche della cellula staminale adiposa sono ad oggi molto dibattute, in quanto non è chiaro se la cellula staminale sia residente, se origini da un precursore comune ad altri *lineages* e se i diversi depositi adiposi, caratterizzati da una diversa localizzazione anatomica e funzione, presentino cellule staminali diverse (bianco sottocutaneo e viscerale, *brown* e *brite*).

Le cellule staminali adipose, chiamate ADSCs (*Adipose Derived Stem Cells*) o ASCs (*Adipose Stem Cells*), precursori degli adipociti, presentano un potenziale di differenziamento simile a quello delle cellule staminali mesenchimali e mostrano l'espressione di specifici *markers* di staminalità.

Inoltre, l'elevata accessibilità del tessuto adiposo sottocutaneo con una minima invasività, le semplici procedure di isolamento e la qualità delle cellule staminali, sono tutti elementi che rendono le ASCs una fonte di staminali ottimale per la medicina rigenerativa (Kalinina *et al.* 2011).

Le MSCs poste in coltura sono facilmente identificabili in quanto formano colonie di cellule aderenti caratterizzate dalla tipica morfologia fibroblastoide. Tali cellule possono quindi essere

facilmente isolate, espanse (in quanto possiedono elevato potenziale proliferativo) e indotte a differenziare mediante l'utilizzo di terreni specifici (Pountos & Giannoudis 2005). Nel corso dell'induzione differenziativa, le cellule staminali mesenchimali adipose diventano preadipociti, in una prima fase caratterizzata da uno specifico commissionamento verso la linea adipocitaria, perdendo quindi a questo stadio la capacità di differenziare negli altri *lineages*. Questa prima fase di differenziamento è conosciuta come determinazione di *lineages* (Tang & Lane 2012).

Il tessuto adiposo sottocutaneo è costituito prevalentemente da adipociti maturi e da un'eterogenea frazione vascolare stromale (*stromal vascular fraction, SVF*) che include fibroblasti, cellule endoteliali, preadipociti, cellule di muscolo liscio vascolare, linfociti, monociti e ADSCs; queste ultime rappresentano circa lo 0,1% della massa adiposa. Il metodo più ampiamente utilizzato per isolare ADSCs si basa su una digestione in collagenasi, seguita da una separazione per centrifugazione in gradiente di densità (Xu *et al.* 2003). *In vitro*, le ADSCs mostrano morfologia fibroblastoide e mancano delle gocce lipidiche intracellulari tipiche dell'adipocita maturo. Queste cellule isolate in coltura si espandono tipicamente adese su piastra, in monostrato, con l'ausilio di *medium* caratteristici contenenti circa il 10-20% di siero fetale bovino (Sterodimas *et al.* 2010). Similmente alle MSCs, le ADSCs mostrano inoltre un caratteristico pattern di marcatori, tra cui CD90, CD105, CD73, CD44 e CD166, e mancano di alcuni *markers* emopoietici come CD45 e CD34; a conferma del loro potenziale, esprimono inoltre i fattori di trascrizione Sox-2, Nanog e Oct-4, come dimostrato da alcuni test di staminalità (De Francesco *et al.* 2015). Infine, paragonate alle mesenchimali da midollo, le staminali adipose presentano minime differenze circa potenziale di differenziamento e attività immunomodulatoria, ma sembrano essere geneticamente e morfologicamente più stabili in colture a lungo termine, con basso tasso di senescenza e alto rate proliferativo (Strioga *et al.* 2012).

Nel nostro laboratorio sono state isolate e caratterizzate due popolazioni di cellule staminali adulte ottenute da biopsie di tessuto adiposo bianco sottocutaneo (S-ASC) e viscerale (V-ASC) (Baglioni *et al.* 2012, 2009). Queste cellule mostrano un profilo immunofenotipico molto simile a quello delle cellule staminali mesenchimali umane derivanti dal midollo osseo data l'espressione di antigeni di superficie specifici, quali CD29, CD44, CD73, CD90 e CD105 e HLA-I. Inoltre, è stata valutata la multipotenzialità di queste popolazioni, data la capacità di differenziare *in vitro* verso i *lineages* adipogenico, osteogenico, condrocitario, muscolare e neuronale. In seguito a studi di caratterizzazione realizzati su colture primarie ottenute da biopsie di SAT e VAT, è stato provato che

i profili di espressione dei progenitori di cellule adipose umane, ottenuti da depositi viscerali omentali e sottocutanei, non presentano differenze morfologiche (Baglioni *et al.* 2012, 2009) ma mostrano sostanziali differenze nel potenziale differenziativo e nel profilo secretivo (Baglioni *et al.* 2012, Tchkonja *et al.* 2006, 2005).

Successivamente, è stata isolata e caratterizzata una popolazione di cellule staminali adulte derivanti da tessuto adiposo bruno: nello specifico, è stata dimostrata la presenza di isole di BAT localizzate nel tessuto adiposo bianco perisurrenalico in pazienti adulti con feocromocitoma, neoplasia che secreta elevate quantità di catecolamine. Questo tessuto consiste prevalentemente di cellule bruno, quindi di adipociti bruni che compaiono nel processo di *browning* del WAT (Di Franco *et al.* 2014).

La caratterizzazione di queste popolazioni di cellule staminali ha quindi consentito lo sviluppo di modelli cellulari umani che permettono lo studio *in vitro* dei processi fisiopatologici coinvolti nel differenziamento di precursori cellulari in adipociti, al fine di poter sviluppare nuove strategie terapeutiche per il trattamento dell'obesità e dei disordini metabolici.

### **1.3.3 Origine del tessuto adiposo: determinazione di *lineage***

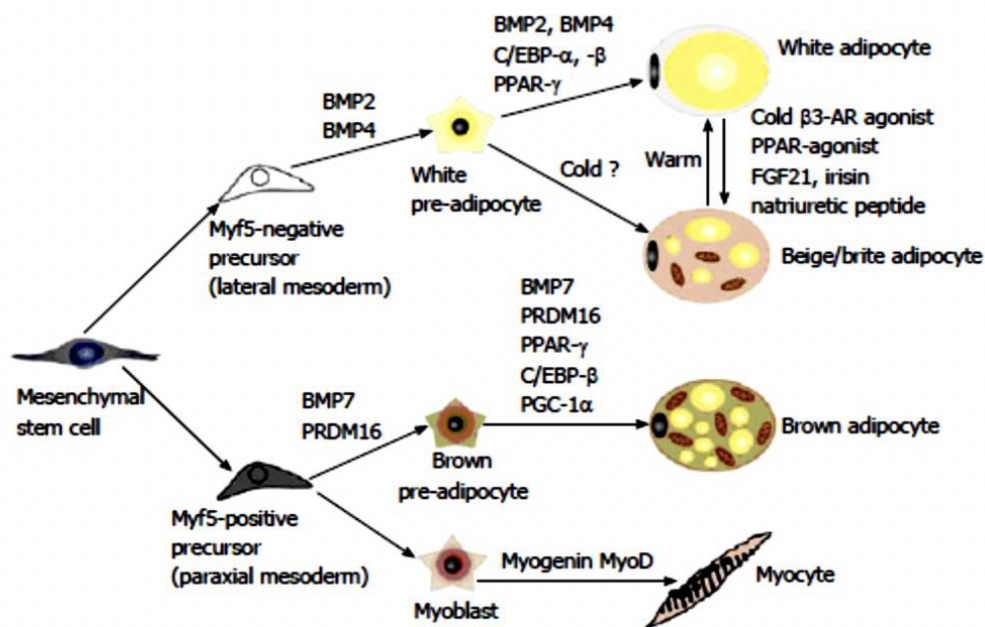
Sebbene gli adipociti bianchi e gli adipociti bruni derivino entrambi dal mesoderma e dalla stessa staminale mesenchimale, le varie differenze nei loro pattern di sviluppo hanno fatto ipotizzare, fin dal passato, che queste cellule discendano da precursori distinti. Ad ulteriore conferma di ciò, il BAT si sviluppa molto più precocemente del WAT (già nella vita fetale), quando invece la formazione del WAT comincia nelle fasi più tardive dello sviluppo embrionale per poi espandersi fondamentalmente dopo la nascita (Park *et al.* 2014, Ràfols 2014).

Per quanto riguarda la specificità di commissionamento, studi recenti sostengono che i preadipociti bianchi e bruni originano da due diversi *lineages* cellulari e che, in maniera indipendente gli uni dagli altri, sono predestinati ad un caratteristico processo di differenziamento. I preadipociti di WAT e BAT presentano un differente *pattern* di espressione caratterizzato, nel caso dei bruni, dall'espressione specifica del fattore miogenico 5 (*Myf-5-lineage*) a comune con il muscolo scheletrico: Myf-5 è un fattore di trascrizione chiave nella regolazione della differenziazione o della miogenesi muscolare, in particolare nello sviluppo del muscolo scheletrico.

Quindi i preadipociti bruni e i mioblasti scheletrici presentano un precursore comune esprime Myf-5 non condiviso dal preadipocita bianco, che quindi non può differenziare in una cellula muscolare scheletrica.

Elemento cruciale in grado di stabilire se il progenitore cellulare differenzierà in adipocita bruno o cellula muscolare, per quanto riguarda il *lineage* Myf-5 positivo, è il fattore di trascrizione PRDM16: la sua espressione precoce induce differenziamento in senso adipocitario, il suo silenziamento stimola un commissionamento di tipo muscolare. Questo *switch* tra miociti e preadipociti bruni sta dunque ad indicare una diversa origine per le due tipologie di tessuto adiposo, che potrebbe inoltre fornire una spiegazione plausibile sul perché le cellule del BAT, che esprimono UCP-1, siano maggiormente specializzate nel catabolismo lipidico, profilo più simile al metabolismo ossidativo del muscolo scheletrico (Timmons *et al.* 2007).

Benchè gli adipociti originino da due differenti *lineages*, il successivo processo di adipogenesi coinvolge una serie di fattori di trascrizione comuni sia per il WAT che per il BAT, tra i quali operano specialmente PPAR $\gamma$  e le proteine C/EBPs, [figura 12].



**Figura 12.** Schematizzazione del processo di differenziamento in adipociti bianchi, beige e bruni. Tratta da Park *et al.* 2014.



I precursori Myf-5+ sono indotti a trasformarsi in adipociti bruni maturi grazie alla proteina BMP-7, al recettore PPAR $\gamma$  e alle proteine C/EBPs, in cooperazione con il co-regolatore trascrizionale PRDM16 e PGC-1 $\alpha$ . I precursori Myf-5-, sono più che altro sostenuti da BMP-2 e BMP-4, oltre che dalle proteine C/EBP $\alpha$ ,  $\beta$  e PPAR $\gamma$  (Park *et al.* 2014).

Tuttavia, la sola distinzione tra *lineages* Myf-5 positivo e negativo risulta essere un'eccessiva semplificazione: esistono due diverse tipologie di BAT. Finora è stato infatti descritto il BAT classico (quello presente nell'uomo adulto in forma vestigiale nei depositi interscapolari, lungo il collo e la colonna vertebrale, e perirenali), i cui adipociti presentano una marcatura di tipo miogenico (Myf5+); studi più recenti hanno però dimostrato il differenziamento di adipociti bruni positivi per UCP-1 ma Myf5-, dispersi all'interno dei depositi di WAT. Questa seconda categoria di adipociti mostra un profilo di espressione molto simile a quello delle cellule adipose bianche ma esprime anche UCP-1 che, pur presentando livelli più bassi rispetto agli adipociti bruni classici, può essere indotta da stimoli di tipo adrenergico. Queste cellule *brown-like* immerse nel WAT e Myf5-, sono state denominate *beige* (per la loro colorazione intermedia tra adipocita bianco e bruno) o *brite* (*brown-in-white*, in riferimento alla diversa localizzazione rispetto ai depositi bruni classici), e si sono mostrate particolarmente sensibili all'ormone irisina (Wu *et al.* 2012, Nedergaard *et al.* 2010).

## 1.4 Disfunzioni metaboliche legate al tessuto adiposo

Il tessuto adiposo svolge un ruolo fondamentale nel garantire l'equilibrio e il bilancio energetico dell'organismo. Da una parte, conserva l'eccesso di energia sotto forma di lipidi e dall'altra controlla la mobilizzazione dei lipidi stessi e la localizzazione del grasso nell'organismo.

Per tutti questi motivi, una disfunzione del tessuto adiposo e una disregolazione della funzione adipocitaria, può determinare lo sviluppo dell'obesità e di altri disordini metabolici associati, come l'insulino-resistenza e il diabete.

L'obesità, a livello cellulare, è caratterizzata da un aumento delle dimensioni cellulari degli adipociti (ipertrofia) e dal sostanziale incremento di nuove cellule mature derivanti da precursori indifferenziati (iperplasia). La generazione di nuove cellule del tessuto adiposo gioca quindi un ruolo fondamentale nell'espansione e nella disregolazione della massa grassa che caratterizzano l'obesità (Li *et al.* 2010, Liu *et al.* 2008).

### 1.4.1 Obesità

L'obesità è una malattia multifattoriale, la cui prevalenza è in crescita esponenziale, costituendo quindi un problema sanitario ed economico di crescente importanza in tutto il mondo, anche perché in alcuni paesi sta raggiungendo dimensioni epidemiche.

L'obesità è una patologia complessa, caratterizzata da eccessivo peso corporeo per un accumulo anomalo di tessuto adiposo che può compromettere lo stato di salute dell'individuo. Questa condizione è determinata da fattori ambientali e genetici: è il risultato di un'eccessiva alimentazione e ridotta attività fisica quotidiana, dovuta a comportamenti ed abitudini alimentari e di vita scorretta, anche se non è esclusa l'ipotesi che possano essere il risultato di fattori genetici di rischio. Inoltre, esistono geni di suscettibilità che si associano ad obesità.

Secondo l'Organizzazione Mondiale della Sanità (*World Health Organization, WHO*), l'obesità costituisce uno dei più seri problemi di salute pubblica. Secondo una stima del WHO oltre due miliardi di soggetti sono in sovrappeso (Li 2005), 300 milioni dei quali risultano clinicamente obesi. Questi numeri sono destinati in futuro ad aumentare se non si interviene nell'affrontare questa problematica che oggi costituisce uno dei più seri problemi di salute pubblica globale, tanto da indurre la WHO a parlare di "globesità", termine che ben rappresenta uno scenario generalizzato caratterizzato dalla crescita epidemica di sovrappeso e obesità che coinvolge oggi non solo i paesi

industrializzati occidentali, ma anche i paesi in via di sviluppo (Who 2013).

Altezza e peso sono considerati i parametri più utili per monitorare le condizioni di sovrappeso e obesità. La valutazione del peso corporeo è effettuata tramite l'indice di massa corporea (*Body Mass Index*, BMI), calcolato mettendo in relazione il peso (in chilogrammi) e l'altezza (in metri) di un individuo, secondo la seguente formula:

$$\text{BMI} = \text{peso [Kg]} / \text{altezza [m]}^2$$

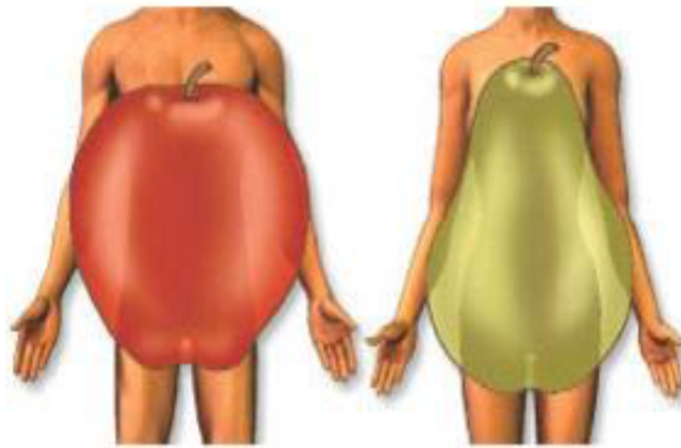
I valori ottenuti dalle misurazioni effettuate sulla popolazione permettono di definire classi di peso diverse e diversi gradi di obesità, [tabella 1]:

BMI compreso tra 18,5 e 24,9:	<b>NORMOPESO</b>
BMI compreso tra 25 e 29,9:	<b>SOVRAPPESO</b>
BMI compreso tra 30 e 34,9:	<b>OBESITÀ 1°</b>
BMI compreso tra 35 e 39,9:	<b>OBESITÀ 2°</b>
BMI compreso tra 40 e 49:	<b>OBESITÀ 3°</b>
BMI compreso tra 50 e 59:	<b>OBESITÀ MORBIGENA</b>
BMI maggiore di 60:	<b>OBESITÀ PATOLOGICA</b>

**Tabella 1.** Valori di BMI e relativa classificazione antropometrica.

La condizione di sovrappeso o pre-obesità è individuata da un BMI compreso tra 25.0 e 29.9 kg/m<sup>2</sup>, mentre una persona obesa è identificato da un BMI ≥ 30 kg/m<sup>2</sup>.

Tuttavia, il BMI fornisce solo una misurazione della massa grassa corporea, poiché non distingue tra il peso associato alla muscolatura e quello associato al grasso, né tiene conto della distribuzione della massa grassa. Oltre all'eccesso di grasso corporeo va tenuta in considerazione la distribuzione del grasso corporeo, a seconda della quale, si possono distinguere due tipi caratteristici di obesità: androide e ginoide, [figura 13].



**Figura 13.** Distribuzione androide o ginoide del grasso nell'obesità.

L'obesità di tipo androide, più frequente negli uomini, è caratterizzata da una distribuzione del grasso nella parte superiore del corpo ed in particolare nella cavità addominale, tra i visceri (obesità viscerale). L'obesità di tipo ginoide, più frequente nella donna, è caratterizzata da una distribuzione del grasso nella parte inferiore del corpo, in particolare sui fianchi e nella zona gluteo-femorale.

Tale diversa distribuzione corporea viene valutata tramite il rapporto "vita-fianchi" (*waist/hip ratio*, WHR), ottenuto misurando la circonferenza minima della vita e la circonferenza massima dei fianchi. Si tratta di un indice semplice, facilmente ottenibile, riproducibile e largamente utilizzato per quantificare la distribuzione adiposa centrale o periferica del grasso corporeo (Buscemi *et al.* 1994). Durante la *Consensus Conference Italiana* del 1991 (Crepaldi *et al.* 1991) sono stati stabiliti, quali limiti per definire l'obesità viscerale nella popolazione italiana, valori di WHR 0,92 per l'uomo e 0,81 per le donne. Valori di 1 per gli uomini e di 0,8 per le donne sono considerati valori soglia per il rischio di sviluppare complicanze metaboliche.

L'obesità, soprattutto quella di tipo viscerale, è associata ad un aumento della mortalità ed è riconosciuta come un importante fattore di rischio per l'insorgenza di patologie quali diabete di tipo 2, aterosclerosi, malattie croniche renali, osteoartrite, dislipidemia, cancro al seno, alla prostata, al colon e all'endometrio (Adamczak *et al.* 2013, Kehle *et al.* 2004).

L'obesità addominale, dovuta ad un sovraccarico lipidico, induce stress a livello cellulare. A sua volta lo stress induce una cascata infiammatoria e ossidativa, con la conseguenza dell'instaurarsi di uno stato di infiammazione cronica a livello del tessuto adiposo, che non è più in grado di svolgere correttamente la funzione di accumulo regolato di trigliceridi e di produzione di adipochine (Lyer *et*

*al.* 2010).

L'eccessiva massa grassa è associata ad un aumento dei livelli di proteine pro-infiammatorie come TNF- $\alpha$ , IL-6 e la proteina C-reattiva (CRP); livelli aumentati di CRP e l'induzione di IL-6 sono predittivi per lo sviluppo del diabete di tipo 2 in varie popolazioni (Scarpellini *et al.* 2012).

Il tessuto adiposo "sano" è caratterizzato dalla presenza di linfociti T-helper e linfociti T citotossici di tipo Th2, che insieme ai macrofagi di tipo M2, producono IL-10 e fattori che regolano negativamente l'infiammazione (Feurer *et al.* 2009). Al contrario, nel tessuto adiposo di soggetti obesi si assiste ad un'alterazione della componente cellulare del sistema immunitario con una polarizzazione di tipo Th1 che favorisce l'infiltrazione di macrofagi pro-infiammatori.

Uno stato di infiammazione cronica gioca un ruolo cruciale nella patogenesi delle disfunzioni metaboliche correlate all'obesità. Studi clinici ed epidemiologici hanno mostrato una chiara connessione tra lo sviluppo di risposte infiammatorie e le malattie metaboliche, in particolare la patogenesi del diabete mellito di tipo 2.

L'obesità e le patologie ad essa correlate vengono inquadrare in quella che viene chiamata "sindrome metabolica", riferendosi con questo termine ad una situazione clinica in cui i fattori genetici e quelli ambientali cooperano all'insorgenza e alla progressione di una patologia estremamente complessa (Alberti *et al.* 2005). Secondo una definizione della WHO, per sindrome metabolica si intende un gruppo eterogeneo di disordini metabolici in cui la resistenza insulinica, l'intolleranza glucidica o il diabete di tipo 2 si associano con almeno altri due squilibri metabolici tra obesità addominale, ipertensione, microalbuminuria e dislipidemia. Nell'ambito metabolico, l'associazione dell'obesità all'insulino-resistenza è ormai evidente da diversi anni (Zeyda *et al.* 2009).

L'insulino-resistenza è determinata da una ridotta sensibilità all'insulina dei principali organi bersaglio come il tessuto adiposo, il fegato e il muscolo. Tali organi diventano quindi insensibili all'azione dell'ormone e per far fronte a questa insufficienza, l'organismo produce più insulina (iperinsulinemia). L'insulina ha la funzione di regolare la captazione di glucosio e la concentrazione degli acidi grassi liberi circolanti: in particolare, nel tessuto adiposo riduce la lipolisi diminuendo in tal modo l'efflusso degli acidi grassi liberi dagli adipociti e stimola la lipogenesi: nel fegato inibisce la gluconeogenesi riducendo l'attività degli enzimi chiave e nel muscolo scheletrico induce l'uptake di glucosio attraverso la stimolazione della traslocazione del trasportatore di glucosio GLUT4 sulla membrana plasmatica. L'insulino-resistenza determina quindi un incremento della concentrazione degli acidi grassi liberi circolanti e l'accumulo ectopico di tessuto adiposo che innesca a sua volta la

riduzione dell'uptake di glucosio insulino-mediato nel muscolo scheletrico e aumenta la produzione di glucosio nel fegato. In definitiva quindi a fronte dello sviluppo di tale resistenza aumentano i livelli circolanti di glucosio con i conseguenti danni associati al diabete. L'obesità rappresenta il principale fattore di rischio per lo sviluppo del diabete mellito di tipo 2 (T2D). Esiste una forte connessione fisiopatologica tra le due patologie, tanto da coniare il termine "diabesità" (Inzucchi *et al.* 2012): si stima che circa l'80-90% dei soggetti affetti da T2D siano obesi, ciò conferma l'importanza dell'insulino resistenza, delle disfunzioni pancreatiche e della eccessiva produzione di glucosio a livello epatico nell'instaurarsi di queste patologie.

Per quanto riguarda l'obesità morbigena, ad oggi la chirurgia bariatrica risulta essere l'unico approccio terapeutico efficace nella perdita di peso, riduzione delle comorbidità e nel miglioramento della tolleranza al glucosio. Tuttavia si tratta di un approccio altamente invasivo e costoso, con interventi spesso irreversibili e adatti a pazienti con BMI superiore a 40 kg/m<sup>2</sup> o con BMI tra 35-40 kg/m<sup>2</sup> con altre comorbidità associate, come ipertensione, malattie cardiovascolari (Chang *et al.* 2014, Maggard-Gibbons *et al.* 2013). La farmacoterapia rappresenterebbe un approccio per pazienti non eleggibili per la chirurgia bariatrica o che non variano il peso con l'esercizio, la modifica dello stile di vita sedentario e la dieta. Ad oggi la maggior parte delle terapie farmacologiche si sono dimostrate inefficaci oppure con effetti collaterali importanti (Apovian *et al.* 2015), andando soprattutto ad agire in modo non selettivo su meccanismi centrali e non periferici. Nuovi approcci farmacologici, mirati ad un'azione selettiva su meccanismi periferici e non centrali, risultano necessari.

#### **1.4.2 Diabete mellito di tipo 2**

Il diabete mellito è un'alterazione cronica del metabolismo caratterizzata da un'alta concentrazione ematica di glucosio, iperglicemia (livelli di glucosio plasmatico a digiuno > 7 mmol/L), dovuta ad alterazioni della secrezione e/o dell'azione insulinica. Si distinguono due tipi principali di diabete mellito:

- diabete mellito di tipo 1 o insulino-dipendente (*Insulin-Dependent Diabetes Mellitus*, IDDM)
- diabete mellito di tipo 2 o non insulino-dipendente (*Non Insulin-Dependent Diabetes Mellitus*, NIDDM)

L'IDDM colpisce generalmente soggetti in giovane età ed è caratterizzato da distruzione, spesso su

base immunologica, delle  $\beta$ -cellule pancreatiche, che di solito conduce ad un deficit assoluto di secrezione insulinica, con iperglicemia e tendenza alla chetoacidosi.

Il NIDDM è tipico dell'età adulta ed avanzata ed è caratterizzato dalla presenza di insulino-resistenza associata ad un relativo deficit di secrezione insulinica. Questa forma è di gran lunga la più frequente nel nostro paese. Alla patogenesi del NIDDM concorrono sia una ridotta sensibilità all'insulina da parte dei tessuti periferici (fegato, muscolo scheletrico e tessuto adiposo), sia difetti della secrezione insulinica da parte della  $\beta$ -cellula pancreatica che non è in grado di compensare per la ridotta azione dell'ormone.

L'insulino-resistenza è un evento precoce nello sviluppo del diabete che precede di diversi anni l'esordio della intolleranza glicidica. Inizialmente, le  $\beta$ -cellule pancreatiche possono compensare l'insulino-resistenza aumentando la loro massa o l'attività secretoria, determinando quindi una condizione iniziale di iperinsulinemia nelle fasi iniziali del diabete. Tuttavia, quando la compensazione non è più adeguata, compare l'iperglicemia.

Il difetto funzionale più precoce delle  $\beta$ -cellule pancreatiche osservato nel diabete di tipo 2 è la progressiva riduzione, fino alla scomparsa, della prima fase della secrezione insulinica, cui, nel tempo, si aggiunge un difetto anche a carico della seconda fase di rilascio dell'ormone (Pratley & Weyer 2001, Weyer *et al.* 1999, Eriksson *et al.* 1989). Oltre alle alterazioni a carico della secrezione insulinica, nel NIDDM sono presenti difetti della normale pulsatilità del rilascio dell'ormone. Accanto alle alterazioni funzionali, diverse evidenze suggeriscono che le isole di Langerhans nei pazienti diabetici di tipo 2 mostrino un decremento del contenuto insulinico e dei granuli in cui è conservato l'ormone e una marcata riduzione della massa  $\beta$ -cellulare (Marchetti *et al.* 2004, Butler *et al.* 2003, Clark *et al.* 1988). Inoltre, è stato riportato che le isole di Langerhans nei pazienti con diabete di tipo 2 mostrano uno spiccato aumento di depositi di amilina, proteina secreta dalla  $\beta$ -cellula insieme all'insulina, responsabile di tossicità per la  $\beta$ -cellula (Clark *et al.* 1988). Tuttavia, le alterazioni morfo-strutturali non sono da sole sufficienti a causare il marcato deficit di secrezione osservato nel diabete di tipo 2, ma verosimilmente contribuiscono a rendere più evidente il danno  $\beta$ -cellulare. Infatti, l'iperglicemia si manifesta solo quando la riduzione della massa  $\beta$ -cellulare è consistentemente maggiore del 50%.

Sebbene le cause del diabete di tipo 2 siano ignote, è ampiamente dimostrato che fattori genetici interagiscono con fattori ambientali per lo sviluppo di malattia. La presenza di una forte componente genetica nell'eziopatogenesi del diabete di tipo 2 è suggerita dalla forte aggregazione familiare della malattia, dall'elevata prevalenza in determinate popolazioni e dall'elevata

concordanza di malattia in gemelli monozigoti (Warram *et al.* 1995, Newmann *et al.* 1987). Fattori ambientali quali l'incremento ponderale, la dieta, l'attività fisica, l'età, interagiscono con la predisposizione genetica per determinare l'insorgenza della malattia.

Un importante fattore di rischio per questa forma di diabete è l'obesità, come dimostrato da numerosi studi di popolazione (Perry *et al.* 1995, Chan *et al.* 1994, Felber *et al.* 1993). Oltre l'80% dei soggetti diabetici di tipo 2 è in sovrappeso e l'obesità e la sedentarietà sono i principali fattori di rischio.

I meccanismi che legano l'obesità al NIDDM sono complessi e non ancora del tutto noti. Alcuni studi sembrano indicare l'esistenza di un substrato genetico comune tra le due malattie. È stato osservato, infatti, che alterazioni del recettore  $\beta$ 3-adrenergico (coinvolto anche nella patogenesi dell'obesità) favoriscono la comparsa precoce del NIDDM indipendentemente dal concomitante sovrappeso (Walston *et al.* 1995). È stato osservato che l'effetto diabetogeno dell'obesità è tanto maggiore quanto più bassa è la suscettibilità genetica al NIDDM; in altri termini, mentre i soggetti geneticamente più predisposti possono diventare diabetici anche se normopeso, in molti altri il NIDDM si manifesta solo in caso di sovrappeso. Ciò spiega perché l'aggregazione familiare del NIDDM è maggiore nei pazienti magri rispetto a quelli obesi. Inoltre, l'obesità androide ha un effetto diabetogeno maggiore dell'obesità ginoide. Infatti, il rapporto vita-fianchi costituisce un fattore di rischio per lo sviluppo del NIDDM, indipendentemente dal sovrappeso (Chan *et al.* 1994). Pertanto, la cura dell'obesità rappresenta un'efficace misura preventiva nei confronti del NIDDM. Anche nei soggetti obesi con ridotta tolleranza glicemica, il calo ponderale previene l'evoluzione verso il diabete clinicamente manifesto (Long *et al.* 1994).

La condizione fisiopatologica più importante che accomuna l'obesità e il NIDDM è l'insulino-resistenza. I pazienti obesi affetti da NIDDM mostrano concentrazioni di insulina circolante aumentata o normale, ma con quasi completa scomparsa della fase precoce di secrezione; questo fenomeno rappresenta un marker precoce di sviluppo di diabete mellito (Polonsky *et al.*, 1988).

Fegato, tessuto muscolare scheletrico, cellula pancreatica e tessuto adiposo hanno un ruolo fondamentale nel meccanismo patogenetico della malattia diabetica. Il tessuto adiposo, soprattutto quello viscerale, ha un ruolo di primo attore nel determinismo della malattia diabetica. Il filo che unisce l'obesità al diabete conclamato è rappresentato dall'aumento dell'ossidazione lipidica dovuto all'eccessiva disponibilità di acidi grassi provenienti dal tessuto adiposo viscerale, con conseguente riduzione dell'utilizzazione di glucosio. Infatti, come già ricordato, la maggior concentrazione di acidi grassi in circolo e di glicerolo e il parallelo incremento ponderale a carico



della massa adiposa viscerale creano i presupposti per un aumento di produzione epatica di glucosio e per una ridotta utilizzazione periferica dello stesso substrato. La ridotta ossidazione del glucosio e quindi la conseguente ridotta glicogenosintesi determinano col tempo uno stato di iperglicemia. Il NIDDM si manifesterà quando l'iperinsulinemia non riuscirà più a compensare il difetto sulla glicogenosintesi. Pertanto, il glucosio post-prandiale non può essere totalmente utilizzato per i depositi di glicogeno innalzerà i livelli glicemici. L'iperglicemia cronica porta ad un esaurimento funzionale della secrezione insulinica determinando un aggravamento dell'iperglicemia.

## 1.5 Incretine

### 1.5.1 GIP e GLP-1

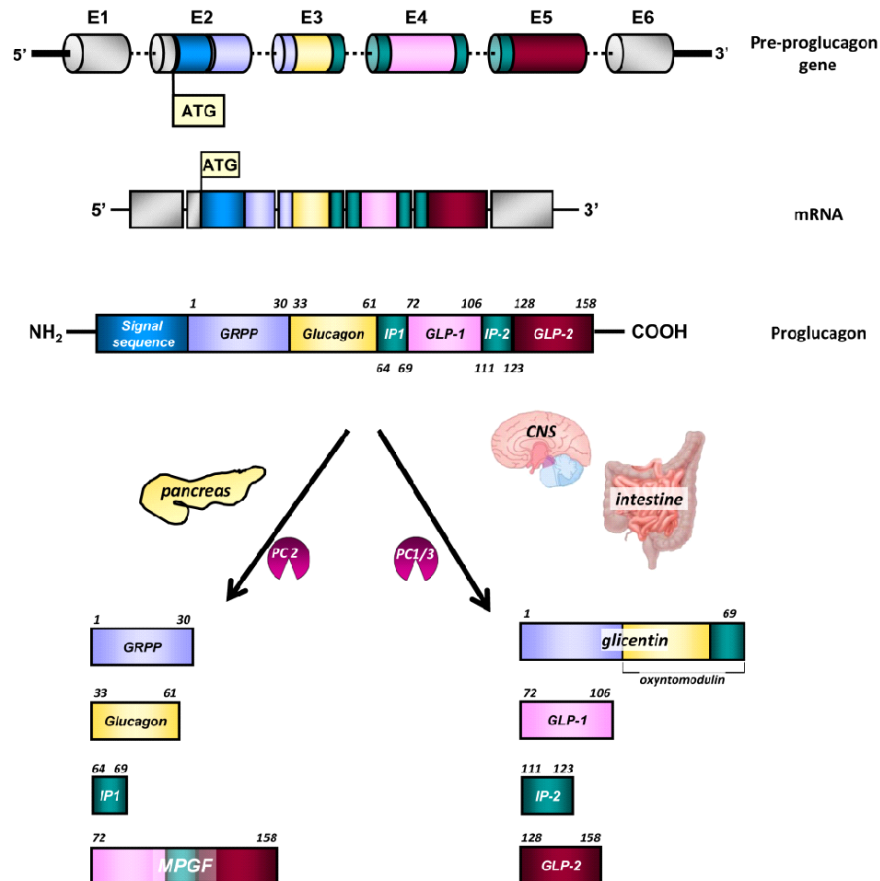
Il concetto di “incretine”, ovvero di ormoni intestinali in grado di stimolare la secrezione di insulina, nasce dalla osservazione che una determinata quantità di glucosio somministrato per via orale provoca una risposta insulinemica nettamente superiore a quella indotta dalla stessa quantità di glucosio somministrata per via endovenosa (Drucker 2006; Nauck *et al.* 1986), suggerendo, quindi, la partecipazione di un “fattore intestinale” che potenzia la secrezione insulinica.

Nel 1963, McIntyre propose che, in risposta all’ingestione di glucosio, venissero rilasciati dal tratto digiunale alcune sostanze umorali che insieme al glucosio contribuivano a favorire la secrezione di insulina da parte delle  $\beta$ -cellule e, nel 1969, Unger ed Eisentrout introdussero il concetto di “asse entero-insulare” (Formoso *et al.* 2006). GIP (*Glucose-dependent Insulinotropic Peptide*) e GLP-1 (*Glucagon-Like-Peptide-1*) sono stati i primi due fattori responsabili dell’“effetto incretinico” ad essere stati identificati.

Il GIP, la prima incretina ad essere stata scoperta, è stata isolata dall’intestino del maiale nel 1970 da John Brown (Drucker 2006, Brown & Dryburgh 1971). Il GIP è un peptide di 42 aminoacidi, secreto nell’uomo dalle cellule K localizzate nel duodeno e nelle anse prossimali del digiuno. Inoltre, questo ormone è stato localizzato anche nel Sistema Nervoso Centrale (SNC) dove gioca un ruolo fondamentale nel controllo della sopravvivenza cellulare (Nyberg *et al.* 2005). Le cellule K, in risposta all’assunzione di cibo, rilasciano GIP in quantità proporzionale alla quantità di nutrienti assorbiti. Una volta prodotto, il pro-GIP viene processato da parte della pro-ormone convertasi (PC1/3) all’interno delle cellule K e come risultato viene ottenuto il peptide bioattivo (Ugleholdt *et al.* 2006). Poiché il GIP contiene un’alanina in posizione 2, rappresenta un ottimo substrato per l’enzima dipeptidil-peptidasi 4 (DDP-4) che converte la forma attiva del GIP(1-42) nel composto inattivo GIP(3-42) (Kieffer *et al.* 1995).

Dieci anni dopo è stato identificato il secondo ormone incretinico, il GLP-1, grazie alla clonazione e al sequenziamento del gene del preproglucagone (Bell *et al.* 1983). Tale gene è localizzato sul cromosoma umano 2q36-q37 ed è composto da 6 esoni e 5 introni, con l’intera sequenza codificante il GLP-1 localizzata solo nell’esone 4. Nei mammiferi, la trascrizione del gene determina

la formazione di un singolo RNA messaggero (mRNA), strutturalmente identico nei tipi cellulari in cui è espresso, ovvero nelle  $\alpha$ -cellule pancreatiche, nelle cellule enteroendocrine intestinali, nei neuroni nel nucleo del tratto solitario e dell'ipotalamo (Cantini *et al.* 2016), [figura 14].



**Figura 14.** Processo di formazione del GLP-1: dal DNA alla sequenza aminoacidica. Tratta da Cantini *et al.* 2016.

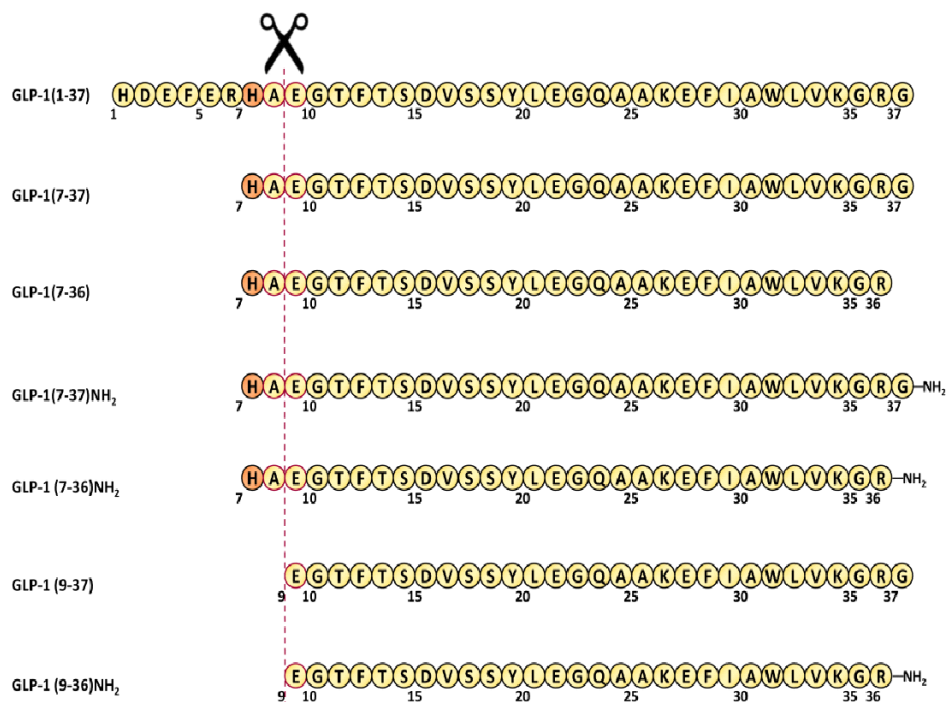
Il trascritto viene tradotto in una singola proteina precursore di 180 aminoacidi, il proglucagone, che viene processata in modo differenziale nei vari tipi cellulari a causa dell'espressione tessuto-specifica dell'enzima pro-ormone convertasi (PC). In aggiunta al GLP-1, il proglucagone codifica per altri ormoni peptidici come glucagone, GLP-2, oxintomodulina, glicentina, GRPP (Glicentin-Related Polypeptide), MPGF (Major Glucagon Fragment), IP-1 (Intervening Peptide-1) e IP-2 (Intervening Peptide-2) (Cantini *et al.* 2016).

Nell'intestino e nel SNC, il proglucagone viene processato principalmente dagli enzimi pro-ormone convertasi-1 (PC1) e pro-ormone convertasi-3 (PC3), dando origine ai peptidi GLP-1, GLP-2, glicentina, oxintomodulina e IP-2 (Vrang *et al.* 2010). Nel pancreas invece, il proglucagone viene

processato dall'enzima pro-ormone convertasi-2 (PC2) che comporta la formazione di glucagone, GRPP, MPGF e IP-1. Gli enzimi PC1/3 sono espressi nelle cellule  $\alpha$  del pancreas suggerendo, quindi, che GLP-1 venga secreto a bassa concentrazione anche dalle isole pancreatiche (Whalley *et al.* 2011, Larsen *et al.* 1997).

Il GLP-1 è secreto dalle cellule enteroendocrine L localizzate nel tratto distale dell'ileo e nel colon come un peptide inattivo di 37 aminoacidi, il GLP-1(1-37). Il successivo clivaggio post-traduzionale di sei aminoacidi dalla regione N-terminale del GLP-1(1-37) da parte degli enzimi PC1/3 origina le forme attive dell'ormone, GLP-1(7-36) e GLP-1(7-37). Inoltre, l'aggiunta di un gruppo amidico all'estremità C-terminale mediata dall'enzima peptidilglicina monoossigenasi, genera i peptidi GLP-1(7-36)NH<sub>2</sub> e GLP-1(7-37)NH<sub>2</sub> (Cantini *et al.* 2016). Tutte queste forme sono equipotenti nell'uomo e stimolano rapidamente la secrezione di insulina glucosio-dipendente, attraverso un meccanismo mediato dal recettore per il GLP-1 (GLP-1R).

Tuttavia, l'emivita del GLP-1 bioattivo in circolo è estremamente breve (1-2 minuti), in quanto subisce una rapida inattivazione da parte dell'enzima DPP-4, che elimina un dipeptide N-terminale trasformando la forma attiva del GLP-1 nei metaboliti inattivi GLP-1(9-37) e GLP-1(9-36)NH<sub>2</sub>, con ridotta affinità per il GLP-1R (Kieffer *et al.* 1995), [figura 15].



**Figura 15.** Sequenza aminoacidica delle diverse forme di GLP-1 a confronto. Indicato dalla linea tratteggiata il sito di clivaggio ad opera della DPP-4. Tratta da Cantini *et al.* 2016.

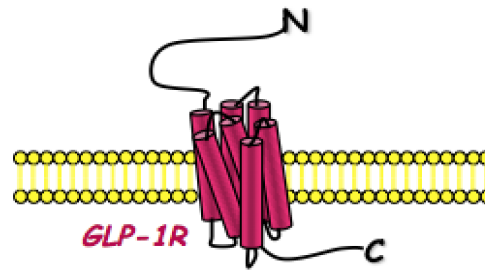
Le concentrazioni plasmatiche del GLP-1 sono basse durante le fasi di digiuno (5-10 pmol/l) e aumentano rapidamente entro pochi minuti dall'assunzione di cibo (15-50 pmol/l), che costituisce lo stimolo fisiologico principale per la sua secrezione dalle cellule enteroendocrine L. Il GLP-1 viene rilasciato in modo bifasico: un aumento precoce dei suoi livelli nel sangue sembra essere mediato da fattori neuronali ed endocrini che promuovono la secrezione di GLP-1 dalle cellule distali dell'intestino ben prima che i nutrienti entrino in contatto con le cellule L (Drucker *et al.* 2006).

L'effetto insulino-sensibilizzante del GLP-1 potrebbe essere dovuto in parte ad un effetto diretto sul microcircolo muscolare, per aumentare lo stimolo di insulina e migliorare l'utilizzo di glucosio da parte dei muscoli (Chai *et al.* 2014) e potrebbe essere indirettamente mediato dalla soppressione della secrezione di glucagone che a sua volta porta ad una riduzione della produzione di glucosio epatico (Hare *et al.* 2009, Creutzfeldt *et al.* 1996). Il GLP-1 riduce anche i livelli di glucosio mediante l'inibizione della secrezione di glucagone dalle  $\alpha$ -cellule del pancreas; questa azione può avvenire sia direttamente mediata dai recettori del GLP-1 espressi sulle cellule alfa o indirettamente attraverso la stimolazione della secrezione di somatostatina che, a sua volta, inibisce la secrezione di glucagone (Viltsboll *et al.* 2002).

### 1.5.2 Il recettore del GLP-1

Il recettore del GLP-1 appartiene alla famiglia dei recettori accoppiati a proteina G (G Protein-Coupled Receptors, GPCRs). È stato identificato per la prima volta attraverso esperimenti di radiomarcatura nel ratto e nelle isole pancreatiche umane (Donnelly 2012), nel 1992 è stato clonato da librerie pancreatiche di cDNA derivate da ratto (Thorens 1992) e l'anno successivo nell'uomo (Dillon *et al.* 1993, Thorens *et al.* 1992).

GLP-1R è un recettore a sette domini transmembrana, costituito da 463 aminoacidi, accoppiato alla proteina G stimolatoria (Donnell 2012), [figura 16].



**Figura 16.** Rappresentazione schematica della struttura del GLP-1R.

Strutturalmente, il recettore presenta un ampio dominio extracellulare idrofilico all'estremità N-terminale, le sette eliche transmembrana connesse da anse intracellulari ed extracellulari, e un dominio C-terminale. La regione N-terminale contiene una breve sequenza *leader* di 23 aminoacidi essenziale per la corretta biosintesi del recettore (Thompson *et al.* 2014, Huang *et al.* 2010).

Inoltre, presenta sei residui di cisteina fondamentali per l'interazione con il ligando, insieme ad altri residui localizzati tra i *loop* extracellulari dei domini transmembrana 1 e 3 (Runge *et al.* 2008). Nella porzione C-terminale, il *loop* intracellulare del terzo dominio transmembrana, è invece caratteristico per il legame alle proteine G (Baggio & Drucker 2007). Il GLP-1R può formare dei complessi funzionali con il GIP-R, un altro recettore associato a proteina G, per via della loro elevata omologia di sequenza (Whitaker *et al.* 2012).

Il GLP-1R è espresso sulle cellule  $\alpha$  e  $\beta$  del pancreas, nel sistema nervoso centrale e periferico e nei tessuti periferici cuore, rene, polmone e tratto gastrointestinale.

Il legame del GLP-1 al suo recettore sulle  $\beta$ -cellule, innesca la cascata enzimatica della proteina G stimolatoria che determina l'attivazione dell'adenilato ciclasi, portando ad un rapido aumento dei livelli di adenosina-monofosfato-ciclico (cAMP). La produzione di questo secondo messaggero attiva la proteina chinasi A (PKA), la quale fosforila i canali del calcio ( $\text{Ca}^{2+}$ ) voltaggio-dipendenti determinando l'aumento dei livelli di calcio intracellulare, seguito dalla stimolazione della secrezione insulinica, che, rappresenta uno degli effetti più importanti di tale ormone. Questa stimolazione, tuttavia, è "glucosio-dipendente" e, in presenza di concentrazioni di glucosio al di sotto di quelle fisiologiche, l'azione insulino-secretoria del GLP-1 è totalmente abolita (Drucker *et al.* 1987). Oltre all'attivazione della via di segnalazione PKA-dipendente, il GLP-1R è implicato nell'attivazione di cascate metaboliche alternative, come quelle mediate dalla fosfatidilinositolo-3-chinasi (*Phosphatidylinositol-3-Kinase*, PI3K) e dalle proteine chinasi attivate da mitogeni (*Mitogen-*

*Activated Protein Kinase*, MAPK), responsabili di effetti cellulari diversi. Infatti, l'attivazione del GLP-1R promuove anche la resistenza all'apoptosi e migliora la sopravvivenza e proliferazione delle cellule  $\beta$  sia nei roditori che nelle insule umane (Farilla *et al.* 2003).

Gli effetti benefici del GLP-1 sul controllo glicemico ne fanno una molecola di estremo interesse ai fini della terapia del diabete tipo 2 e anche dell'obesità, spesso associata a questa forma di diabete. Rispetto ai soggetti non diabetici, i soggetti con diabete tipo 2 mostrano un "effetto incretinico" ridotto con ridotta secrezione di GLP-1 in risposta a un pasto (Toft-Nielsen *et al.* 2001). La somministrazione di GLP-1 per infusione continua si è dimostrata in grado di aumentare la secrezione insulinica e di normalizzare sia la glicemia a digiuno sia quella post-prandiale in soggetti affetti da diabete tipo 2 che presentavano un fallimento secondario al trattamento con sulfonilurea (Rachman *et al.* 1997). In uno studio (Zander *et al.* 2002), il GLP-1 è stato somministrato in infusione continua sottocutanea mediante microinfusore per 6 settimane. Al termine del periodo di infusione, i 10 pazienti in trattamento attivo mostravano, rispetto ai controlli ai quali era stata infusa fisiologica, una diminuzione di 77 mg/dL della glicemia a digiuno e di 1,3 punti percentuali dell'emoglobina glicosilata (HbA1c). Inoltre, i soggetti in trattamento attivo riferivano una cospicua diminuzione dell'appetito e avevano perso in media 1,9 kg rispetto all'inizio del trattamento.

Dunque, l'asse delle incretine rappresenta un interessante target terapeutico per il diabete. Potenziando l'attività di questo asse, infatti, si può ottenere una stimolazione della secrezione insulinica e anche una inibizione della secrezione di glucagone, capaci a loro volta di ridurre la glicemia. Inoltre, essendo le incretine attive sulle isole pancreatiche esclusivamente in condizioni glucosio-dipendente, la stimolazione di questo asse risulta essere capace di ridurre la glicemia soltanto quando questa è aumentata, con rischio basso o nullo di ipoglicemia.

Tuttavia, il principale limite di una terapia con GLP-1 è la breve emivita dell'ormone. Infatti, essendo velocemente degradato dalla DPP-4, per poterlo utilizzare come farmaco occorrerebbe somministrarlo per via infusione in modo continuo. Non potendo utilizzare il GLP-1 nativo come tale, la ricerca farmacologica ha superato questo limite offrendo due approcci possibili:

- lo sviluppo di analoghi del GLP-1, agonisti del GLP-1R resistenti alla degradazione enzimatica da parte della DPP-4;
- l'uso di inibitori selettivi della DPP-4 in grado di prevenire la degradazione dell' incretina e di aumentare i livelli circolanti di GLP-1 intatto e biologicamente attivo.

### 1.5.3 Agonisti del recettore del GLP-1

Gli agonisti sintetici del GLP-1R (GLP-1RAs) sono farmaci in grado di mimare l'azione del GLP-1 umano e resistenti all'azione dell'enzima DPP-4, di conseguenza presentano una maggiore biodisponibilità, che si traduce in una migliore efficacia clinica. Queste molecole si legano al recettore del GLP-1 stimolando i suoi effetti farmacologici, e quindi un aumento nel rilascio di insulina da parte delle cellule  $\beta$  in modo glucosio-dipendente, una soppressione nel rilascio di glucagone da parte delle cellule  $\alpha$ , ritardano lo svuotamento gastrico e il ritmo di assorbimento di glucosio. Attualmente ci sono diversi GLP-1RA approvati dalla FDA che si trovano in commercio negli Stati Uniti e nell'Unione Europea: exenatide, lixisenatide, liraglutide, dulaglutide, albiglutide e semaglutide. Ciascuno di essi presenta comunque differenze nella struttura, nella farmacocinetica, nell'efficacia clinica, nella modalità di somministrazione e negli effetti collaterali (Lee & Lee 2017), [figura 17].

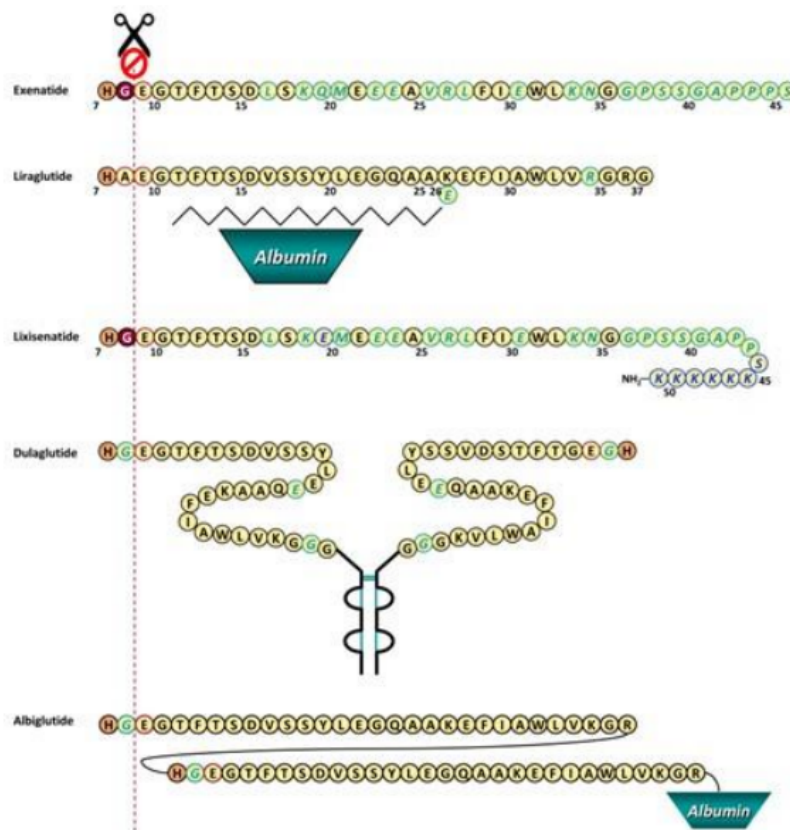


Figura 17. Struttura dei principali agonisti del recettore del GLP-1. Tratta e modificata da Cantini et al. 2016.

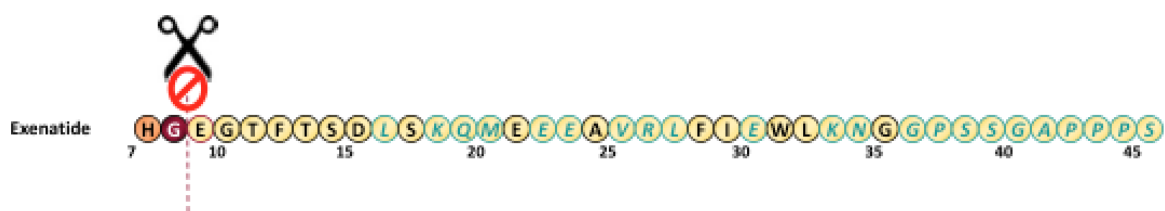


Il primo agonista del recettore del GLP-1 ad essere stato approvato è exenatide (nome commerciale Byetta): si tratta della forma sintetica di exendin-4, passata in commercio in seguito ad approvazione da parte della FDA nel 2005, utilizzata nel trattamento del diabete mellito di tipo 2.

Exendin-4 è un peptide naturale costituito da 39 aminoacidi, inizialmente identificato come prodotto della saliva del Gila Monster (*Heloderma Suspectum*), una lucertola velenosa che vive nel deserto dell'Arizona (Eng *et al.* 1992), che viene secreto in risposta all'assunzione di cibo.

Exendin-4 è un potente agonista del recettore del GLP-1, strutturalmente ha un'omologia del 53% con la sequenza aminoacidica del GLP-1 nativo ma risulta resistente all'azione della DPP-4, grazie alla presenza di una glicina al posto di un'alanina nella parte N-terminale della molecola. Per questo motivo presenta un'emivita significativamente più lunga rispetto a quella del GLP-1 (Kim & Egan 2008, Eng *et al.* 1992), [figura 18].

La forma sintetica di exendin-4, oggi nota come exenatide, possiede le stesse attività glucoregolarie del GLP-1, incluse la capacità di incrementare la secrezione insulinica glucosio-dipendente, di inibire in modo glucosio-dipendente l'eccessiva secrezione di glucagone, rallentare lo svuotamento gastrico e di ridurre l'assunzione di cibo (Zander *et al.* 2002, Parkes *et al.* 2001).



**Figura 18.** Sequenza aminoacidica Exenatide. Tratta e modificata da Cantini *et al.* 2016.

L'efficacia di exenatide come trattamento nel diabete di tipo 2 è stata dimostrata da numerosi studi clinici e da tre *trials* di grandi dimensioni della durata di almeno sei mesi, in pazienti non più responsivi al trattamento con sola metformina (DeFronzo *et al.* 2005), sola sulfonilurea (Buse *et al.* 2004) o combinazione tra metformina e sulfoniluree (Kendall *et al.* 2005).

L'exenatide riduce in modo significativo i livelli di glicemia a digiuno e post-prandiale nei soggetti con diabete di tipo 2 e l'iperglicagonemia post-prandiale del soggetto diabetico (Kolterman *et al.* 2003), rispetto al trattamento con placebo. In tali studi si è osservata una riduzione significativa della emoglobina glicosilata (HbA1c) nei soggetti in trattamento farmacologico combinato con sulfonilurea e/o metformina più exenatide a differenti dosaggi (5 o 10 µg x 2 al giorno) rispetto ai soggetti in trattamento con sulfonilurea e metformina (gruppo placebo).

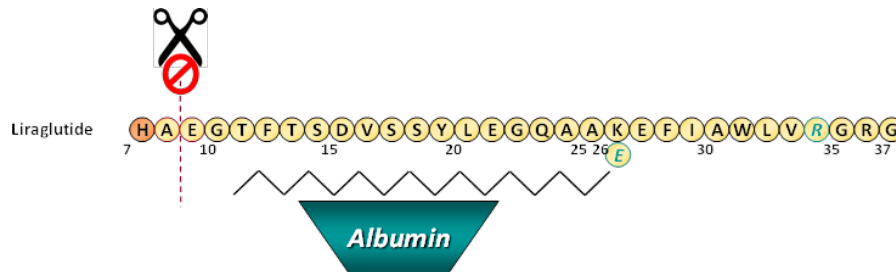
Oltre ad una riduzione della HbA1c e della glicemia, i soggetti trattati con exenatide presentano una modesta (1,5-2 kg) ma significativa riduzione del peso corporeo (DeFronzo *et al.* 2005, Kendall *et al.* 2005, Buse *et al.* 2004). Questo farmaco risulta ben tollerato: gli effetti collaterali più frequenti a carico dell'apparato gastroenterico (nausea) si attenuavano con la riduzione della posologia e la durata del trattamento. La riduzione del peso favorita dall'assunzione di exenatide non è stata associata agli effetti gastroenterici in quanto analisi *post hoc* hanno dimostrato una uguale riduzione del peso corporeo in soggetti con e senza nausea e/o vomito (DeFronzo *et al.* 2005, Kendall *et al.* 2005, Buse *et al.* 2004). Questa forma di exenatide, a breve durata d'azione, viene somministrata due volte al giorno per via sottocutanea. Pur essendo resistente all'azione della DPP-4, rispetto al GLP-1 nativo, ha comunque un'emivita relativamente limitata (60-90 minuti). Somministrando il farmaco poco prima di un pasto principale, ciò è sufficiente a garantire una buona copertura nella fase post-prandiale, ma non a fornire un effetto costante nel corso della giornata con sole due somministrazioni giornaliere (Mannucci 2008). Successivamente è stata approvata una formulazione di exenatide a lunga durata d'azione (nome commerciale Bydureon) che ne permette la somministrazione una volta alla settimana. Questa forma *long acting* riduce in maniera più efficace i livelli di HbA1c e di glicemia a digiuno rispetto la forma a breve durata d'azione.

Liraglutide (nome commerciale Victoza) è un analogo sintetico dell'ormone umano GLP-1 e condivide con quest'ultimo il 97% della sequenza aminoacidica. Questo farmaco è stato approvato dall'EMA (Agenzia Europea per i Medicinali) il 3 luglio 2009 e dalla FDA (Food and Drug Administration) il 25 gennaio 2010.

Il liraglutide è ottenuto modificando il GLP-1, tramite la sostituzione della lisina (K) in posizione 34 con una arginina (R) e mediante l'aggiunta di un acido grasso a 16 atomi di carbonio (acido palmitico) legato per mezzo di un residuo di glutammato (E) alla lisina in posizione 26 (Knudsen *et al.*, 2000), [figura 19].

Queste modificazioni consentono alla molecola di auto-associarsi in eptameri in prossimità del sito d'iniezione aumentando il tempo di rilascio dal tessuto sottocutaneo (Dharmalingam *et al.* 2011, Knudsen 2010); inoltre, rendono più difficile l'accesso della DPP-4 al sito N-terminale e permettono alla molecola di complessarsi in modo reversibile con l'albumina presente nel flusso sanguigno. Il risultato è un aumento dell'emivita plasmatica della molecola, una più lenta degradazione ed un ritardo nella *clearance* renale (Knudsen *et al.* 2005). Questo rende il liraglutide

un analogo stabile del GLP-1 e conferisce alla molecola un profilo farmacocinetico caratterizzato da una emivita plasmatica di circa 13 ore dopo iniezione sottocutanea, permettendone l'utilizzazione in mono somministrazione giornaliera (Degn *et al.* 2004), [figura 19].



**Figura 19.** Sequenza aminoacidica di exenatide e liraglutide a confronto. Tratta e modificata da Cantini *et al.* 2016.

Il liraglutide è indicato per il trattamento del diabete mellito di tipo 2 nell'adulto. Se messo a confronto con exenatide, riduce più significativamente i livelli di emoglobina glicosilata per via della sua prolungata emivita. Numerosi studi dimostrano i suoi effetti ipoglicemizzanti, la capacità di migliorare i parametri del peso e di controllare il comportamento alimentare sia in monoterapia che in combinazione con altri trattamenti per il diabete (Niswender *et al.* 2013, Fujishima *et al.* 2012). Nel 2015, il liraglutide è stato approvato dalla FDA alle dosi di 3mg (Saxenda) come opzione di trattamento per la gestione cronica dell'eccesso di peso. Il farmaco è indicato in aggiunta a dieta ed esercizio fisico in soggetti adulti obesi ( $BMI \geq 30 \text{ kg/m}^2$ ) o sovrappeso ( $BMI \geq 27 \text{ kg/m}^2$ ), con almeno una comorbidità correlata al peso, come diabete di tipo 2 e malattie cardiovascolari. Nel trial SCALE, condotto su 864 pazienti obesi e con diabete mellito di tipo 2, la somministrazione di liraglutide 3.0 mg una volta al giorno ha dimostrato una riduzione del peso corporeo del 6% dopo 56 settimane di trattamento (Davies *et al.* 2015).

Negli ultimi anni c'è stato un costante progresso dei GLP-1RA con un interesse crescente nello sviluppo di farmaci multi-agonisti. Questa evoluzione è principalmente dovuta al fatto che il proglucagone, nelle cellule enteroendocrine intestinali, viene processato dando origine a diversi ormoni (GLP-1, GIP, glucagone, oxintomodulina) che hanno ruoli importanti nella regolazione del metabolismo glucidico e dell'appetito. A riguardo, diversi studi preclinici hanno dimostrato che la combinazione di peptidi ha un'elevata efficacia nel trattamento dei disturbi metabolici e dell'obesità: si tratta di singole molecole note come co-agonisti che possono interagire con due o tre recettori degli ormoni intestinali. Esempi in fase di sviluppo includono agonisti GLP-1/GIP, GLP-

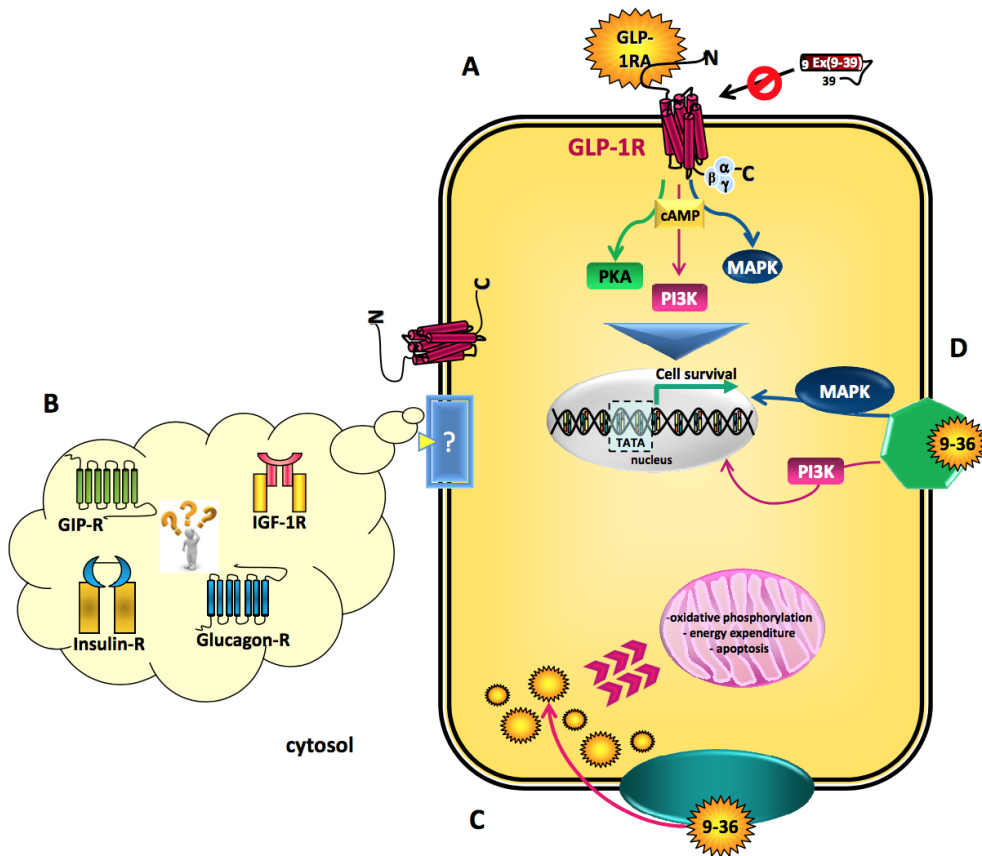
1/glucagone e GLP-1/GIP e glucagone (Baggio & Drucker 2021).

Il tirzepatide è una nuova molecola co-agonista GIP/GLP-1 appartenente a questa classe di farmaci. Si tratta di un peptide di 39 aminoacidi coniugato ad un acido grasso che lega entrambi i recettori GIP e GLP-1 con elevata affinità ed è somministrabile una volta alla settimana per via sottocutanea. Questa singola molecola integra le azioni di entrambe le incretine: il GIP è in grado di diminuire l'assunzione di cibo, di aumentare il dispendio energetico e di ridurre la secrezione di glucagone. La combinazione con un agonista del recettore del GLP-1, ha come risultato degli effetti importanti sul metabolismo del glucosio e sulla riduzione del peso corporeo, come hanno dimostrato gli studi di fase III pubblicati alla fine del 2021 (Del Prato *et al.* 2021).

Sono attualmente in fase di sviluppo (fase pre-clinica o fase I) molecole che combinano l'azione dei tre agonisti GLP-1/GIP e glucagone con l'obiettivo di migliorare costantemente l'efficacia di questi farmaci sul controllo della glicemia e sulla perdita di peso (Brandt *et al.* 2018).

#### **1.5.4 Effetti pleiotropici del GLP-1 e degli agonisti del GLP-1R**

Il GLP-1 e gli agonisti del GLP-1R, oltre alla classica azione insulino-sensibilizzante, hanno una serie di effetti "extra-pancreatici", alcuni dei quali sono mediati dall'attivazione della via di segnalazione classica del recettore, altri invece sembrano correlati a vie di segnalazione alternative attivate dal GLP-1R oppure da meccanismi differenti, [figura 20].



**Figura 20.** Rappresentazione schematica delle vie di segnalazione mediate dal GLP-1R. A: meccanismo GLP-1R-dipendente o via classica (PKA, PI3K, MAPK). B: ipotesi di eterodimerizzazione del GLP-1R con altri recettori accoppiati a proteine G putativi. C, D: meccanismi GLP-1R-indipendenti. Tratta e modificata da Cantini et al. 2016.

È stato dimostrato che GLP-1 può esercitare un effetto cardioprotettivo diretto a livello del cardiomiocita ed effetti benefici indiretti migliorando alcuni biomarcatori del rischio cardiovascolare (pressione sanguigna, livelli di colesterolo, trigliceridi post-prandiali e livelli di glucosio, coagulazione e infiammazione), (Mikhail 2014).

In studi preclinici su topi con ischemia indotta, la somministrazione di liraglutide migliora la sopravvivenza dei cardiomiociti e la funzione cardiaca; tali effetti persistono anche dopo la sospensione del farmaco (Noyan-Ashraf et al. 2009). Il liraglutide modula l'espressione di geni cardioprotettivi, quali Nrf2, PPAR-β/δ e l'eme ossigenasi 1, tramite l'attivazione di Akt e GSK3β (*Glycogen Synthase Kinase 3β*), implicati in *pathways* differenti rispetto alla via di segnalazione classica attivata dal GLP-1R (Noyan-Ashraf et al. 2009). Tuttavia, i dati a disposizione non sono ancora sufficienti per poter discriminare se questi effetti siano dovuti dall'attivazione di *pathways* alternativi del recettore o, piuttosto, dall'interazione del liraglutide con differenti target molecolari. In esperimenti condotti su cuori ischemici/riperfusi di ratto, l'exedin-4 è in grado di ridurre l'area danneggiata tramite meccanismi dipendenti dal GLP-1R e tali effetti risultano reveriti

dall'antagonista del recettore, l'exendin(9-39) (Sonne *et al.* 2008).

L'ipotesi che il GLP-1 e agonisti possano agire mediante l'attivazione di *pathways* alternativi è nata osservando come, in topi con delezione del gene GLP-1R (topi GLP-1R<sup>-/-</sup>), gli effetti degli agonisti vengono mantenuti anche in assenza del recettore. Anche l'utilizzo della forma troncata di GLP-1, il GLP-1(9-36) che ha una bassa affinità per il recettore, ha dimostrato un effetto biologico, suggerendo quindi l'esistenza di un recettore alternativo al GLP-1R classico. La sua esistenza è ulteriormente supportata dall'incapacità dell'exendin(9-39), antagonista del recettore classico, di revertire gli effetti di alcuni agonisti (Cantini *et al.* 2016).

Nel cuore è stato proposto un duplice meccanismo per l'azione dei GLP-1RAs: l'attivazione della via classica del GLP-1R potrebbe essere responsabile degli effetti inotropici, della stimolazione dell'*uptake* di glucosio e dell'aumento del flusso coronarico, mentre, meccanismi indipendenti dal GLP-1R e che potrebbero essere attivati sia dal GLP-1(7-36) che dal GLP-1(9-36), sono implicati nel miglioramento della funzione cardiaca in seguito ad ischemia miocardica (Ban *et al.* 2008). Nei topi GLP-1R<sup>-/-</sup>, il GLP-1(9-36) limita l'estensione dell'infarto e promuove la sopravvivenza dei cardiomiociti, tramite l'attivazione delle vie di segnalazione MAPK e PI3K dipendenti, suggerendo così la presenza di recettori alternativi che hanno affinità per la forma troncata del peptide (Ban *et al.* 2010).

In diversi studi *in vitro* è stato dimostrato che il GLP-1 e gli agonisti del GLP-1R hanno un effetto positivo a livello endoteliale, portando ad un miglioramento della disfunzione delle cellule endoteliali, riscontrabile nel diabete di tipo 2 e nell'ipertensione. In particolare, mostrano una riduzione del danno endoteliale, dell'infiammazione e dello stress ossidativo legati a stati di iperglicemia o ipoglicemia (Ceriello *et al.* 2013). Anche in questo caso, non è escluso che alcuni effetti siano dovuti dall'attivazione di meccanismi recettoriali alternativi.

Il GLP-1 gioca anche un ruolo importante nel ridurre l'appetito e aumentare la sazietà agendo su recettori espressi in differenti aree del cervello, come i nuclei ipotalamici (arcuato e paraventricolare) (Richards *et al.* 2014, Wei *et al.* 1995). Gli agonisti del GLP-1R sono in grado di inibire la secrezione e la motilità intestinale, compreso lo svuotamento gastrico. Inoltre, sono in grado di ridurre l'assunzione di cibo, promuovendo la perdita di peso (Monami *et al.* 2012). Da una parte, questi effetti sono mediati dall'attivazione dei recettori del GLP-1 espressi a livello delle afferenze vagali, dall'altra dai recettori espressi a livello del sistema nervoso centrale (Kanoski *et al.* 2011).

Negli ultimi anni, si sta indagando sugli effetti del GLP-1 e agonisti del GLP-1R su nuovi target, quali fegato, muscolo, osso e tessuto adiposo.

Il GLP-1 e i GLP-1RA contribuiscono al controllo glicemico e agiscono sull'omeostasi glicidica anche inibendo la gluconeogenesi epatica (D'Alessio *et al.* 2004). Tramite studi *in vitro*, su epatociti isolati da ratti, è stato dimostrato che GLP-1 promuove l'accumulo e la sintesi di glicogeno e inibisce la glicogenolisi indotta dal glucagone (Ikezawa *et al.* 2003, Valverde *et al.* 1994). Studi *in vitro* su miociti isolati da soggetti obesi, hanno dimostrato come GLP-1 ed exendin-4 aumentano l'*uptake* del glucosio e il metabolismo ossidativo, suggerendo un effetto diretto, indipendente dall'azione dell'insulina (Villanueva-Peñacarrillo *et al.* 2011).

Inoltre, studi preclinici hanno riportato come la somministrazione delle incretine determina un aumento della massa ossea e un miglioramento della struttura ossea (Meier *et al.* 2016, Campbell *et al.* 2013, Dicembrini *et al.* 2012, Henriksen *et al.* 2009)

Anche il tessuto adiposo rappresenta un nuovo potenziale target del GLP-1 e degli agonisti del suo recettore. Infatti, queste molecole, di cui è ampiamente dimostrata l'azione positiva sulla perdita di peso per effetto centrale e sui meccanismi dello svuotamento gastrico, potrebbero esercitare un'azione anti-obesigena diretta sul tessuto adiposo. Tuttavia, in letteratura, questa azione a livello del tessuto adiposo non è del tutto chiara, poiché l'espressione del GLP-1R resta ancora dibattuta.

Dati ottenuti *in vitro*, sulla linea cellulare murina 3T3-L1, mostrano un effetto stimolatorio del GLP-1 e dei GLP-1RA sull'*uptake* di glucosio, sul metabolismo e sulla differenziazione adipocitaria in preadipociti murini (Challa *et al.* 2012). Da questi studi è stato riportato come GLP-1 promuove l'adipogenesi, l'espressione di *markers* specifici (A-FABP, PPAR- $\gamma$ ) e l'accumulo delle gocce lipidiche, tramite l'attivazione di *pathways* alternativi rispetto alla via di segnalazione classica mediata dal GLP-1R (Yang *et al.* 2013, Challa *et al.* 2012).

Al contrario, andando a valutare l'attività degli agonisti del GLP-1R su cellule precursori di adipociti umani, è stato dimostrato che il liraglutide ha un effetto anti-proliferativo nei confronti delle cellule staminali adipose ed è in grado di interferire nell'induzione, *in vitro*, dell'adipogenesi. Gli effetti osservati sono mediati dal recettore classico del GLP-1, così come dimostrato dalla reversibilità di tali effetti tramite l'utilizzo dell'exendin(9-39) (Cantini *et al.* 2015). Un dato interessante mostra che, l'effetto inibitorio sulla differenziazione adipocitaria, è accompagnato da un aumento

significativo dell'espressione di adiponectina degli adipociti maturi (Cantini *et al.* 2015), suggerendo come il ridotto numero di adipociti che si vengono a formare in presenza di liraglutide sia rappresentato comunque da cellule qualitativamente più funzionali. È interessante notare che, anche la forma clivata del GLP-1 nativo, GLP-1(9-36), ritenuta inattiva, esercita gli stessi effetti, confermando l'ipotesi di un recettore diverso dal GLP-1R classico, anche nel tessuto adiposo (Cantini *et al.* 2016).

### 1.5.5 Ruolo delle incretine del processo di browning

Fino ai primi anni 2000, la presenza di tessuto adiposo bruno metabolicamente attivo nell'uomo adulto è stata oggetto di dibattiti scientifici: in questo contesto la recente pubblicazione di vari *papers* che dimostrano la presenza e la distribuzione nell'uomo adulto di depositi di BAT attivabile e che tale attivazione risulta essere deficitaria nei soggetti obesi, ha riaperto le discussioni in merito e ravvivato l'interesse rivolto alla fisiologia del tessuto adiposo bruno. Questo interesse è stato ulteriormente rianimato dalla scoperta di una sottopopolazione di cellule disperse all'interno del WAT che in risposta a diversi fattori ormonali e ambientali possono essere indotte ad un fenotipo *brown-like* in grado di svolgere un'attiva termogenesi, con un meccanismo denominato *browning*. La possibilità di induzione di uno *switch* fenotipico da tessuto bianco a bruno, basata sulle evidenze sperimentali di un possibile reclutamento di precursori del BAT a scapito dell'espansione del WAT, sembra avere promettenti utilizzi in campo clinico e terapeutico per l'approccio all'obesità e alle patologie ad essa correlate. Infatti, la possibilità di conversione del tessuto adiposo bianco dismetabolico in eccesso nell'individuo obeso in tessuto adiposo bruno che, oltre ad avere un effetto paracrino di controllo metabolico, brucia i grassi accumulati liberando energia sotto forma di calore, ha fatto intravedere un possibile impiego terapeutico dello stimolo dell'attività del BAT (Bierdinc *et al.* 2013). In considerazione di ciò, numerosi studi retrospettivi hanno messo in evidenza una relazione fra presenza/attività del BAT nell'adulto ed alcuni parametri clinici legati all'espansione del tessuto adiposo bianco: oltre ad essere più esteso nelle donne rispetto che negli uomini, la quantità di BAT risulta essere inversamente proporzionale al BMI e all'età del soggetto (Tews & Wabitsch 2011).

Oltre che sulle cellule endoteliali, sul fegato e altri organi, in letteratura sono stati descritti gli effetti extra-pancreatici delle incretine tra cui alcuni, in data più recente, anche sul tessuto adiposo (Cantini *et al.* 2016, Yamada *et al.* 2016, Van Genugten *et al.* 2013). Nello specifico, alcuni di questi



studi avevano già dimostrato come il GLP-1 e gli agonisti del suo recettore possano stimolare i processi di lipogenesi e lipolisi a livello del tessuto adiposo bianco (Sancho *et al.* 2006). Successivamente, in studi preclinici realizzati *in vitro* (adipociti 3T3-L1) e *in vivo* (topi C57BL/6J) Xu *et al.*, hanno mostrato come agonisti del GLP-1R siano in grado di regolare il metabolismo lipidico sottostando all'azione di SIRT1: la deacetilasi SIRT1 NAD<sup>+</sup>-dipendente, attivata a sua volta dal pathway dell'AMPK, è stata indicata negli ultimi anni come un fattore chiave nei processi di termogenesi del BAT via attivazione di UCP-1 (Andrade *et al.* 2014, Um *et al.* 2010). Questi studi nello specifico hanno mostrato come l'infusione cronica a livello periferico di exenatide, in dipendenza da SIRT1, stimola nel WAT un processo di rimodellamento in senso *brown* promuovendo la lipolisi (tramite up-regolazione dell'enzima limitante ATGL), ossidazione di acidi grassi e biogenesi mitocondriale (Xu *et al.* 2016).

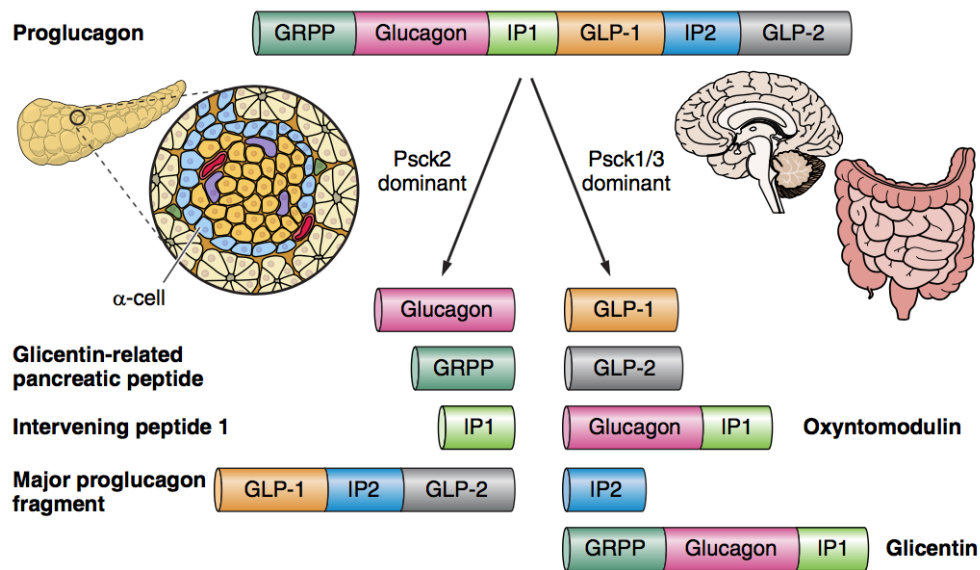
Altri lavori recenti realizzati *in vivo* su modelli murini hanno anche dimostrato che la segnalazione mediata dall'asse CNS-GLP-1R stimola direttamente la termogenesi del BAT interscapolare (Lockie *et al.* 2012). Sulla stessa linea, un altro gruppo di ricerca ha indicato come la stessa stimolazione centrale del GLP-1R può accelerare la clearance plasmatica dei triacilgliceroli (TAG) e del glucosio via attivazione del BAT nel topo (Kooijman *et al.* 2015). Per indagare più approfonditamente i meccanismi molecolari del *network* termoregulatorio indotto dall'attivazione del GLP-1R, Beiroa *et al.*, hanno studiato gli effetti ottenuti in seguito ad iniezione intracerebroventricolare (ICV) di liraglutide, postulando che il sistema del GLP-1 a livello centrale possa stimolare la termogenesi del BAT e il fenomeno di *browning* attraverso la via di *signalling* della PKA attivata dall'AMPK ipotalamica, localizzata nel nucleo ventromediale (Beiroa *et al.* 2014). Lo stesso meccanismo è stato ulteriormente testimoniato da studi condotti *in vivo* e *in vitro* da un altro gruppo di ricerca in seguito ad up-regolazione, mediata dal liraglutide, della guanilato ciclastasi solubile (sGC) e della protein chinasi G I (PKGI) (Zhu *et al.* 2016).

## 1.6 Glucagone

Il glucagone è un ormone prodotto e secreto dalle  $\alpha$ -cellule pancreatiche, che rappresentano circa il 20% della quota cellulare totale del pancreas. Tale ormone svolge un ruolo fondamentale nella regolazione dell'omeostasi del glucosio, contrastando l'azione dell'insulina, specialmente in risposta ad una diminuzione dei livelli di glucosio nel sangue.

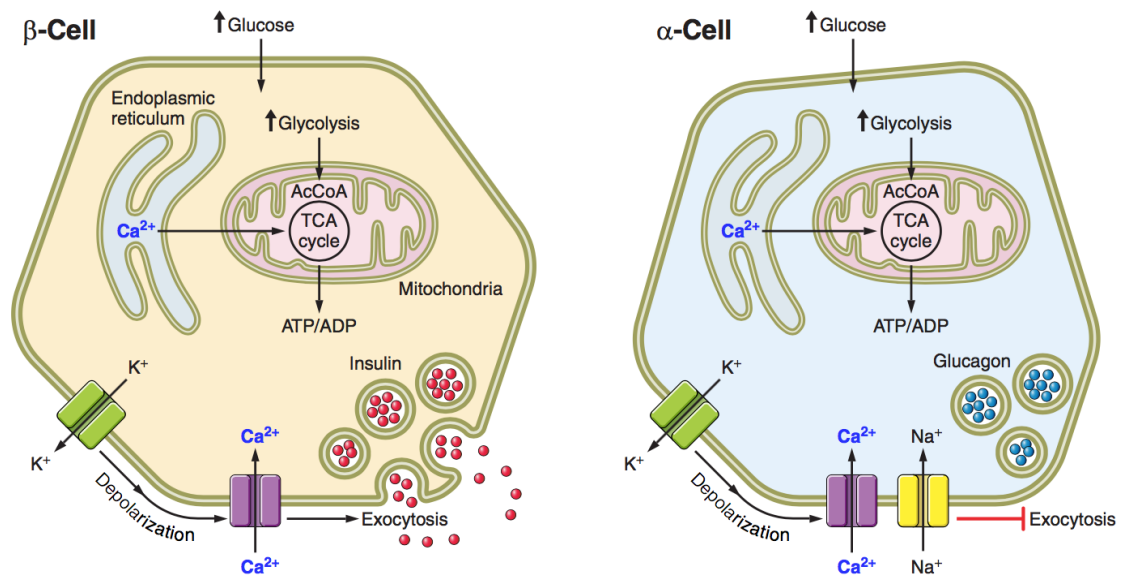
Fino al 1955, l'esistenza di questo secondo ormone prodotto dalle isole pancreatiche era stata solamente ipotizzata in seguito all'osservazione degli effetti iperglicemizzanti ottenuti tramite la somministrazione di estratti pancreatici, in particolare da Kimball e Murlin (Piro & Purrello 2008). Questi autori ipotizzavano la presenza di un ormone distinto dall'insulina, in seguito chiamato glucagone, che determinava iperglicemia transitoria dopo la somministrazione di estratti di insulina. Nel 1957, Straub per primo purificò e ottenne la sequenza di questo ormone, e descrisse la capacità di ripristinare l'effetto ipoglicemizzante ottenuto con l'insulina (Piro & Purrello, 2008). Tuttavia, a causa delle difficoltà di misurazione e dell'instabilità della molecola, le misurazioni quantitative sono state effettuate solo dopo l'avvento delle metodiche di dosaggio radioimmunologico (*Radio-Immuno-Assay*, RIA). Ulteriori studi hanno poi dimostrato che gli stimoli ipoglicemizzanti sono in grado di stimolare la secrezione di glucagone e, inoltre, che quando la glicemia aumenta, la secrezione di glucagone si riduce (Piro & Purrello 2008).

Il glucagone è un ormone costituito da 29 aminoacidi, processato a partire dal suo precursore, il proglucagone. Il gene del proglucagone è espresso nelle  $\alpha$ -cellule pancreatiche, nelle cellule enteroendocrine intestinali e nei neuroni del tratto solitario e dell'ipotalamo. Tale gene codifica una proteina di 180 aminoacidi che viene processata in modo differenziale nei vari tipi di cellule a causa dell'espressione tessuto specifica dell'enzima pro-ormone convertasi (PC), il quale taglia il proglucagone in differenti siti, [figura 21]. La presenza massiva di PC2 nelle  $\alpha$ -cellule porta ad una produzione predominante di glucagone. Contrariamente, nelle L-cellule intestinali e nel SNC, la presenza predominante di PC1/3 permette la produzione di GLP-1, GLP-2, glicentina e oxintomodulina.



**Figura 21.** Meccanismi di diverso processamento del proglucagone in base all'attività e alla localizzazione tessuto specifica dell'enzima pro-ormone convertasi (PC). Tratta da Sandoval & D'Alessio 2015.

La secrezione di glucagone da parte delle  $\alpha$ -cellule del pancreas è regolata dalla presenza di una comunicazione elettrica tra diversi canali ionici. Il canale del potassio ATP-sensibile ( $K_{ATP}$ ) è considerato il principale regolatore della secrezione di glucagone (Cheng-Xue *et al.* 2013, Gromada *et al.* 2004); è infatti in grado di innescare variazioni del potenziale di membrana in risposta all'aumento dei livelli intracellulari del rapporto ATP/ADP. Quando i livelli del glucosio nel sangue aumentano, questo viene trasportato all'interno delle  $\alpha$  e  $\beta$ -cellule e tramite metabolismo ossidativo viene prodotto ATP. L'aumento del rapporto ATP/ADP determina la chiusura dei canali  $K_{ATP}$  e conseguente depolarizzazione della membrana che porta all'apertura dei canali del calcio ( $Ca^{2+}$ ). L'aumento del flusso di  $Ca^{2+}$  intracellulare induce l'esocitosi dei granuli secretori contenenti insulina da parte delle  $\beta$ -cellule. Contemporaneamente, la depolarizzazione della membrana, determina l'apertura dei canali del sodio ( $Na^+$ ) voltaggio-dipendenti presenti sulle  $\alpha$ -cellule vicine bloccando l'esocitosi dei granuli contenenti glucagone (Sandoval & D'Alessio 2015), [figura 22].



**Figura 22.** Meccanismo di secrezione di insulina e glucagone da parte rispettivamente delle  $\beta$  e  $\alpha$ -cellule pancreatiche. Tratta da Sandoval & D'Alessio 2015.

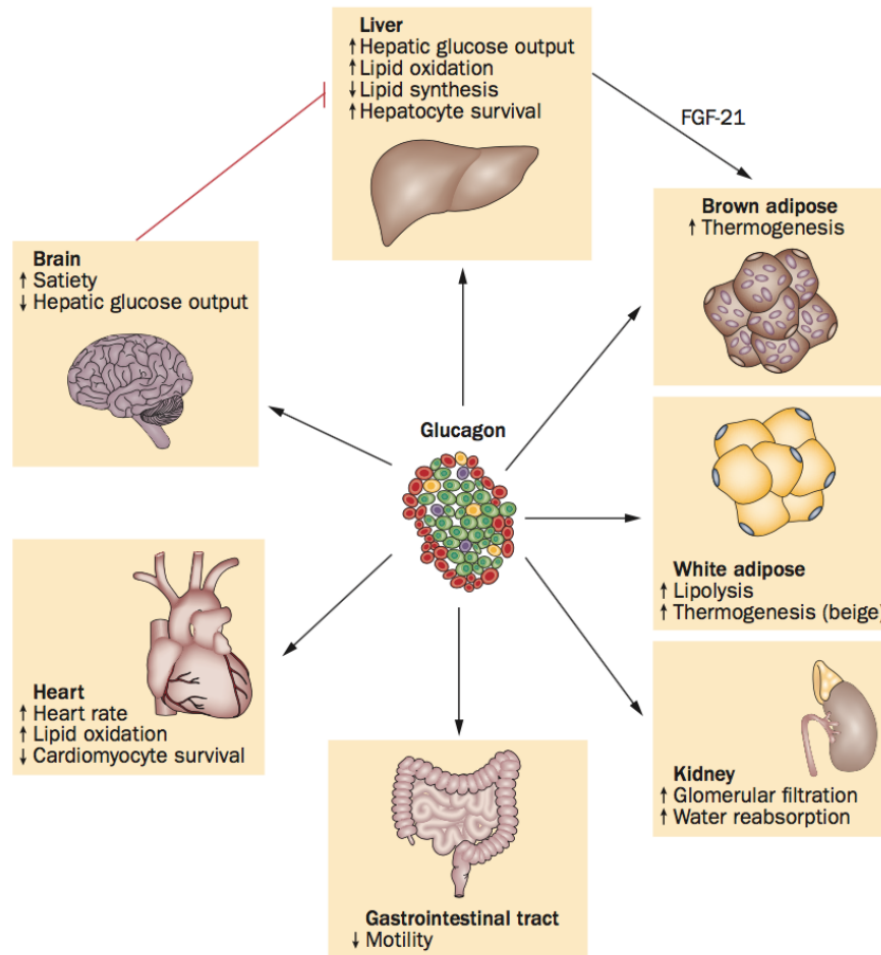
Quando i livelli di glucosio nel sangue si abbassano e il rapporto ATP/ADP diminuisce, i canali  $K_{ATP}$  si aprono, determinando l'iperpolarizzazione del potenziale di membrana. Questa variazione determina l'apertura dei canali del  $Ca^{2+}$  e l'aumento del flusso di  $Ca^{2+}$  intracellulare induce l'esocitosi dei granuli secretori contenenti glucagone.

La secrezione di glucagone, analogamente a quella dell'insulina, è strettamente regolata dai livelli di glucosio nel sangue. Da una parte, bassi livelli di glucosio inibiscono la secrezione di insulina, dall'altra, stimolano la secrezione di glucagone da parte delle  $\alpha$ -cellule pancreatiche. Questa azione del glucosio sembra essere dovuta ad un'azione diretta dello stesso sulla  $\alpha$ -cellula, in quanto si verifica a concentrazioni glicemiche inferiori alla soglia di stimolo della secrezione di insulina. La stessa insulina inibisce il rilascio di glucagone con un meccanismo paracrino, grazie alla vicinanza tra le cellule pancreatiche (Gromada *et al.* 2007). Il risultato finale è determinato, quindi, da tutte le interazioni cellulari dell'isola pancreatica e dal prodotto dei vari ormoni che stimolano o inibiscono cellule vicine.

Oltre al ruolo del glucosio, ad oggi sono noti altri stimoli che sembrano regolare la secrezione del glucagone, come il GLP-1, GLP-2, gli acidi grassi, il sistema nervoso autonomo e gli aminoacidi circolanti (Meier *et al.* 2006, Dunning *et al.* 2005, Bollheimer *et al.* 2004).

Gli effetti del glucagone sono mediati dal legame dell'ormone ad un recettore specifico (GCGR) appartenente alla famiglia dei recettori accoppiati a proteina G (Mayo *et al.* 2003). Tale recettore presenta una sequenza altamente conservata nell'uomo ed è costituito da 485 aminoacidi, dei

quali 143 costituiscono il dominio extracellulare (Soni 2016). Il recettore del glucagone è espresso abbondantemente nel fegato, ma anche nel cervello, nel cuore, nel rene, nel tratto gastrointestinale e nel tessuto adiposo (Campbell & Druker 2015), [figura 23].



**Figura 23.** Azioni fisiologiche mediate dal glucagone tramite il legame al suo recettore, il quale risulta espresso nel fegato, nel cervello, nel cuore, nel rene, nel tessuto adiposo e nel tratto gastrointestinale. Tratta da Campbell & Druker 2015.

Studi su topi con delezione del gene GCGR (topi GCGR<sup>-/-</sup>) presentano livelli di glucosio nel sangue più bassi e aumentata tolleranza al glucosio rispetto ai controlli (Conarello *et al.* 2007, Gelling *et al.* 2003). L'aumento della tolleranza al glucosio non è correlato ad un aumento della secrezione di insulina, ma piuttosto ad una maggiore sensibilità all'insulina (Sørensen *et al.* 2006). Se sottoposti a digiuno prolungato, i topi GCGR<sup>-/-</sup> presentano grave ipoglicemia, dimostrando il ruolo fondamentale del glucagone nel mantenimento della glicemia (Conarello *et al.* 2007, Gelling *et al.* 2003) Inoltre in questi animali è stato osservato un aumento delle dimensioni del pancreas, principalmente attribuito ad iperplasia delle  $\alpha$ -cellule, dimostrando che la segnalazione mediata dal recettore è importante per la normale proliferazione cellulare (Gelling *et al.* 2003).

Il legame del glucagone al suo recettore innesca l'attivazione della proteina G stimolatoria, con la conseguente attivazione dell'adenilato ciclasi che aumenta i livelli intracellulari di cAMP. Alla produzione di questo secondo messaggero cellulare segue l'attivazione della proteina chinasi A (PKA). Oltre a questo *pathway*, il glucagone è implicato nell'attivazione di altre vie di segnalazione mediate da AMPK (*5'-AMP-activated protein kinase*), MAPK (*mitogen-activated protein kinase*) e JNK (*c-Jun N-terminal kinase*) (Kimball *et al.* 2004, Chen *et al.* 1998).

### 1.6.1 Fisiopatologia

In condizioni fisiologiche, il glucagone viene rilasciato nel flusso ematico in risposta all'ipoglicemia per contrastare l'azione dell'insulina nei tessuti periferici, prevalentemente nel fegato, agendo come un contro-regolatore per il ripristino della normoglicemia. Nel fegato, il glucagone inibisce la demolizione del glucosio attraverso la glicolisi e promuove la sintesi di glucosio attraverso la gluconeogenesi. Inoltre, stimola la demolizione di glicogeno epatico attraverso la glicogenolisi e contemporaneamente inattiva la glicogenogenesi. In questo modo, mediante il blocco della glicolisi, la stimolazione della demolizione del glicogeno e l'induzione della gluconeogenesi, il glucagone consente al fegato di rilasciare glucosio, ripristinando i livelli normali dello zucchero nel sangue.

Oltre alla principale funzione di regolatore dell'omeostasi glicemica, il glucagone è implicato in numerosi processi metabolici altrettanto importanti.

Già negli anni '60, diversi studi hanno riportato l'effetto del glucagone sulla mobilitazione dei lipidi e sulla regolazione dei lipidi nel plasma (Caren & Corbo 1960, Salter *et al.* 1960, Paloyan & Harper 1961, Amatuzio *et al.* 1962). La somministrazione intravenosa dell'ormone diminuisce i livelli di colesterolo e la concentrazione dei lipidi nel plasma (Amatuzio *et al.* 1962, Paloyan & Harper 1961).

Il glucagone presenta anche un effetto inibitorio sulla sintesi epatica dei trigliceridi. Studi effettuati su modelli di ratto affetti da iperlipidemia mostrano che il glucagone diminuisce significativamente i livelli di trigliceridi e di colesterolo-VLDL (*Very Low Density Lipoprotein*) (Eaton 1973). Questo effetto sembra correlare all'aumento del *signaling* del glucagone che regola il catabolismo dei lipidi e accelera l'eliminazione dei trigliceridi dal compartimento plasmatico (Guettet *et al.* 1991).

Tuttavia, gli effetti del glucagone sul metabolismo dei lipidi non si limitano ai trigliceridi e al colesterolo presenti in circolo. Il glucagone agisce direttamente anche sul tessuto adiposo

sostenendo la lipolisi (Richter *et al.*, 1989). Tale ormone promuove la mobilitazione dei trigliceridi attraverso l'attivazione dell'enzima lipasi ormone sensibile (HSL) (Perea *et al.* 1995). L'HSL libera gli acidi grassi che vengono esportati al fegato e altri tessuti, come cuore, muscolo scheletrico e rene, dove possono essere utilizzati come combustibili metabolici al posto del glucosio. In particolare, il fegato è in grado di convertire questi acidi grassi in corpi chetonici che provvedono ai 2/3 dell'energia fornita al cervello nei periodi di ipoglicemia, portando così ad un risparmio di glucosio (Nair *et al.* 1988). In questo senso, il glucagone stimola la produzione dei corpi chetonici e l'ossidazione degli acidi grassi, mentre diminuisce la loro esterificazione (Vons *et al.* 1991).

Il glucagone è anche implicato nel controllo del dispendio energetico e della termogenesi. Studi condotti *in vitro* hanno dimostrato che l'iperglucagonemia aumenta il dispendio energetico stimolando il consumo di ossigeno e la produzione di calore da parte del tessuto adiposo bruno (Kuroshima & Yahata 1979, Joel 1966). Dati ottenuti da studi su ratti (Martin & Novin 1977) e sull'uomo (Geary *et al.* 1992, Penick & Hinkle 1961, Stunkard *et al.* 1955) hanno mostrato che la somministrazione intravenosa di glucagone durante un pasto aumenta il senso di sazietà e diminuisce l'assunzione di cibo, andando ad agire direttamente sul sistema nervoso centrale.

Il glucagone, quindi, può stimolare processi catabolici e di termogenesi, andando a controbilanciare i suoi effetti anabolici legati alla regolazione dell'omeostasi glicemica. Il glucagone inoltre promuove il dispendio energetico: sia nei topi, sia nell'uomo, l'infusione di quest'ormone risulta in un aumentato consumo di ossigeno (Habegger *et al.* 2010). Studi *in vitro* hanno suggerito che questo effetto potrebbe essere mediato dal tessuto adiposo bruno (BAT): le basse temperature provocano infatti un aumento dei livelli di glucagone nel plasma, facendo pensare ad un suo ipotetico ruolo nella termogenesi "non da brivido". Ciò nonostante, recenti evidenze hanno indicato che il glucagone svolge questa funzione indipendentemente dall'attivazione del BAT nell'uomo, forse per via dell'esistenza di meccanismi alternativi (come un ciclo futile del substrato) sottostanti l'attività termogenica dell'ormone (Salem *et al.* 2016).

È interessante notare che il glucagone potrebbe attivare altri fattori tipici del metabolismo a digiuno, come FGF21 (*Fibroblast Growth Factor 21*), coinvolti nella stimolazione dell'attivazione dei depositi di grasso bruno (Habegger *et al.* 2013). Gli effetti sopra descritti del glucagone potrebbero essere sfruttati nella terapia del paziente obeso o affetto da T2D; tuttavia, l'uso del glucagone in monoterapia è associato a stimolo della gluconeogenesi e glicogenolisi epatica, determinando quindi un effetto contrario al beneficio metabolico (Kazda *et al.* 2016).

Attualmente, l'utilizzo del glucagone come farmaco è limitato al trattamento degli episodi ipoglicemici gravi, che possono verificarsi nei pazienti con diabete mellito trattati con insulina.

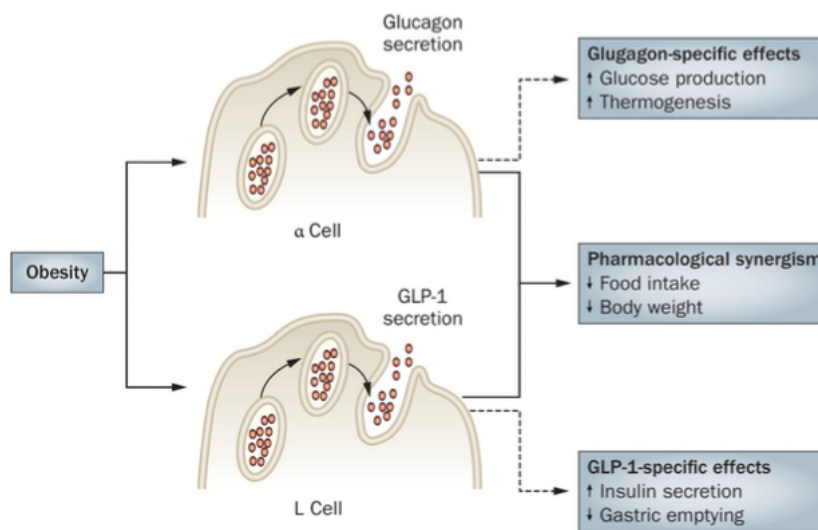
In aggiunta, i numerosi effetti positivi sul metabolismo lipidico, sul dispendio energetico e sull'assunzione di cibo fanno del glucagone un possibile agente farmacologico nel trattamento della dislipidemia e dell'obesità. Tuttavia, la somministrazione cronica di glucagone, potrebbe accelerare lo sviluppo di intolleranza al glucosio e insulino-resistenza (Hebberg 2010), oltre ad avere effetti negativi sul cuore e sulla chetosi.

### 1.6.2 Co-agonismo GLP-1R/GcgR

La ricerca di singole molecole e, grazie allo sviluppo di recenti approcci altamente tecnologizzati, di singoli meccanismi per il trattamento dell'obesità e in generale della sindrome metabolica è tutt'ora in corso. Sfortunatamente però la cura di malattie metaboliche complesse come queste non ha portato ancora i risultati desiderati in termini di efficacia clinica.

In considerazione del fatto che sommare più terapie si sta dimostrando sempre più spesso un approccio non vantaggioso (come nel trattamento di diabete mellito di tipo 2, ipertensione ed altre patologie tipiche dell'età avanzata), una promettente strategia farmacologica consiste nell'integrare più meccanismi all'interno di una singola molecola (Sánchez-Garrido *et al.* 2017, Tschöp *et al.* 2016, Finan *et al.* 2015). Un approccio unimolecolare di questo tipo è, infatti, in grado di garantire vantaggi superiori sia in termini di farmacocinetica, sia di farmacodinamica. In questo contesto, è ormai dato certo che la simultanea infusione di GLP-1 e glucagone è in grado di produrre una ingente perdita di peso e un aumento di consumo energetico nell'uomo. Dunque, lo scopo di un doppio agonismo GLP-1R/GcgR, sarebbe quello di accoppiare le proprietà termogeniche e gli effetti lipolitici indotti dal glucagone, con l'attività anoressizzante e insulinotropica glucosio-dipendente offerta dal GLP-1, senza che si verificano problematiche di iperglicemia associate al solo uso del glucagone. Per quanto, infatti, i due ormoni possiedano effetti opposti sul controllo della glicemia, è stato ipotizzato che l'integrazione delle loro diverse attività potrebbe minimizzare il rischio di effetti collaterali, [figura 24]. Il progetto è inoltre possibile, dal momento che GLP-1 e glucagone agiscono su recettori strutturalmente affini ed entrambi gli ormoni peptidici condividono un'elevata omologia di sequenza all'N-terminale (Soni 2016).



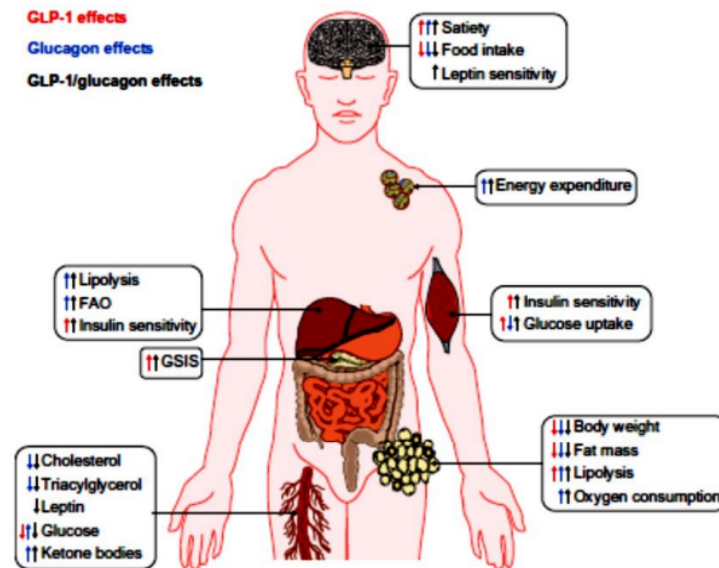


**Figura 24.** Effetti sinergici del glucagone e del GLP-1 nel trattamento dell'obesità. Tratta da Heberger et al. 2010.

Di recente, due indipendenti gruppi di ricerca hanno lavorato in questa direzione provando che è possibile ricostruire questa molecola chimerica. Day *et al.* hanno sviluppato un peptide avente come “impalcatura di base” la struttura del glucagone, all’interno della quale è stato incorporato il GLP-1 nativo: la molecola è stata modificata poi nella seconda posizione della sua sequenza aminoacidica, rendendola quindi resistente al taglio proteolitico della DPP-4, e vi è stato addizionato un motivo PEG (polietilenglicole) lineare di 40 kDa per aumentare il suo tempo d’azione. In studi preclinici condotti su topi DIO (*Diet-Induced Obese*) questo co-agonista peptidico GLP-1/glucagone PEGilato ha prodotto un’importante perdita di peso, un aumento del dispendio di energia e miglioramenti nella steatosi epatica; i risultati si sono mostrati migliori anche di quelli ottenuti in esperimenti con singoli agonisti del GLP-1R PEGilati realizzati nello stesso modello murino (Day *et al.* 2009, 2012).

Pocai *et al.* hanno altrettanto ricostruito un peptide chimerico co-agonista GLP-1R/GgcR resistente all’azione della DPP-4, utilizzando come struttura di base la oxintomodulina (OXM): questi ultimi hanno inoltre accorpato alla molecola un piccolo motivo a base di colesterolo e un mini spacer PEG, al fine di prolungare il suo profilo d’azione. Anche in questo caso, in modelli di topi DIO, il doppio agonista ha riportato buoni risultati nella perdita di peso e nell’assunzione di cibo se paragonato ai singoli agonisti (Pocai *et al.* 2009). Infine, un effetto sulla riduzione della steatosi epatica è stato recentemente dimostrato nel topo in seguito a trattamento con *dual agonist* (More *et al.* 2017).

Questi lavori indipendenti hanno dimostrato come i doppi agonisti garantiscano una maggiore efficacia clinica del controllo glicemico e a fini anoressizzanti, soprattutto per ridurre i rischi diabetogeni associati all'utilizzo del glucagone in monoterapia, [figura 25].



**Figura 25.** Effetti metabolici esercitate dal co-agonismo GLP-1R/GcgR su alcuni organi chiave nella regolazione dell'omeostasi energetica (cervello, BAT, tessuto adiposo, muscolo, fegato, pancreas e a livello sistemico). Tratta da Sánchez-Garrido et al. 2017.

Tuttavia, ad oggi, gli esatti meccanismi molecolari sottostanti gli effetti delle incretine e del glucagone sul processo di *browning* rimangono ancora da chiarire e non esistono ancora evidenze sperimentali circa le azioni dirette esercitate da queste molecole su tale processo nel tessuto adiposo bianco. La conoscenza dei meccanismi alla base del *browning* e l'identificazione dei fattori fisiologici endogeni capaci di stimolare tale fenomeno rappresentano un punto fondamentale per il futuro utilizzo terapeutico della stimolazione del tessuto adiposo bruno come nuova strategia terapeutica per l'obesità e le malattie metaboliche associate.

## 2. SCOPO DEL LAVORO

Lo sviluppo di obesità si associa ad una disfunzione del tessuto adiposo bianco (WAT) e a disregolazione della funzione adipocitaria. Il tessuto adiposo bruno (BAT), a differenza di quello bianco, accumula un minor quantitativo di lipidi che trasforma in calore e sembra esercitare una funzione di regolazione positiva sull'equilibrio metabolico. Per questo motivo, se da una parte vi è un crescente interesse nella ricerca di nuove strategie terapeutiche basate su un'azione diretta sul tessuto adiposo bianco, allo stesso tempo risulta rilevante la possibilità di stimolare il tessuto adiposo bruno nell'adulto a scapito dell'espansione anomala del WAT in caso di disordini patologici, quali l'obesità e il diabete mellito di tipo 2. Negli ultimi anni, alcuni agonisti del recettore del *glucagon-like peptide 1* (GLP-1Ras), ampiamente utilizzati nella terapia del diabete di tipo 2, hanno mostrato risultati promettenti anche sulla riduzione del peso corporeo, rivelandosi agenti terapeutici per il trattamento dell'obesità. In un recente studio preclinico, il nostro laboratorio ha dimostrato che diversi GLP-1Ras (GLP-1 nativo, liraglutide) interferiscono con la capacità proliferativa e differenziativa di cellule staminali adulte umane derivate da tessuto adiposo bianco sottocutaneo (S-ASC), ipotizzando un'azione diretta sul comparto adiposo. A seguito di queste evidenze, abbiamo ritenuto interessante prendere in considerazione un altro ormone chiave nella regolazione dell'omeostasi metabolica, il glucagone, prodotto del gene pro-glucagone insieme al GLP-1 a partire da un precursore poi sottoposto a *splicing* postrascrizionale.

Lo scopo della prima parte di questo lavoro è stato quello di indagare gli effetti esercitati *in vitro* dal glucagone sulla capacità proliferativa di un modello di cellule precursori dell'adipocita umano S-ASC) e sulla loro capacità differenziativa verso l'adipocita bianco maturato *in vitro*. Inoltre, abbiamo dimostrato l'espressione proteica del recettore del glucagone (GCGR) e del recettore del GLP-1 (GLP-1R) mediante tecniche diverse, confermando gli effetti diretti del glucagone e dei GLP-1Ras sul comparto staminale adiposo. Infine, abbiamo valutato i meccanismi molecolari coinvolti nell'azione del glucagone e del GLP-1 sulle S-ASC e il ruolo di entrambi i recettori che mediano tali effetti simili.

Lo scopo della seconda parte del lavoro è stato quello di comparare gli effetti di glucagone, liraglutide e GLP-1(7-36) sulla riduzione del differenziamento adipogenico *in vitro* delle S-ASC e, nello specifico, di indagare l'azione di queste tre molecole sulla stimolazione del processo di

differenziamento in adipociti di tipo bruno (*browning*). Per questo motivo, è stata prima eseguita un'analisi morfologica degli adipociti differenziati con le tre molecole e la valutazione dei marcatori caratteristici del *lineage* adipocitario bianco. Successivamente, abbiamo condotto un'analisi dei marcatori staminali specifici del *lineage brite* e del differenziamento adipocitario bruno nelle stesse cellule in presenza dei tre trattamenti. È stato utilizzato come controllo positivo un modello umano già caratterizzato di una popolazione primaria di cellule staminali adipose bianche contenenti precursori *brite* (B-ASC), isolate dal grasso viscerale che riveste la surrene affetta da feocromocitoma, condizione in cui i livelli elevati di catecolamine prodotte dal tumore inducono il *lineage* bruno. Infine, a supporto del fatto che la stimolazione con glucagone, liraglutide e GLP-1(7-36) determina uno *shift* verso fenotipo bruno delle S-ASC indotte, è stata valutata la morfologia e la funzionalità dei mitocondri negli adipociti indotti a differenziare in presenza delle tre le tre molecole.

### 3. MATERIALI E METODI

#### 3.1 Materiali

I mezzi e il siero di coltura delle cellule sono Sigma-Aldrich (Milano, Italia), mentre il materiale di plastica è Corning (Milano, Italia).

Tutti gli altri reagenti necessari per le colture cellulari, per la microscopia sono della Sigma Aldrich (Milano, Italia), se non diversamente indicato.

Il colorante Coomassie per il dosaggio delle proteine è della Bio-Rad Labs (Hercules, CA, USA).

AdipoRed è fornito da Lonza (Milano, Italia).

Liraglutide è fornito dalla Novo Nordisk (SK), mentre GLP-1(7-36), Exendin(9-39), glucagone e des-His1- [Glu9]-glucagon(1–29) sono della Sigma Aldrich.

#### 3.2 Casistica

I campioni di tessuto adiposo sottocutaneo sono stati prelevati durante operazione chirurgica da pazienti sottoposti a chirurgia addominale elettiva, dopo opportuno consenso informato. Sono stati esclusi dallo studio i soggetti affetti da neoplasie, infezioni, infiammazione cronica o acuta e patologie auto-immuni. Nessuno di loro faceva terapia con steroidi o tiazolidinedioni.

Le biopsie di tessuto sottocutaneo sono state eseguite con bisturi ad ultrasuoni per minimizzare la possibilità di denaturazione e degradazione del campione. I campioni biotici ottenuti sono stati processati a fresco per ottenere popolazioni di cellule staminali (*Subcutaneous Adipose Stem Cell*, S-ASC) da mettere in coltura, oppure congelati immediatamente in azoto liquido per essere poi processati per l'estrazione di proteine ed acidi nucleici, oppure fissati in formalina per essere poi inclusi in paraffina per l'analisi immunostochimica.

Di seguito la casistica dei pazienti arruolati e alcune caratteristiche antropometriche note [tabella 1].

CASISTICA	ETA'	BMI (kg/m <sup>2</sup> )
13 pazienti: 5 maschi 8 femmine	55±16 (31-80)	39,4±9 (23-53,6)

**Tabella 1.** Caratteristiche antropometriche dei pazienti, le cui biopsie sono state utilizzate per la coltura delle cellule staminali. In tabella sono indicati i valori medi  $\pm$  SD di età e indice di massa corporea (BMI) e l'intervallo di variazione dei parametri analizzati nella coorte di pazienti.

### 3.3 Isolamento e coltura di cellule staminali umane adulte derivate da tessuto adiposo

L'isolamento delle cellule è stato eseguito secondo il protocollo modificato di Zuk (Zuk *et al.* 2001). I campioni di tessuto adiposo sottocutaneo sono stati prelevati dal paziente in condizioni di sterilità e posti in contenitori sterili contenenti una soluzione di PBS (*phosphate buffer saline*), supplementato con 200  $\mu$ g/ml di streptomicina e 200 U/ml di penicillina. Le biopsie di tessuto adiposo sono state lavate ulteriormente in PBS per ridurre la contaminazione da cellule ematiche. Successivamente le biopsie sono state processate per via meccanica, mediante sminuzzamento/spezzettamento con bisturi e pinze sterili, e tramite digestione enzimatica con collagenasi di tipo I (1 mg/ml in PBS) per 1 ora a 37°C. La collagenasi è stata poi inattivata con uguale volume di DMEM + 20% di siero fetale bovino (*fetal bovine serum*, FBS). I campioni sono stati centrifugati per 10 minuti a 800g: il pellet cellulare così ottenuto è stato risospeso e tenuto ad incubare per 10 minuti a temperatura ambiente in un tampone di lisi per globuli rossi RCLB (*Red Cell Lysis Buffer*: 155mM NH<sub>4</sub>Cl, 10nM KHCO<sub>3</sub>, 0,1mM EDTA). Dopo un'ulteriore centrifugazione di 10 minuti a 800g, il pellet è stato risospeso in DMEM + 20% FBS fresco e la sospensione cellulare è stata filtrata attraverso un filtro a maglie di 150  $\mu$ m di diametro per rimuovere eventuali detriti. Il filtrato è stato centrifugato nuovamente ottenendo la frazione vascolare stromale (*stromal vascular fraction*, SVF), la quale è stata trasferita in una piastra Petri di polistirene da 100 mm con mezzo di coltura completo (DMEM al 20% di siero fetale bovino (FBS), 100 mg/ml di streptomicina, 100 U/ml di penicillina, 2 mM di L-glutamina, 1 mg/ml di amfotericina-B). Questa prima piastratura costituisce il passaggio 0 (P0). Una volta terminata la fase di estrazione cellulare, le cellule sono

state incubate in apposito incubatore alla temperatura di 37°C, in presenza di CO<sub>2</sub> al 5%. Dopo 24 ore, le cellule non aderenti alla piastra di coltura sono state rimosse mentre quelle aderenti sono state sottoposte ad un doppio lavaggio in PBS. Dopo 2/3 settimane di messa in coltura, è stato possibile ottenere una popolazione cellulare confluyente ed omogenea dall'aspetto fibroblastoide. Quando è stata raggiunta la confluenza, le cellule sono state staccate con tripsina-EDTA a 37°C e di seguito amplificate in fiasche T75 (passaggio 1, P1). Tutti gli esperimenti sono stati effettuati con cellule a passaggi precoci, generalmente da P1 a P5, ed ogni esperimento è stato ripetuto almeno 3 volte utilizzando S-ASC di pazienti diversi.

I precursori adiposi *brite* (B-ASC) sono stati precedentemente isolati e caratterizzati secondo un protocollo molto simile a quello precedentemente descritto, e derivano da biopsie di tessuto adiposo prelevate nella zona circostante il tumore feocromocitoma (Di Franco *et al.* 2014).

### 3.4 Valutazione della proliferazione delle S-ASC

La capacità proliferativa delle S-ASC è stata valutata mediante l'applicazione di metodiche diverse.

#### *Conta cellulare*

Sono state piastrate  $7 \times 10^3$  cellule, in doppio, in multiwell da 12 pozzetti. Le cellule sono state fatte crescere in presenza o assenza di glucagone alle dosi di 1, 10 e 100 nM, di GLP-1(7-36) alla dose 10 nM e degli antagonisti Exendin(9-39) e glucagone e des- His1- [Glu9]-glucagon(1-29) alla dose 10 nM. Ad intervalli regolari di tempo, 1-2 e 3 giorni, le cellule sono state tripsinizzate e contate con camera di Burkner. Il numero di cellule è stato ottenuto contando l'esplicato di ciascun punto sperimentale; le cellule morte sono state escluse dalla conta dopo colorazione con Trypan Blue.

#### *Incorporazione di [<sup>3</sup>H] timidina*

La sintesi del DNA è stata valutata in base al quantitativo di [<sup>3</sup>H]TdR incorporata dalle cellule in seguito a precipitazione in buffer TCA (acido tricloroacetico). Le cellule sono state fatte crescere in terreno completo con 10% di FBS fino al 40-50% di confluenza, sono state deprivate del siero per 24h e successivamente sono state trattate con concentrazioni crescenti di MTT per 48h. 4h prima di bloccare la proliferazione, sono stati aggiunti 1.0 mCi/ml di [<sup>3</sup>H]TdR (6.7 Ci/mmol) in 10% di TCA preraffreddato. Dopo aver effettuato due lavaggi, prima con TCA, poi con metanolo, le cellule sono

state solubilizzate in 0.25 N NaOH, ed è stata misurata la radioattività mediante contatore di scintillazione. Gli esperimenti sono stati condotti in triplicato e ripetuti almeno tre volte.

*Valutazione della vitalità cellulare con tecnica citofluorimetrica*

$7 \times 10^3$  cellule sono state piastrate in multiwells da 12 pozzetti. Raggiunta la confluenza le cellule sono stimulate con glucagone (1-10-100 nM) per diversi tempi. È stato utilizzato il citofluorimetro Muse™ con il kit Conta & Vitalità per valutare l'effetto del glucagone sulla proliferazione cellulare. Tale sistema consente di valutare la vitalità mediante conta delle cellule vive discriminate da quelle morte sulla base dell'integrità della membrana cellulare. Ad ogni intervallo di tempo dell'esperimento (1-2 e 3 giorni) le cellule di ogni pozzetto sono state tripsinizzate e successivamente risospese in terreno fresco completo. In accordo con il protocollo, in ciascun tubo si aggiunge 380  $\mu$ L del reagente e poi 20  $\mu$ L della sospensione cellulare precedentemente preparata. Si incuba per 5 minuti a temperatura ambiente e al buio ed in seguito si effettua la lettura allo strumento precedentemente settato.

*Valutazione del ciclo cellulare con tecnica citofluorimetrica*

$4 \times 10^4$  cellule sono state piastrate in multiwells da 6 pozzetti. Raggiunta la confluenza sono stimulate con glucagone (1-10-100 nM) per diversi tempi. È stato utilizzato il sistema Muse™, con il kit Ciclo cellulare per valutare gli effetti del glucagone sulla duplicazione del DNA: tale sistema consente un'analisi quantitativa della distribuzione delle cellule nelle varie fasi del ciclo (G0/G1, S, G2/M). Ad ogni intervallo di tempo dell'esperimento (1-2 e 3 giorni) le cellule di ogni pozzetto sono state tripsinizzate e pellettate. Successivamente i pellet cellulari vengono fissati in etanolo 70% in modo da avere una concentrazione finale tra  $1 \times 10^5$  a  $1 \times 10^7$  cells/mL. In accordo con il protocollo, in ciascun tubo si aggiunge 200  $\mu$ L del reagente e poi 100  $\mu$ L della sospensione cellulare precedentemente preparata. Si incuba per 20 minuti a temperatura ambiente e al buio ed in seguito si effettua la lettura allo strumento precedentemente settato.

*Valutazione dell'apoptosi cellulare con tecnica citofluorimetrica*

$7 \times 10^3$  cellule sono state piastrate in multiwells da 12 pozzetti. Raggiunta la confluenza le cellule sono stimulate con glucagone (1-10-100 nM) per diversi tempi. Per poter valutare gli effetti



apoptotici del glucagone si utilizza il sistema in citofluorimetria Muse™, con il kit AnnessinaV.

Tale sistema consente un'analisi quantitativa di importanti parametri quali: vitalità, stato apoptotico e morte cellulare di campioni trattati e non. Il kit utilizza l'annessina V per rilevare la presenza della fosfatidilserina (PS) sulla membrana esterna delle cellule apoptotiche; inoltre viene utilizzato nel kit un marcatore di morte cellulare (7-ADD) come indicatore dell'integrità strutturale della membrana cellulare. Ad ogni intervallo di tempo dell'esperimento (1-2 e 3 giorni) le cellule di ogni pozzetto sono state tripsinizzate e successivamente risospese in terreno fresco completo. In accordo con il protocollo, in ciascun tubo si aggiunge 100 µL del reagente e poi 100 µL della sospensione cellulare precedentemente preparata. Si incuba per 20 minuti a temperatura ambiente e al buio ed in seguito si effettua la lettura allo strumento precedentemente settato.

### 3.5 Differenziazione in vitro dei precursori adiposi

La capacità differenziativa delle popolazioni isolate è stata valutata inducendo il differenziamento *in vitro* verso il fenotipo cellulare adipocitario. A tal fine le cellule sono state piastrate in multiwell da 12 o 6 pozzetti ad una densità di  $1,3 \times 10^4$  cells/mq<sup>2</sup> e sono state fatte aderire per 24 ore. Raggiunta la sub confluenza, il terreno di coltura completo è stato sostituito con il *medium* specifico per il differenziamento adipogenico, secondo il protocollo di Zuk (Zuk *et al.* 2001) ed è stato cambiato due volte alla settimana per tutto il periodo di induzione.

Per la differenziazione adipogenica verso fenotipo bianco, le cellule sono state messe in coltura con il mezzo di induzione adipogenica il quale conteneva DMEM con il 10% di FBS, 0,5 mM 3-isobutil-1-metilxantina (IBMX), 1 µM desametasone, 1 µM rosiglitazone e 10 µM di insulina per due settimane in presenza o assenza di glucagone, liraglutide, GLP-1(7-36) e degli antagonisti del GLP-1R e del GCGR a differenti concentrazioni. Per la differenziazione adipogenica verso fenotipo bruno, è stato utilizzato lo stesso *cocktail* di induzione adipogenica, al quale è stata aggiunta noradrenalina (NOR) 10 µM. Alla fine del periodo di differenziazione, le cellule sono in parte raccolte per la valutazione del contenuto proteico e/o dell'RNA messaggero e in parte colorate con il marcatore fluorescente *AdipoRed* o valutate al microscopio ottico dopo colorazioni specifiche.

Il colorante lipofilo *Oil Red O* (ORO) è ampiamente utilizzato per caratterizzare le cellule adipose differenziate, perché è in grado di legare i lipidi neutri nelle vescicole di grasso delle cellule differenziate *in vitro*, evidenziandole in rosso. I campioni cellulari sono stati fissati con formalina al 10% ed incubati per 60' a temperatura ambiente. Dopo questo periodo di incubazione si rimuove

la formalina e si lava la piastra con H<sub>2</sub>O sterile e poi si aggiunge isopropanolo al 60% per 2-5'. Si toglie poi l'isopropanolo e si aggiunge la *stock solution* formata da 2 parti di acqua distillata e 3 di soluzione madre (5mg/ml di ORO in isopropanolo al 99%) e la si lascia incubare per 5'. Successivamente si lava la piastra con H<sub>2</sub>O per allontanare il colorante in eccesso e si fotografano gli adipociti.

### 3.6 Analisi immunocitochimica mediante immunofluorescenza

I vetrini per l'indagine immunocitochimica sono stati allestiti piastrando  $5 \times 10^4$  cellule su vetrini copri-oggetto alloggiati in piastre da 6 pozzetti. Le cellule sono state indotte verso fenotipo adipocitario con l'apposito mezzo induttivo in presenza/assenza di glucagone, liraglutide, GLP-1(7-36) e degli antagonisti del GLP-1R e del GCGR alla dose 10 nM per due settimane. Le cellule sono state lavate in PBS e incubate con la soluzione di *AdipoRed* (1:120 in PBS) che marca in modo specifico i trigliceridi intracellulari. L'incorporazione del colorante AdipoRed può essere valutata mediante lettura in fluorescenza (485nm eccitazione; 535nm emissione) allo spettrofluorimetro (Wallac 1420-Victor, Perkin Elmer, MA, USA) oppure può essere visualizzata al microscopio a fluorescenza. In questo caso le cellule vengono fissate e permeabilizzate con una soluzione di paraformaldeide (PF) al 4% per 10 minuti e incubate con una soluzione (1:1000) di DAPI per colorare i nuclei. Dopo un lavaggio, i vetrini sono stati montati con Prolong Mounting Medium (Thermo Fisher Scientific, MA, USA), lasciati asciugare ed osservati con microscopio ad epifluorescenza Leica DM4000.

### 3.7 Real Time Quantitative RT-PCR e Analisi TaqMan

Per l'estrazione dell'mRNA, le cellule sono state lisate con il tampone RLT (Qiagen, Germania) addizionato con 1% di  $\beta$ -mercapto etanolo e l'mRNA totale è stato estratto con kit RNeasy Mini reagent (Qiagen, Germania). L'mRNA totale è stato quantificato mediante misurazione dell'assorbanza (260nm) allo spettrofotometro Nanodrop ND-1000.

Sono stati retrotrascritti 400 ng di mRNA totale usando il kit TaqMan RT-PCR (Applied Biosystems). La retrotrascrizione è stata effettuata secondo il seguente protocollo: 25°C per 10 minuti, 48°C per 30 minuti e 95°C per 3 minuti, in un volume finale di 80  $\mu$ l contenente 500 mM di KCl, 0,1 mM di EDTA, 100 mM di Tris-HCl a pH 8,3, 5,5 mM di MgCl<sub>2</sub>, 500  $\mu$ M di ciascun

desossinucleotide trifosfato (dNTP), 2,5  $\mu\text{mol/L}$  di esameri random, 0,4 U/ $\mu\text{l}$  di inibitore delle RNasi e 1,25 U/ $\mu\text{l}$  di trascrittasi inversa (Multiscribe Reverse Transcriptase).

La misura dell'espressione genica nei campioni retrotrascritti è stata effettuata mediante real time RT-PCR quantitativa usando il kit TaqMan Gene Expression Assay on demand (Applied Biosystems, Warrington, UK) con i primers e le sonde per i seguenti marcatori: GAPDH, adiponectina (APN), PPAR $\gamma$ , FABP4 e HSL, PRDM16, UCP-1, Tbx1 e CD137.

Sono stati aggiunti 12,5 ng di cDNA a 10  $\mu\text{l}$  di mix di PCR contenente ogni primer con sonda e 1x di Universal Master Mix. L'amplificazione dei campioni è stata effettuata secondo il seguente protocollo: 50°C per 2 minuti, 95°C per 10 minuti, 95°C per 15 secondi, 60°C per 1 minuto, per 40 cicli, effettuati in ABI Prism 7700 Sequence Detector (Applied Biosystems).

La quantità di espressione del gene bersaglio è stata normalizzata secondo l'espressione del GAPDH, il gene endogeno di riferimento e calcolata con la formula  $2^{-\Delta\Delta\text{Ct}}$  (Livak *et al.* 2001).

### 3.8 Estrazione e determinazione del contenuto proteico

Le cellule sono state staccate con PBS e ortovanadato (PBS-OVA) mediante *scraper* sterile, raccolte e successivamente centrifugate per 10 minuti a 6000 rpm a 4°C, il supernatante è stato rimosso. I pellet cellulari ottenuti sono stati lisati in tampone di lisi RIPA costituito da: 20 mM Tris-HCl (pH 7.4), 150 mM NaCl, 0,2 mM EDTA, 0.5% Triton X-100, 1 mM Na<sub>3</sub>VO<sub>4</sub> in H<sub>2</sub>O supplementato con gli inibitori delle proteasi e delle fosfatasi (Sigma). Il volume del buffer RIPA è stato aggiunto ad ogni campione in base alle dimensioni del pellet ed è stato fatto agire per 30 minuti in ghiaccio. La concentrazione proteica dei campioni, espressa in  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ , è stata valutata mediante l'applicazione del metodo Bradford (Bradford 1976). Viene utilizzato il Coomassie blue brilliant (Biorad, Hercules, CA), come colorante specifico delle proteine, che presenta un picco massimo di assorbimento ad una lunghezza d'onda ( $\lambda$ ) di 595 nm: il colorante si lega preferenzialmente ai residui basici ed aromatici delle proteine, determinando una colorazione del campione tanto più intensa quanto maggiore è la concentrazione proteica. L'allestimento della curva standard è stato effettuato utilizzando concentrazioni note crescenti di albumina sierica bovina (BSA) comprese nell'intervallo 0-10  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ , incubate per 30 minuti con il Coomassie (diluizione 1:5 in acqua deionizzata). L'assorbanza dei singoli punti è stata valutata allo spettrofotometro (Spectrophotometer 6405 UV/Vis, Jenway, UK) ad una  $\lambda$  di 595 nm e a ciascun valore è stata sottratta l'assorbanza del bianco (0  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$  BSA). Interpolando sulla curva standard ottenuta (assorbanza in funzione della

concentrazione) i valori di assorbanza registrati per ciascun campione in analisi, è stato possibile ottenere i relativi quantitativi proteici. La correlazione fra assorbanza e concentrazione è espressa dalla legge di Lambert-Beer:

$$A = \epsilon dc$$

dove A rappresenta l'assorbanza,  $\epsilon$  il coefficiente di estinzione molare, d il cammino ottico della soluzione, c la concentrazione del campione.

### 3.9 Elettroforesi monodimensionale su gel di poliacrilammide (SDS-PAGE) e analisi Western Blot

L'elettroforesi su gel di poliacrilammide con sodio dodecilsolfato (SDS-PAGE) è una metodica che consente di separare le proteine in base al loro peso molecolare, per individuare e analizzare quelle di interesse. A questo scopo, sono stati utilizzati gel *precast stain-free* (Bio-Rad) dotati di pozzetti singoli per il caricamento. Per la preparazione dei campioni, sono state prelevate aliquote contenenti la stessa quantità di proteine, ciascuna da 30  $\mu\text{g}$  totali, sono stati risospesi in un egual volume di tampone di corsa riducente (Sample Buffer 4X: 62,5 mM Tris pH 6.8, 20% glicerolo, 4% SDS, pironina, 200 mM ditiotreitolo - DTT) e sono stati bolliti per 10' a 70°C. La composizione del tampone di corsa, associata al processo di bollitura, permette di denaturare completamente le proteine che, in questo modo, acquisiscono una conformazione non strutturata; in particolare, il DTT agisce a livello dei ponti disolfuro riducendoli, mentre l'SDS si lega lungo la catena polipeptidica, denaturando le proteine e conferendo loro una carica netta negativa. Nel *Sample Buffer*, inoltre, sono presenti un tracciante ionizzabile, la pironina, che permette di seguire l'andamento della corsa elettroforetica, ed il glicerolo, che rende più densa la soluzione dei campioni in modo tale che si stratifichino sul fondo del relativo pozzetto. I campioni così preparati sono stati caricati all'interno dei pozzetti; un pozzetto per ciascun gel è stato riservato al caricamento di uno standard di peso molecolare (PageRuler Plus Prestained Protein Ladder, Fermentas, Milano, Italia), in modo da poter avere un riferimento durante e dopo la corsa e poter successivamente confrontare le proteine di interesse. Terminata la corsa elettroforetica, le proteine separate sono state trasferite dal gel ad una membrana di polivinilidene fluoruro (PVDF) compresa nel kit di trasferimento Trans-Blot Turbo™ Transfer system (Bio-Rad). La modalità di trasferimento del Trans-Blot Turbo™ consente di ottenere una rapida esecuzione (c.a 7 minuti vs

le 2 ore del tradizionale metodo di trasferimento proteico). Il kit è comprensivo di un buffer ottimizzante, della membrana di PVDF e di una carta assorbente. Durante la procedura, il gel viene copiato in membrana e posizionato all'interno dell'apposita cassetta elettrodica dello strumento (catodo). Avremo pertanto, partendo dall'alto verso il basso: la cassetta elettrodica superiore (catodo), un primo serbatoio ionico a pila, il gel, la membrana, il secondo serbatoio ionico a pila e la cassetta elettrodica inferiore (anodo). In tal modo, sfruttando il passaggio di corrente e la generazione di un campo elettrico, le proteine possono migrare dal gel alla membrana seguendo il movimento di corrente che va dal catodo all'anodo. Una volta terminato il trasferimento, le membrane di PVDF sono state incubate overnight a 4°C in agitazione con gli anticorpi primari specifici, opportunamente diluiti in T-TBS 1X (0,1% Tween-20, 10 mM Tris, 150 mM NaCl, pH 7.4). Le membrane sono state, quindi, sottoposte a 3 lavaggi da 10' in T-TBS per eliminare l'anticorpo primario e, successivamente, sono state incubate per 1 ora e mezza a temperatura ambiente ed in agitazione con gli anticorpi secondari, coniugati all'enzima HRP (Horseradish Peroxidase) e diluiti in T-TBS (diluizione 1:2000). Dopo i lavaggi in TTBS, le membrane sono state incubate con lo specifico liquido di sviluppo contenente substrato della perossidasi, il luminolo, ed acqua ossigenata (ECL detection kit, Immobilon, Merck-Millipore), e, in seguito alla reazione di chemiluminescenza, le immagini sono state acquisite dallo strumento Chemidoc (Chemidoc Touch, Bio-Rad Laboratories, Segrate, Milano, Italia) mediante il software Image Lab (Bio-Rad).

### 3.10 Analisi della funzionalità mitocondriale con Seahorse

L'analizzatore metabolico cellulare Seahorse XFe96 (Agilent, CA, USA) con il kit Cell Mito Stress misura in tempo reale e *in vivo* il *rate* del consumo di ossigeno (OCR) e di acidificazione extracellulare (ECAR) che permettono di determinare la quantizzazione della respirazione mitocondriale. Il kit comprende quattro molecole che interferiscono con i complessi della catena respiratoria mitocondriale: oligomicina (inibitore ATP sintasi), FCCP (disaccoppiante della fosforilazione ossidativa), Rotenone e Antimicina (inibitori dei complessi I e III rispettivamente). Per gli esperimenti sono state piastrate 2500 cellule in multiwells da 96. Le S-ASC sono state differenziate *in vitro* mediante specifico mezzo di induzione adipogenica in assenza o in presenza di glucagone, liraglutide e GLP-1(7-36) per due settimane. Al termine del periodo di induzione, è stato seguito il protocollo previsto dal kit per l'analisi funzionale. L'OCR è stata misurata in condizioni basali (con DMEM complementato con piruvato 1 mM, glutammina 2mM e glucosio

10mM) e in risposta a oligomicina, FCCP (alla concentrazione finale di 1  $\mu$ M per entrambi), Rotenone e Antimicina (alla concentrazione finale di 0.5  $\mu$ M). Il report viene generato automaticamente dal sistema con i valori ottenuti dalle misurazioni effettuate.

### **3.11 Microscopia elettronica e trasmissione e morfometria mitocondriale**

Le cellule tenute in coltura sotto diverse condizioni sperimentali sono state centrifugate, i pellet risospesi in 4% di glutaraldeide, fissati in 1% di tetrossido di osmio, e imbevuti in Epon 812. Sezioni ultrasottili sono state colorate con acetato uranile e subnitrito di bismuto alcalino e analizzate mediante microscopio elettronico JEM1010 (Jeol, Tokyo, Giappone). Le immagini sono state prese a ingrandimenti di 15000X, 50000X e 80000X utilizzando una fotocamera digitale MegaView III (SIS-Soft Imaging System, Munster, Germania), e quelle ottenute a ingrandimento maggiore sono state utilizzate per l'analisi morfometrica dei mitocondri. Sono stati scelti cinque campi citoplasmatici in maniera randomica per ogni condizione sperimentale, per un totale di circa 20 profili mitocondriali. L'area di superficie e il perimetro mitocondriale sono stati misurati utilizzando il Software di analisi delle immagini ITEM (SIS). I mitocondri sono stati contati in almeno 3 immagini ingrandite a 15000X per ciascun campione.

### **3.12 Analisi immunocitochimica mediante fluorescenza**

Sono state piastrate  $10^5$  cellule su vetrini copri-oggetto alloggiati in piastre da 6 pozzetti. Le cellule sono state sottoposte a specifica differenziazione e quindi fissate con una soluzione di paraformaldeide (PF) al 4% per 10 minuti. Successivamente i vetrini sono stati permeabilizzati a RT con una soluzione di PBS-Triton X-100 allo 0,2% per 10 minuti. Dopo lavaggio in PBS, i vetrini sono stati bloccati in siero di capra al 5% per 30 minuti a temperatura ambiente. Dopo lavaggio in PBS-Tween 0,05 % sono stati incubati per 2 ore RT con gli specifici anticorpi primari, anti-GCGR (diluizione 1:50), monoclonale anti-GLP1R (diluizione 1:50) e policlonale anti-GLP1R (diluizione 1:50), diluiti in siero di capra al 5%. Successivamente, dopo 3 lavaggi con PBS-Tween 0,05%, i vetrini sono stati incubati con anticorpo secondario IgG (anti-mouse o anti-goat, diluiti 1:100), coniugato con fluorocromo FITC, per 2 ore a temperatura ambiente. Dopo ulteriore lavaggio, i vetrini sono stati montati su vetrini porta-oggetto con Prolong Gold Antifade Mountant con DAPI (Thermo Fisher Scientific, MA, USA). Le immagini sono state acquisite al microscopio ad epifluorescenza Leica DM4000 (Leica Microsystems GmbH, Wetzlar, Germany). I controlli negativi

(non mostrati) sono stati preparati secondo la procedura, escludendo la fase di incubazione con l'anticorpo primario.

### **3.13 Espressione di GCGR e GLP-1R mediante analisi immunocitofluorimetrica**

L'analisi dell'espressione del recettore del glucagone (GCGR) e del recettore del GLP-1 (GLP-1R) nelle S-ASC è stata fatta mediante l'uso di anticorpi monoclonali (anti-GLP1R) e policlonali (anti-GCGR e anti-GLP1R) marcati con FITC e dei loro rispettivi controlli negativi (anticorpi secondari, Sigma-Aldrich). Le ASC in coltura sono state staccate con 20 mM di EDTA (acido etilendiamminotetraacetico) e contate in camera emocitometrica; aliquote corrispondenti a  $10^6$  cellule sono state centrifugate per rimuovere l'EDTA e i pellet risospesi in 1 ml di PBS.  $10^5$  cellule sono state incubate prima a 4°C per 10 minuti con il 15% di FBS e poi con gli specifici anticorpi primari a 4°C per 30 minuti. Le cellule sono state lavate con 0,5% BSA-PBS, risospese in 0,5 ml dello stesso buffer e quindi analizzate al citofluorimetro FACScan (Becton-Dickinson), la fluorescenza verde è stata misurata tramite fotomoltiplicatore FL1. Per ciascun campione sono stati acquisiti almeno 1000 eventi.

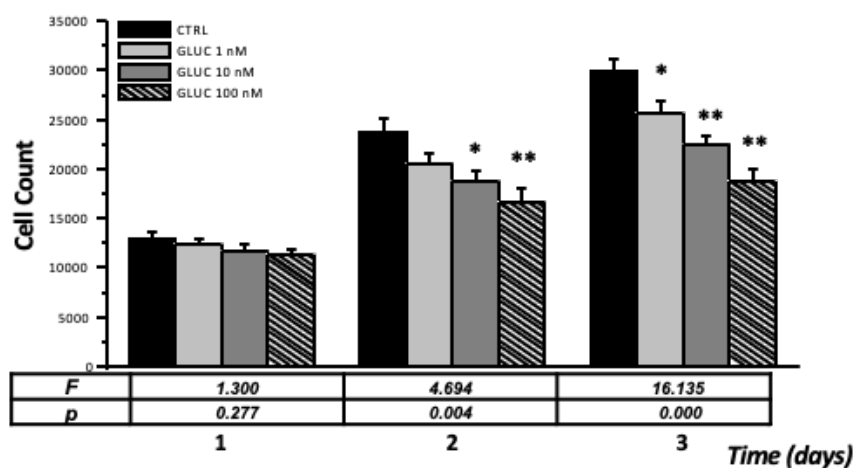
### **3.14 Analisi statistica**

I dati sono stati elaborati mediante l'uso del software Microcal Origin, versione 6.1 (MicroCal Software Inc., Northampton, MA, USA). Per verificare la distribuzione normale dei dati ottenuti è stato usato il test Kolmogorov-Smirnov. Per il confronto multiplo dei dati sono state fatte l'analisi della varianza (ANOVA) ed il test post hoc di Dunnett, mentre per confrontare due classi di dati è stato usato il test-t di Student. Valori di  $P < 0.05$  sono stati considerati statisticamente significativi. I risultati sono stati espressi come media  $\pm$  SE (*standard error*).

## 4. RISULTATI

### 4.1 Effetto anti-proliferativo del glucagone sulle S-ASC

Abbiamo valutato gli effetti del glucagone sulla proliferazione delle S-ASC, mediante esperimenti di conta cellulare. Le cellule sono state piastrate, in doppio, in *multiwells* da 12 pozzetti e, raggiunta la confluenza, sono state trattate o no (controllo negativo, ctrl) con tre diverse dosi di glucagone (1, 10 e 100 nM) per 1, 2 e 3 giorni. Ogni giorno le cellule vive sono state tripsinizzate e contate in doppio con camera di Burkner. Il grafico [figura 1] mostra come le cellule proliferino nel tempo in modo esponenziale e come il glucagone determini un'inibizione della crescita in maniera tempo-dipendente e dose-dipendente. L'effetto inibitorio è statisticamente significativo per la dose 1 nM a partire dal terzo giorno, per la dose 10 nM a e 100 nM a partire dal secondo giorno di trattamento. La più alta percentuale di inibizione (37%) si osserva con la dose 100 nM al terzo giorno di trattamento.

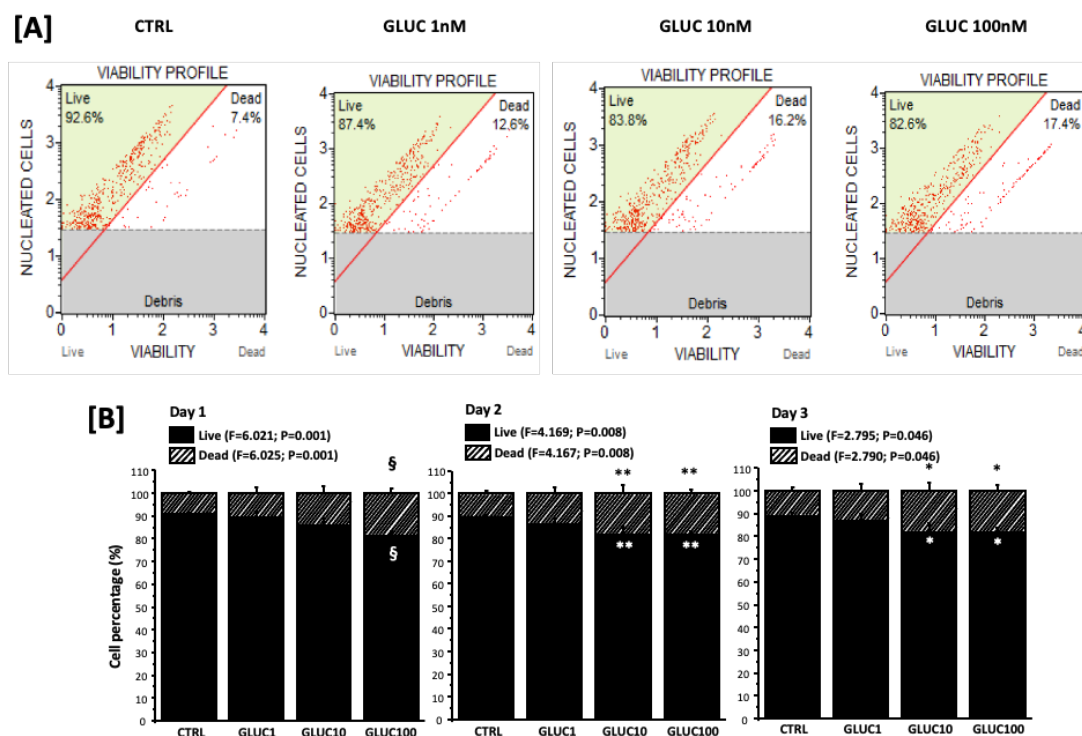


**Figura 1. Effetto inibitorio del glucagone sulla crescita cellulare delle S-ASC mediante conta cellulare.** Le cellule sono state trattate con tre dosi crescenti di glucagone (1-10-100 nM) a diversi tempi (1, 2 e 3 giorni). L'istogramma rappresenta la media  $\pm$  SE del numero di cellule contate. \* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$  glucagone vs il rispettivo ctrl.

Per confermare quanto osservato mediante conta cellulare, gli effetti del glucagone sulla proliferazione sono stati valutati mediante analisi citofluorimetrica (FACScan). Le cellule sono state piastrate in *multiwells* da 12 pozzetti e, raggiunta la confluenza, sono state stimulate con tre dosi crescenti di glucagone (1, 10 e 100 nM) per 1, 2 e 3 giorni. È stata valutata la percentuale di



inibizione della vitalità da parte dei diversi trattamenti verso il controllo e abbiamo visto che l'effetto inibitorio è statisticamente significativo per la dose 100 nM sin dal primo giorno di trattamento e per la dose 10 nM dal secondo giorno, con un incremento nel numero di cellule morte [figura 2A-B].

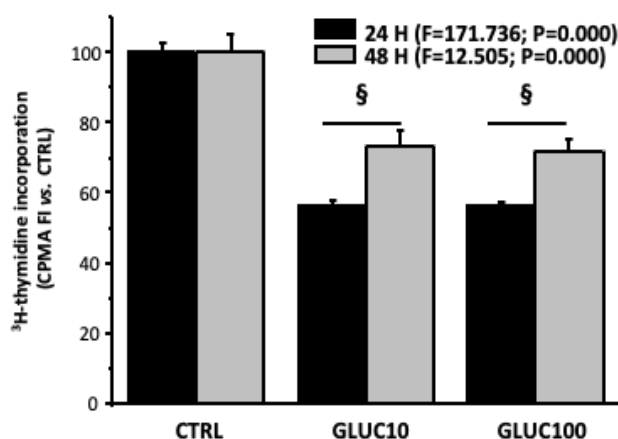


**Figura 2. Inibizione del glucagone sulla crescita cellulare delle S-ASC valutata mediante analisi citofluorimetrica. Le cellule sono state trattate con tre dosi crescenti di glucagone (1-10-100 nM) a diversi tempi (1, 2 e 3 giorni).**

**A:** L'immagine mostra i plots rappresentativi delle 24 ore ottenuti da esperimenti indipendenti di cellule S-ASC trattate in assenza (ctrl) e in presenza di glucagone 1, 10 e 100 nM.

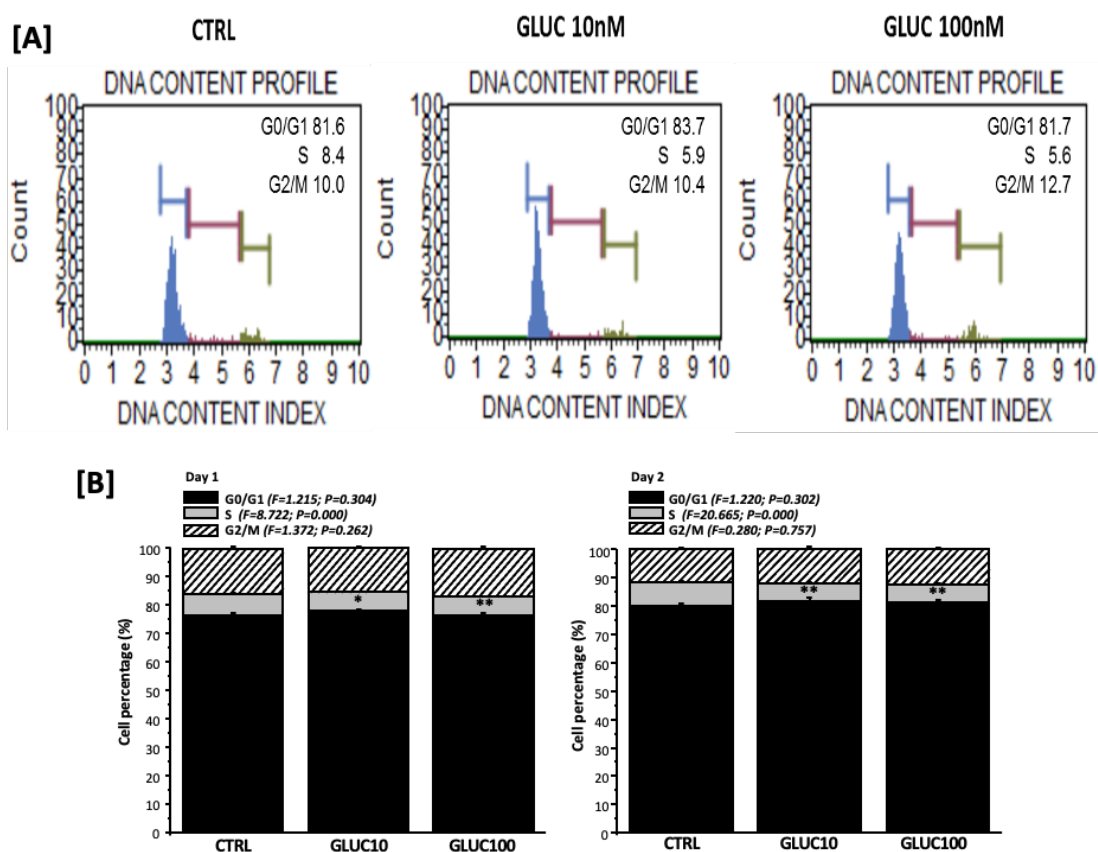
**B:** L'istogramma rappresenta la media percentuale  $\pm$  SE di cellule vive (live) e morte (dead). \* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$ , § $P < 0.000$  vs il rispettivo controllo.

Allo scopo di valutare la riduzione del *rate* proliferativo da parte del glucagone, è stato condotto un saggio di incorporazione della timidina triziata somministrando alle S-ASC le dosi di glucagone 10 e 100 nM per 24-48 ore. La timidina viene incorporata durante il ciclo di replicazione cellulare e la radioattività emessa è proporzionale al grado di proliferazione delle cellule: la radioattività incorporata nelle S-ASC è stata determinata mediante conte al Beta-Counter in seguito a lisi cellulare. I risultati ottenuti mostrano differenze statisticamente significative rispetto al controllo (S-ASC non trattate) per entrambe le dosi somministrate, indicando che il glucagone ha un effetto inibitorio sulla proliferazione cellulare dei precursori adiposi [figura 3].



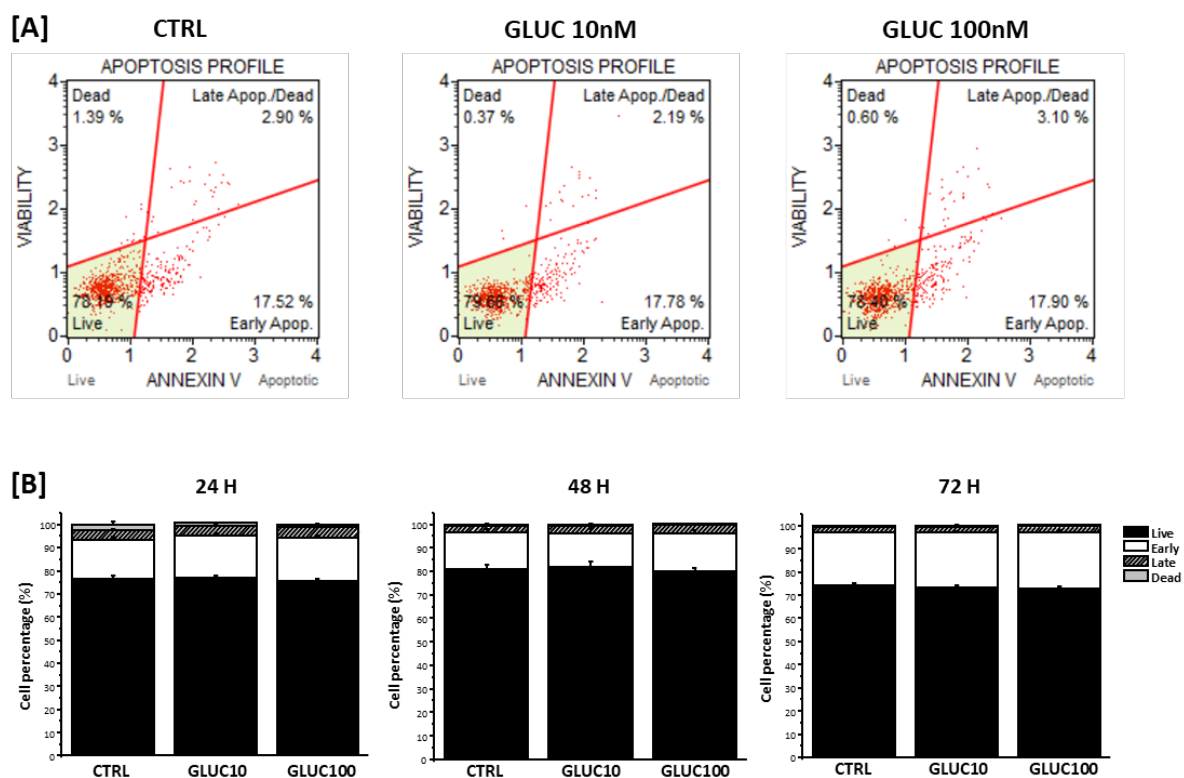
**Figura 3. Inibizione del glucagone sulla proliferazione delle S-ASC valutata mediante saggio di incorporazione della timidina triziata.** Le cellule sono state trattate con due dosi di glucagone (10-100 nM) a 24 e 48 ore. L'istogramma rappresenta la media percentuale  $\pm$  SE cpm (conte per minuto) dopo 4 ore di incubazione con [ $^3$ H]TdR.  $\S P < 0.000$  vs il rispettivo controllo.

L'effetto anti-proliferativo del glucagone è stato confermato mediante analisi citofluorimetrica del ciclo cellulare, andando a valutare la distribuzione delle cellule nelle varie fasi del ciclo G0/G1, S, G2/M in base al contenuto di DNA. Le cellule sono state piastrate in *multiwells* da 6 pozzetti e, raggiunta la confluenza, sono state trattate con due dosi di glucagone (10 e 100 nM) per 24 e 48 ore. Dall'analisi delle percentuali di cellule nelle diverse fasi del ciclo cellulare è emersa una riduzione significativa del numero di cellule in fase S per i trattamenti con glucagone alle dosi 10 e 100 nM già dopo 24 ore di trattamento (14% e 19% di inibizione per le dosi 10 e 100 nM a 24 ore di trattamento, 25% di inibizione per entrambe le dosi a 48 ore) [figura 4A-B].



**Figura 4. Riduzione della percentuale di cellule S-ASC in fase S associata al trattamento con glucagone valutata mediante analisi citofluorimetrica.** Le cellule sono state trattate con due dosi di glucagone (10-100 nM) a 24 e 48 ore. **A:** L'immagine mostra i plots rappresentativi delle 24 ore ottenuti da esperimenti indipendenti di cellule S-ASC trattate in assenza (ctrl) e in presenza di glucagone 10 e 100 nM. **B:** L'istogramma rappresenta la media percentuale  $\pm$  SE di cellule in fase G0/G1, in fase S e in fase G2/M. \* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$ ,  $P < 0.000$  vs il rispettivo controllo.

Infine, siccome la riduzione del numero di cellule osservata in seguito a trattamento con glucagone può derivare non solo dalla dimostrata inibizione della proliferazione ma anche da una concomitante stimolazione dell'apoptosi, è stata valutata l'eventuale attivazione dell'apoptosi precoce da parte del glucagone nelle S-ASC mediante analisi citofluorimetrica. Questa analisi prevede la marcatura delle cellule con Annessina V, proteina ad elevata affinità per la fosfatidilserina, che viene esposta sulla membrana plasmatica delle cellule durante le prime fasi del processo apoptotico. Anche in questo caso, le cellule sono state piastrate in *multiwells* da 12 pozzetti e sono state stimulate con due dosi di glucagone (10 e 100 nM) per tempi diversi (24, 48 e 72 ore). Come possiamo osservare sia dai *plots* rappresentativi che dai grafici a barre, non si apprezzano differenze significative fra le cellule di controllo e stimulate con glucagone nelle cellule vive e delle cellule in apoptosi tra i diversi trattamenti [figura 5A-B].



**Figura 5.** Il glucagone non attiva l'apoptosi precoce nelle S-ASC valutata mediante analisi citofluorimetrica. Le cellule sono state trattate con due dosi di glucagone (10-100 nM) per tempi diversi (24, 48 e 72 ore).

**A:** L'immagine mostra i plots rappresentativi delle 24 ore ottenuti da esperimenti indipendenti di cellule S-ASC trattate in assenza (ctrl) e in presenza di glucagone 10 e 100 nM.

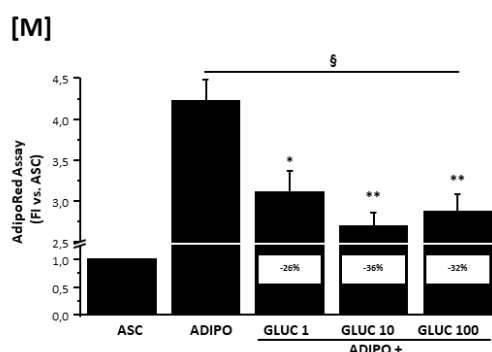
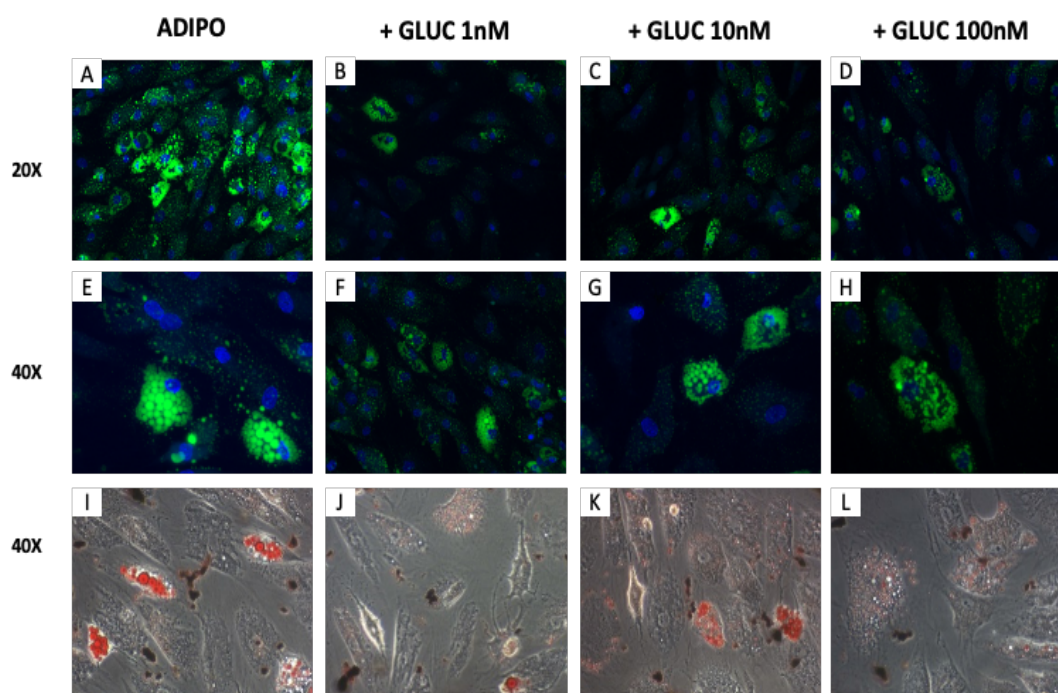
**B:** L'istogramma rappresenta la media percentuale  $\pm$  SE di cellule vive (live), in apoptosi precoce (early apop.), in apoptosi avanzata (late apop.) e morte (dead). Nessuna differenza statisticamente significativa vs il rispettivo controllo.

## 4.2 Effetto inibitorio del glucagone sull'adipogenesi in vitro

Abbiamo valutato gli effetti del glucagone sulla capacità differenziativa delle S-ASC tramite esperimenti di induzione adipogenica *in vitro*. A tal fine le cellule sono state piastrate in *multiwells* da 6 pozzetti e, raggiunta la confluenza, il terreno di coltura completo è stato sostituito con il mezzo di induzione adipogenica (0,5 mM IBMX, 1  $\mu$ M desametasone, 1  $\mu$ M rosiglitazone e 10  $\mu$ M di insulina) in presenza o assenza di glucagone (dosi 1-10-100 nM) per due settimane. Al termine del periodo di differenziazione, gli adipociti sono stati marcati con il colorante fluorescente AdipoRed, che evidenzia in modo specifico i depositi di trigliceridi intracellulari, e visualizzati mediante microscopia a epifluorescenza. Come si può apprezzare [figura 6A-H], le immagini mostrano una riduzione del contenuto lipidico intracellulare quando il differenziamento viene condotto in presenza di glucagone 1, 10 e 100 nM.

Per valutare ulteriormente l'accumulo lipidico intracellulare, al termine del periodo di induzione, le cellule sono state colorate con colorazione Oil Red O che rende visibile l'aspetto multiloculare caratterizzato da molte gocce lipidiche intracellulari, tipico dell'adipocita maturato *in vitro*. Mediante tale analisi qualitativa si osserva una riduzione della capacità differenziativa in presenza del glucagone 1, 10 e 100 nM rispetto agli adipociti non trattati (ADIPO), [figura 6I-L].

Abbiamo confermato la riduzione del differenziamento adipogenico in presenza di glucagone mediante l'analisi quantitativa del saggio AdipoRed: dall'istogramma [figura 6M] si osserva un effetto inibitorio del glucagone sull'adipogenesi statisticamente significativo a tutte e tre le dosi.



**Figura 6. Effetti del glucagone sull'adipogenesi indotta in vitro.**

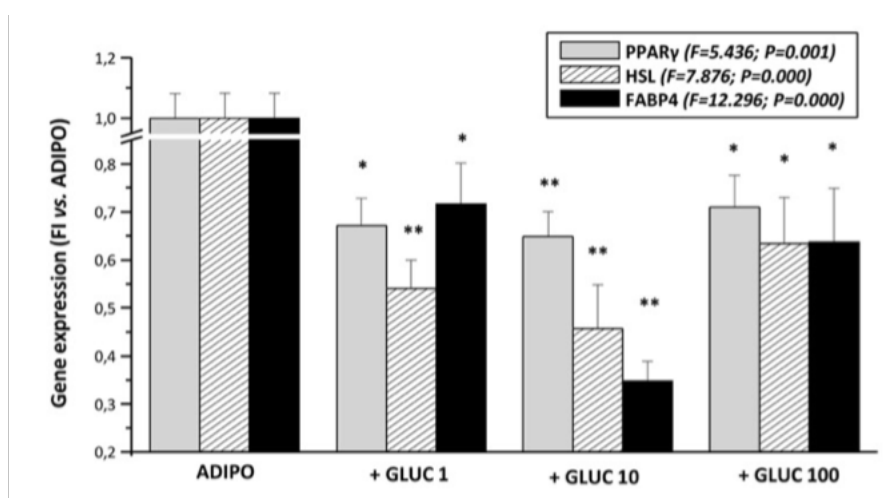
**A-H:** Microscopia ad epifluorescenza di adipociti differenziati in vitro in assenza (ADIPO) o in presenza di glucagone alle dosi 1-10-100 nM e marcati con AdipoRed. Immagini rappresentative ottenute a due diversi ingrandimenti: 20X e 40X. La fluorescenza verde corrisponde alla colorazione AdipoRed mentre la colorazione blu corrisponde alla marcatura nucleare con DAPI.

**I-L:** Microscopia ottica di adipociti differenziati in vitro in assenza (ADIPO) o in presenza di glucagone alle dosi 1-10-100 nM e colorati con Oil Red O. Immagini rappresentative ottenute all'ingrandimento 40X.

**M:** L'istogramma mostra le medie  $\pm$  SE del fold increase relativo alla fluorescenza emessa rispetto alle S-ASC marcate con AdipoRed.  $\S P < 0.000$  vs ASC. \* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.000$  vs ADIPO.

Per confermare l'effetto inibitorio del glucagone sull'adipogenesi indotta *in vitro*, abbiamo condotto un'analisi *real time* quantitativa (qRT-PCR) Taqman sulle S-ASC differenziate in vitro in presenza o assenza (ADIPO) di glucagone (dosi 1-10-100 nM) andando a valutare l'espressione genica di *markers* specifici del differenziamento adipocitario, PPAR $\gamma$ , FABP4 e HSL [figura 7]. Dagli istogrammi si osserva che i trattamenti con glucagone determinano una riduzione dell'espressione genica di PPAR $\gamma$ , FABP4 e HSL, statisticamente significativa con tutte e tre le dosi di glucagone (% di

inibizione vs ADIPO: 33, 35, 29% per PPAR $\gamma$ ; 28, 66 e 37% per FABP4; 46, 54 e 37% per HSL alle dosi rispettivamente di 1-10-100).



**Figura 7. Espressione genica di marker adipocitari.** Analisi qRT-PCR Taqman dell'espressione genica di PPAR $\gamma$ , FABP4 e HSL in adipociti differenziati in vitro in assenza (ADIPO) o in presenza di glucagone (dosi 1-10-100 nM). L'istogramma mostra le medie  $\pm$  SE del fold increase dell'espressione genica vs ADIPO, normalizzata sull'espressione di GAPDH come housekeeping gene. \* $P<0.05$ , \*\* $P<0.001$  vs ADIPO.

### 4.3 Espressione del GLP-1R e del GCGR nelle S-ASC

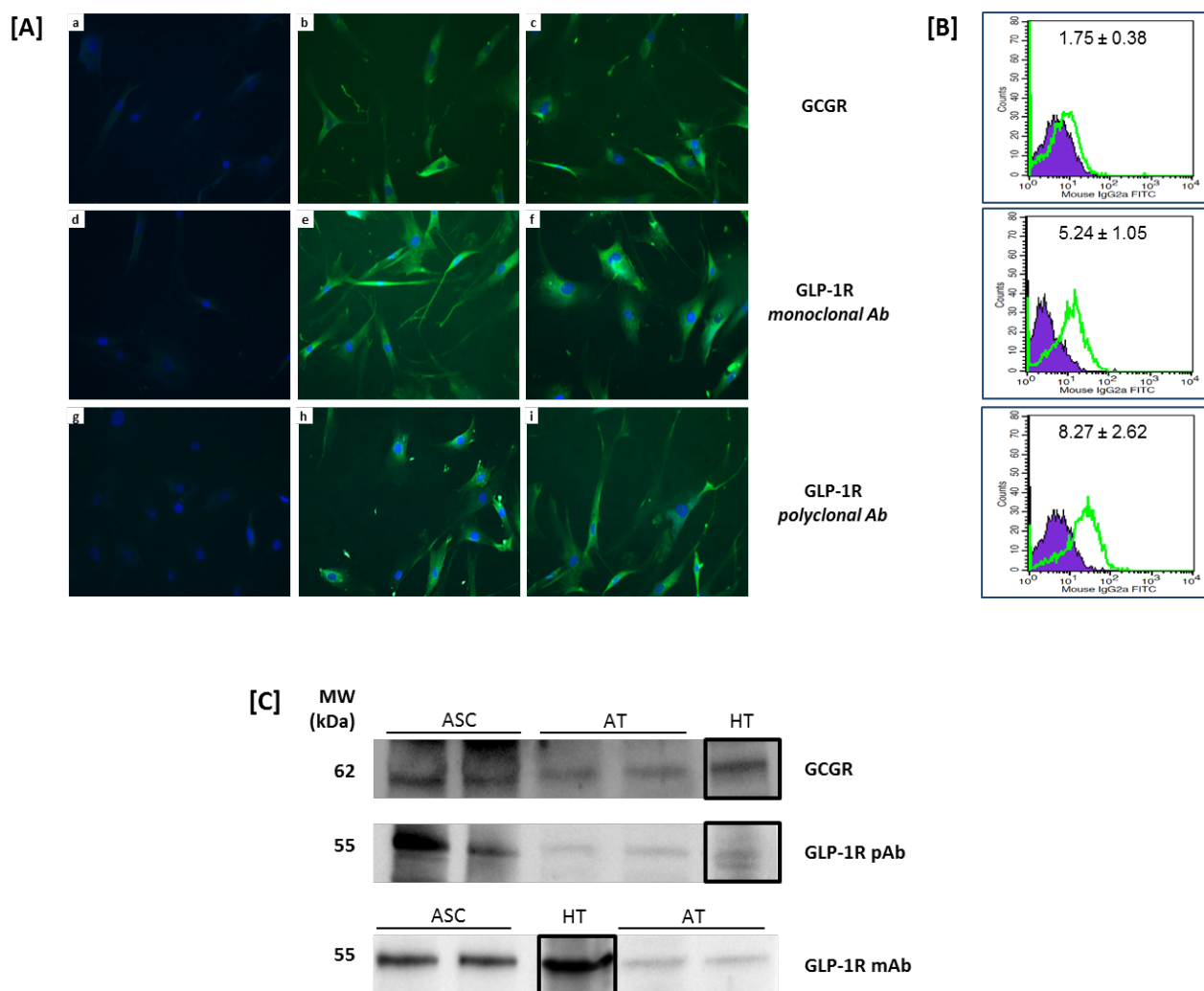
In studi preclinici precedenti, il nostro laboratorio ha dimostrato che il liraglutide, farmaco agonista del recettore del GLP-1, interferisce con la capacità proliferativa e differenziativa dei precursori adiposi umani e che tali effetti sembrano essere mediati solo in parte dalla via di segnalazione classica del GLP-1R (Cantini *et al.* 2015). Tuttavia, in letteratura, l'espressione del GLP-1R nel tessuto adiposo e nei precursori adipocitari resta ancora dibattuta. Per questo motivo, abbiamo valutato l'espressione del recettore del GLP-1 e del glucagone nelle S-ASC mediante tecniche diverse e confrontando diversi anticorpi monoclonali e policlonali.

In primo luogo, abbiamo dimostrato l'espressione proteica di entrambi i recettori sulla superficie cellulare delle S-ASC tramite analisi immunocitochimica in fluorescenza. Le immagini ottenute al microscopio ad epifluorescenza mostrano l'espressione nelle S-ASC del GCGR e del GLP-1R (in questo caso abbiamo utilizzato due diversi anticorpi primari, rispettivamente monoclonale e policlonale) rispetto ai controlli negativi [figura 8A].

Questo dato è stato confermato mediante analisi citofluorimetrica (FACScan) delle S-ASC marcate con gli stessi anticorpi primari anti-GCGR e anti-GLP-1R (monoclonale e policlonale) [figura 8B].

Infine, è stata dimostrata l'espressione proteica del GCGR e del GLP-1R, sia nelle S-ASC che a livello

del tessuto adiposo, (AT) mediante analisi Western Blot. L'espressione di entrambi i recettori è stata valutata in lisati proteici (30  $\mu$ g) di S-ASC e di tessuto adiposo sottocutaneo provenienti da pazienti diversi, utilizzando come controllo positivo tessuto cardiaco (*heart samples*, HT) [figura 8C].



**Figura 8. Espressione del recettore del glucagone (GCGR) e del recettore del GLP-1 (GLP-1R) nelle S-ASC.**

**A:** Immagini rappresentative dell'analisi in immunocitochimica di S-ASC incubate con anticorpo primario anti-GCGR (b-c), anticorpo primario monoclonale anti-GLP-1R (e-f) e anticorpo primario policlonale anti-GLP-1R (h-i). La positività del segnale (fluorescenza verde) è presente nelle S-ASC marcate con gli anticorpi primari e completamente assente nei controlli negativi (a-d-g). Il segnale blu corrisponde alla contro-colorazione nucleare con DAPI. Ingrandimento 20X.

**B:** L'immagine mostra i plots rappresentativi ottenuti mediante citofluorimetria a flusso (FACScan) dell'espressione sulla superficie cellulare nella popolazione di S-ASC del GCGR e del GLP-1R (curva verde) rispetto ai controlli negativi. I valori riportati indicano la media  $\pm$  SD delle cellule positive.

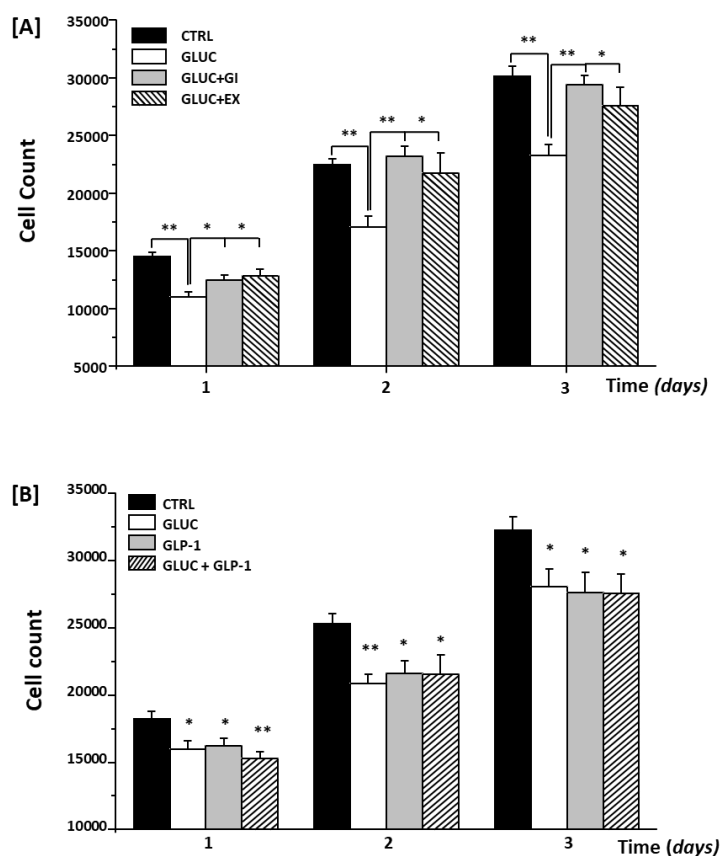
**C:** Western blot rappresentativo dell'espressione del GCGR e del GLP-1R in lisati proteici di S-ASC provenienti da diversi pazienti, utilizzando come controllo positivo due diversi lisati di tessuto adiposo sottocutaneo (adipose tissue, AT) e uno di tessuto cardiaco (*heart samples*, HS).



#### 4.4 Interazione tra il GCGR e GLP-1R nel mediare gli effetti esercitati dal glucagone

Abbiamo precedentemente dimostrato che gli effetti degli agonisti del recettore del GLP-1, come liraglutide, e del GLP-1(7-36) su precursori adiposi umani vengono revertiti in presenza dell'antagonista specifico del GLP-1R, l'exendin(9-39) (Cantini *et al.* 2015, 2017). Inoltre, effetti inibitori simili a quelli esercitati dal liraglutide, sono stati osservati con la forma clivata del GLP-1, il GLP-1(9-36), che presenta una ridotta affinità per il recettore classico dell'ormone. Pertanto, con lo scopo di definire i meccanismi molecolari coinvolti nell'azione del glucagone e del GLP-1 sui precursori adiposi umani e di chiarire il ruolo di entrambi i recettori che mediano tali effetti simili, abbiamo utilizzato l'antagonista specifico del recettore del glucagone, des- His1- [Glu9]-glucagon(1-29) (GI, *glucagon inhibitor*), e in parallelo, l'antagonista del recettore del GLP-1, exendin 9-39 (EX). Al fine di valutare gli effetti sulla capacità proliferativa, le S-ASC sono state trattate con glucagone alla dose 10 nM da solo o in combinazione con GI (10 nM) o EX (10 nM) per tempi diversi (1-2-3 giorni). I risultati ottenuti dagli esperimenti di conta cellulare diretta hanno dimostrato che l'effetto inibitorio del glucagone sulla proliferazione delle S-ASC è significativamente revertito, non solo dall'antagonista specifico del GCGR (86, 103, 97% per 1, 2 e 3 giorni, rispettivamente), ma anche dall'antagonista selettivo del GLP-1R (88, 96, 91% per 1, 2 e 3 giorni, rispettivamente) [figura 9A].

Inoltre, il coinvolgimento di entrambi i recettori nel mediare l'effetto anti-proliferativo del glucagone sulle S-ASC è supportato dall'assenza di un effetto sinergico tra glucagone e GLP-1 quando entrambe le molecole vengono aggiunte alle cellule a dose equimolare 10 nM [figura 9B].

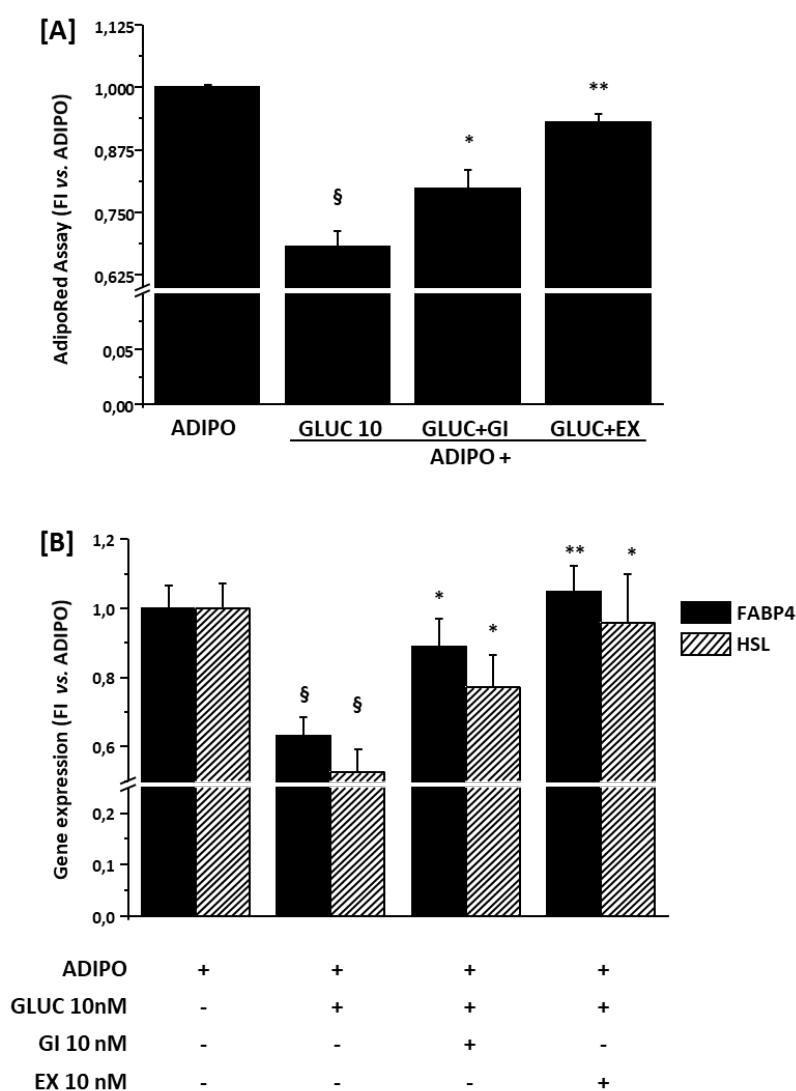


**Figura 9. Coinvolgimento del GCGR e GLP-1R nell'effetto anti-proliferativo del glucagone sui precursori adiposi umani.** **A:** Le cellule piastrate in multiwells da 12 pozzetti sono state trattate o no (CTRL) con glucagone (10 nM), da solo o in combinazione con l'antagonista del GCGR (GI) o con l'antagonista del GLP-1R (EX) a dosi equimolari (10 nM) per 1, 2 e 3 giorni. Ogni giorno le cellule vive sono state tripsinizzate e contate con camera di Burker. L'istogramma rappresenta la media  $\pm$  SE del numero di cellule contate.

**B:** Le cellule piastrate in multiwells da 12 pozzetti sono state trattate o no (CTRL) con glucagone (10 nM), da solo o in combinazione con GLP-1 a concentrazione equimolare (10 nM) per 1, 2 e 3 giorni. Ogni giorno le cellule vive sono state tripsinizzate e contate con camera di Burker. L'istogramma rappresenta la media  $\pm$  SE del numero di cellule contate. \* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$  vs Ctrl.

Analogamente, abbiamo utilizzato entrambi gli antagonisti per valutare gli effetti sulla capacità differenziativa della cellula precursore verso l'adipocita bianco maturato *in vitro*. Le S-ASC sono state trattate con opportuno mezzo di induzione adipogenica in presenza di glucagone (dose 10 nM) da solo o combinazione con l'antagonista del GCGR (10 nM) o dell'antagonista del GLP-1R (10 nM) per circa due settimane. Al termine del periodo di differenziazione, le cellule sono state marcate con il colorante fluorescente AdipoRed (che evidenzia in modo specifico i depositi intracellulari di trigliceridi) e, dall'analisi quantitativa del saggio, con entrambi gli antagonisti si osserva una significativa reversione degli effetti inibitori del glucagone sull'adipogenesi *in vitro* [figura 10A].

Anche in questo caso abbiamo valutato l'espressione genica dei *markers* adiposi FABP4 e HSL mediante analisi *real time* quantitativa Taqman. Le S-ASC sono state trattate per tutto il periodo di induzione con glucagone (10 nM) in combinazione con GI o EX a dose equimolare 10 nM. I risultati ottenuti confermano quanto visto precedentemente, in presenza degli antagonisti si osserva una reversione dell'effetto inibitorio del glucagone sull'espressione genica di FABP4 e HSL [figura 10B].



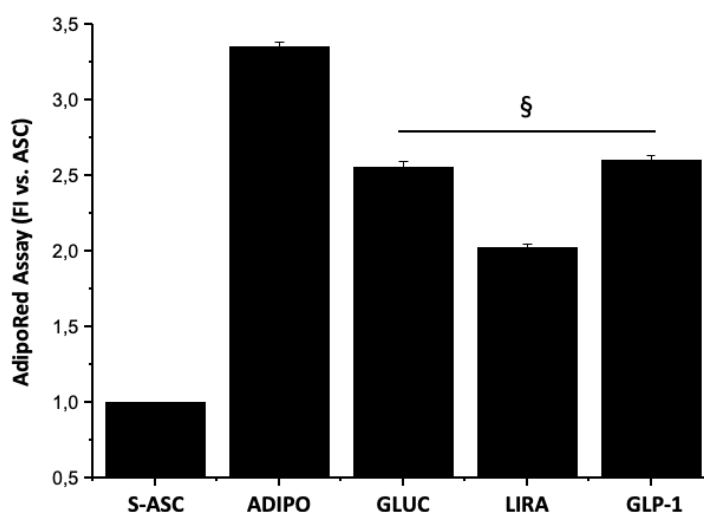
**Figura 10. Coinvolgimento del GPCR e GLP-1R nell'effetto inibitorio del glucagone sull'adipogenesi indotta in vitro.** Le S-ASC sono state differenziate in vitro in assenza (ADIPO) o in presenza di glucagone (GLUC) alla concentrazione 10 nM in combinazione con dosi equimolari (10 nM) dell'antagonista del GPCR (GI) o dell'antagonista del GLP1-R (EX).

**A:** Analisi quantitativa del saggio AdipoRed che marca i depositi di trigliceridi intracellulari. L'istogramma mostra le medie  $\pm$  SE del fold increase relativo alla fluorescenza emessa rispetto alle ADIPO.  $\$P < 0.001$  vs ADIPO,  $*P < 0.05$ ,  $**P < 0.001$  vs GLUC 10 nM.

**B:** Analisi qRT-PCR Taqman dell'espressione genica di FABP4 e HSL in adipociti differenziati in vitro in assenza (ADIPO) o in presenza di glucagone (10nM) in combinazione con GI o EX (10 nM). L'istogramma mostra le medie  $\pm$  SE del fold increase dell'espressione genica vs ADIPO normalizzata sull'espressione di GAPDH come housekeeping gene.  $\$P < 0.001$  vs ADIPO,  $*P < 0.05$ ,  $**P < 0.001$  vs GLUC.

#### 4.5 Effetto inibitorio di glucagone, liraglutide e GLP-1 nativo sul differenziamento *in vitro* delle S-ASC

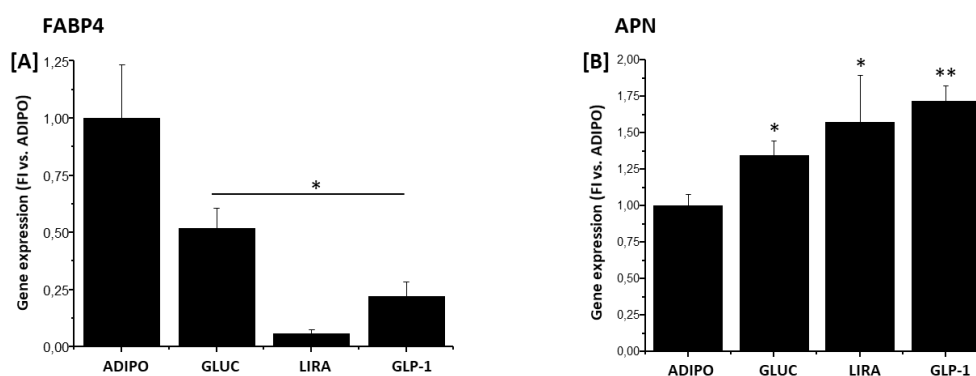
Come già dimostrato, glucagone, liraglutide e GLP-1(7-36) hanno un'azione inibitoria sul differenziamento *in vitro* delle S-ASC e abbiamo confrontato l'effetto delle tre molecole con il saggio quantitativo AdipoRed, misurando la fluorescenza emessa allo spettrofluorimetro. Per gli esperimenti di induzione adipogenica *in vitro*, le cellule sono state piastrate in *multiwells* da 6 pozzetti e, raggiunta la confluenza, il terreno di coltura completo è stato sostituito con il mezzo di induzione adipogenica (0,5 mM IBMX, 1 $\mu$ M desametasone, 1  $\mu$ M rosiglitazone e 10  $\mu$ M di insulina) in assenza (controllo negativo) o presenza di glucagone, liraglutide e GLP-1(7-36) alla dose equimolare di 10 nM per due settimane. Dall'istogramma ottenuto viene confermato l'effetto inibitorio sull'adipogenesi nelle cellule trattate del glucagone, liraglutide e GLP-1(7-36) alle dosi 10 nM, statisticamente significativo per tutte e tre le molecole (% inibizione: 24, 40 e 23% per GLUC, LIRA e GLP-1, rispettivamente) [figura 11].



**Figura 11. Effetto inibitorio di glucagone, liraglutide e GLP-1(7-36) sull'adipogenesi indotta *in vitro*.** Le S-ASC sono state differenziate *in vitro* in assenza (ADIPO) o in presenza di glucagone (GLUC), liraglutide (LIRA) e GLP-1 nativo alla concentrazione 10 nM. Analisi quantitativa del saggio AdipoRed che marca i depositi intracellulari di trigliceridi. L'istogramma mostra le medie  $\pm$  SE del fold increase relativo alla fluorescenza emessa rispetto alle ASCs. § $P$ <0.001 vs ADIPO.

Per confermare l'effetto inibitorio sul differenziamento adipogenico bianco da parte di queste tre molecole, abbiamo eseguito un'analisi *real time* PCR quantitativa TaqMan sulle S-ASC differenziate *in vitro* in assenza (ADIPO) o in presenza di glucagone, liraglutide e GLP-1(7-36) alle dosi equimolari di 10 nM, andando a valutare l'espressione di due geni chiave del differenziamento adipocitario bianco, FABP4 e adiponectina (APN). FABP4 è una proteina coinvolta nel trasporto lipidico intracellulare che lega con elevata specificità gli acidi grassi esterificati accumulati all'interno della cellula adiposa differenziata (Koppen & Kalkhoven 2010), rappresentando quindi un marcatore dell'accumulo lipidico. A conferma di quanto visto in precedenza, è stata riscontrata una ridotta espressione del marcatore adipocitario FABP4 nelle cellule trattate con glucagone, liraglutide e GLP-1(7-36) rispetto alle ADIPO non trattate, suggerendo quindi un ridotto accumulo di lipidi. Come è osservabile nell'istogramma, gli effetti maggiori sono stati ottenuti nel trattamento con liraglutide (10 nM) [figura 12A].

A differenza di quanto accade per il FABP4, i livelli di espressione genica dell'adiponectina (APN), un *marker* indicatore di buona funzionalità adipocitaria, risultano invece aumentati in corrispondenza delle cellule trattate con le tre molecole [figura 12B]. Questi dati suggeriscono che glucagone, liraglutide e GLP-1(7-36) non solo limitano il *rate* di differenziamento delle cellule adipose, ma sono anche in grado di migliorare qualitativamente i parametri funzionali delle cellule che sono riuscite a differenziarsi (Cantini *et al.* 2015).



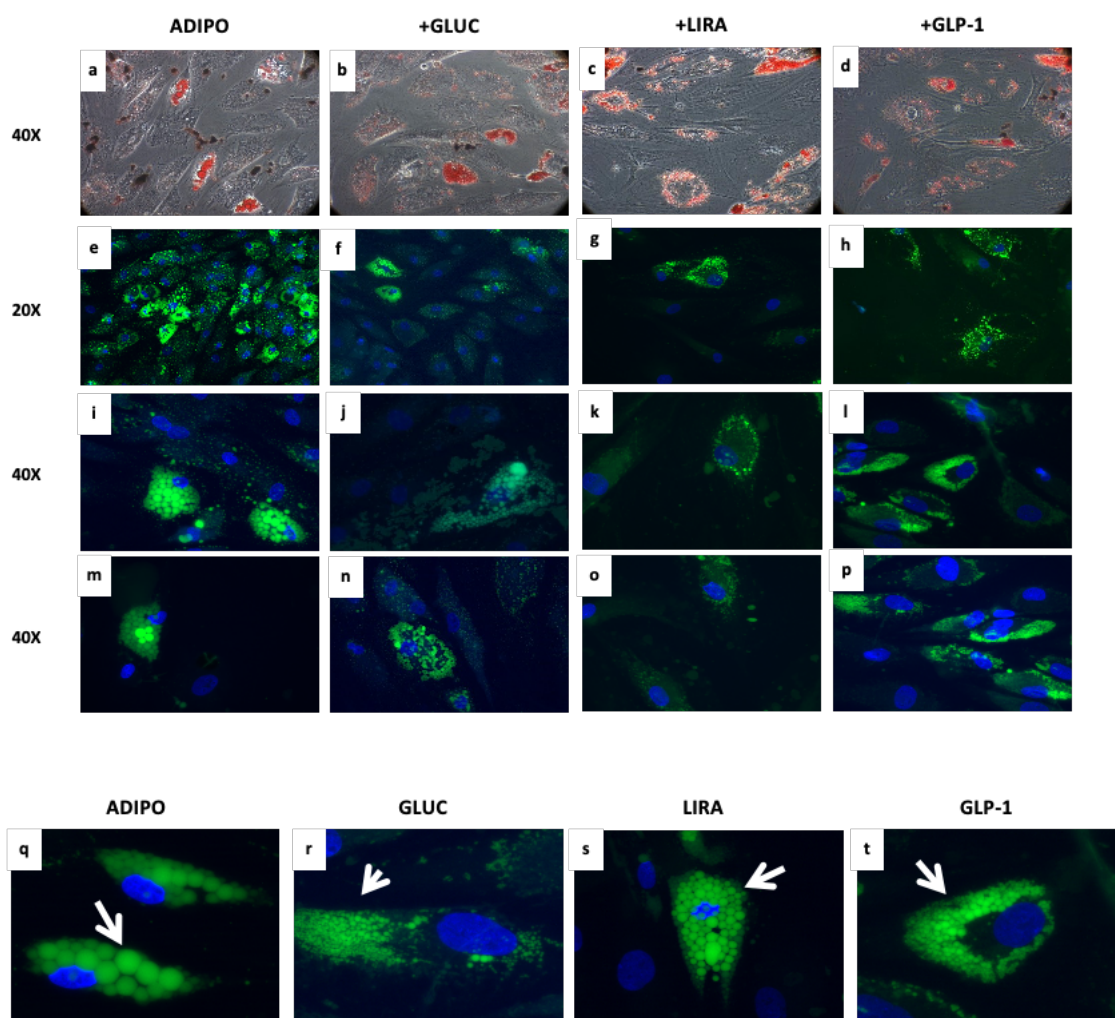
**Figura 12. Effetto di glucagone, liraglutide e GLP-1 (7-36) sull'espressione genica dei marcatori del differenziamento adipocitario bianco.** Le S-ASC sono state differenziate *in vitro* in assenza (ADIPO) o in presenza di glucagone (GLUC), liraglutide (LIRA) e GLP-1 nativo alla concentrazione 10 nM.

**A:** Analisi qRT-PCR TaqMan dell'espressione genica di FABP4. L'istogramma mostra le medie  $\pm$  SE del fold increase dell'espressione genica vs ADIPO normalizzata sull'espressione di GAPDH come housekeeping gene. \* $P < 0.05$  vs ADIPO.

**B:** Analisi qRT-PCR Taqman dell'espressione genica di adiponectina (APN). L'istogramma mostra le medie  $\pm$  SE del fold increase dell'espressione genica vs ADIPO normalizzata sull'espressione di GAPDH come housekeeping gene. \* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.001$  vs ADIPO.

Abbiamo quindi condotto un'analisi morfologica degli adipociti differenziati *in vitro* in assenza (ADIPO) e in presenza di glucagone, liraglutide e GLP-1(7-36), ciascuno alla dose 10 nM. Al termine del periodo di differenziamento le cellule sono state colorate con il colorante Oil Red O, che lega in modo specifico i lipidi neutri intracellulari, e visualizzate al microscopio ottico: come si può osservare dalle immagini [figura 13 pannelli a-d], la colorazione rossa lega e mette in evidenza in modo specifico le gocce di grasso intracellulari formatesi nelle cellule indotte, caratterizzate dal tipico aspetto multivacuolare dell'adipocita maturato *in vitro*, a differenza del differenziamento *in vivo* che genera una cellula con una sola grossa goccia lipidica centrale. Attraverso questa analisi qualitativa, è apprezzabile l'effetto inibitorio sul differenziamento e sulla capacità di accumulo di trigliceridi negli adipociti trattati con glucagone, liraglutide e GLP- 1(7-36) rispetto agli adipociti non trattati (ADIPO). Le gocce lipidiche delle cellule trattate con le tre molecole, marcate in rosso dal colorante, appaiono inoltre meno voluminose e di minori dimensioni, con una morfologia che potrebbe suggerire la struttura tipica dell'adipocita bruno, meno propenso rispetto al bianco all'accumulo di trigliceridi (Frontini & Cinti 2010).

La stessa tipologia di analisi è stata condotta anche dopo colorazione con il reagente AdipoRed: al termine del periodo di differenziazione, gli adipociti sono stati marcati con il colorante fluorescente AdipoRed, che evidenzia in modo specifico i depositi intracellulari di trigliceridi, e visualizzati mediante microscopia ad epifluorescenza. Anche questa metodica conferma un effetto inibitorio sulla capacità differenziativa delle S- ASC e sull'accumulo intracitoplasmatico di lipidi dell'adipocita [figura 13 pannelli e-t]. Come si può osservare dagli ingrandimenti, gli adipociti differenziati in presenza di glucagone, liraglutide e GLP-1 (7-36) presentano delle gocce lipidiche di dimensioni ridotte rispetto all'adipocita (ADIPO) non trattato, a suggerire una morfologia di tipo *brown*.



**Figura 13. Analisi morfologica degli adipociti differenziati in vitro in presenza di glucagone, liraglutide e GLP-1.**

**Pannelli a-d:** Microscopia ottica di adipociti differenziati in vitro in assenza (ADIPO) o in presenza di glucagone, liraglutide e GLP-1 (7-36) alla dose 10 nM e colorati con Oil Red O. Immagini rappresentative ottenute all'ingrandimento 40X.

**Pannelli e-t:** Microscopia ad epifluorescenza di adipociti differenziati in vitro in assenza (ADIPO) o in presenza di glucagone, liraglutide e GLP-1 (7-36) alla dose 10 nM. Il colorante fluorescente AdipoRed marca i vacuoli lipidici in verde, la colorazione fluorescente DAPI marca i nuclei in blu. Immagini rappresentative ottenute a due diversi ingrandimenti: 20X (pannelli e-h) e 40X (pannelli i-p). Nei pannelli q-t, zoom digitale 3X in ingrandimento 40X dei vacuoli lipidici nelle cellule trattate e non trattate dalle tre molecole.

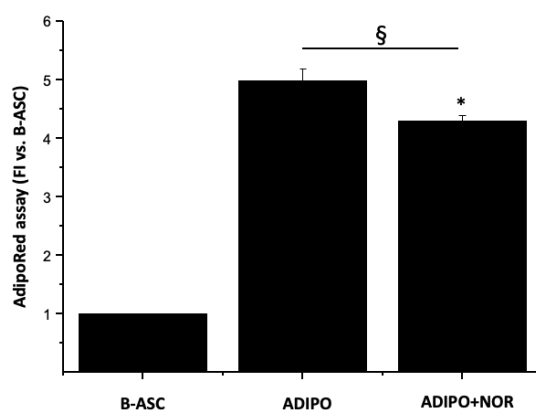
#### 4.6 Differenziamento adipogenico bruno di B-ASC

Nel nostro laboratorio sono state caratterizzate popolazioni di cellule B-ASC, precursori staminali delle cellule adipose di tipo *brite* isolate da depositi di grasso bianco viscerale intorno alle lesioni tumorali di tipo feocromocitoma, tumore della componente midollare della ghiandola surrenale (Di Franco *et al.* 2014). Come descritto in precedenza, la stimolazione del sistema nervoso simpatico dovuta agli alti livelli di catecolamine prodotte dalle cellule tumorali, è in grado di indurre *in vivo* il differenziamento *brown* a partire dai precursori staminali tramite l'attivazione dei recettori  $\beta_3$  adrenergici (Giacobino 1995, Lafontan & Berlan 1993). Questo processo, quindi, sarebbe alla base dello sviluppo di foci di tessuto bruno intorno al feocromocitoma, per stimolazione da parte degli elevati livelli di catecolamine prodotti dal tumore dei precursori *brite* dispersi nel tessuto adiposo bianco che circonda il tumore (Di Franco *et al.* 2014).

Questo modello di precursori isolati dal grasso intorno a surreni affette da feocromocitoma, arricchito in cellule *brite* è stato utilizzato come controllo positivo del processo di *browning* verso cui studiare gli effetti di glucagone, liraglutide e GLP-1 nativo. In questa popolazione arricchita di precursori bruni, siamo andati a valutare la capacità di differenziamento adipogenico delle B-ASC in termini di accumulo citoplasmatico di gocce lipidiche tramite saggio quantitativo AdipoRed. A tale scopo, abbiamo stimolato l'adipogenesi *in vitro*: le cellule sono state piastrate in *multiwells* da 6 pozzetti e, raggiunta la confluenza, il terreno di coltura completo è stato sostituito con il *cocktail* di induzione adipogenica bianco ADIPO (0,5 mM IBMX, 1 $\mu$ M desametasone, 1  $\mu$ M rosiglitazone e 10  $\mu$ M di insulina) e con lo stesso *cocktail* complementato con noradrenalina alla dose 10  $\mu$ M (ADIPO+NOR), attendendoci che quest'ultima condizione stimolasse più selettivamente il differenziamento verso un fenotipo *brown*.

Come le S-ASC, anche le B-ASC sono in grado di differenziare verso fenotipo adipocitario, accumulando depositi di trigliceridi intracellulari a seguito di induzione: dall'istogramma [figura 14], in particolare, è riscontrabile un effetto maggiore nelle cellule indotte con il mezzo senza noradrenalina.

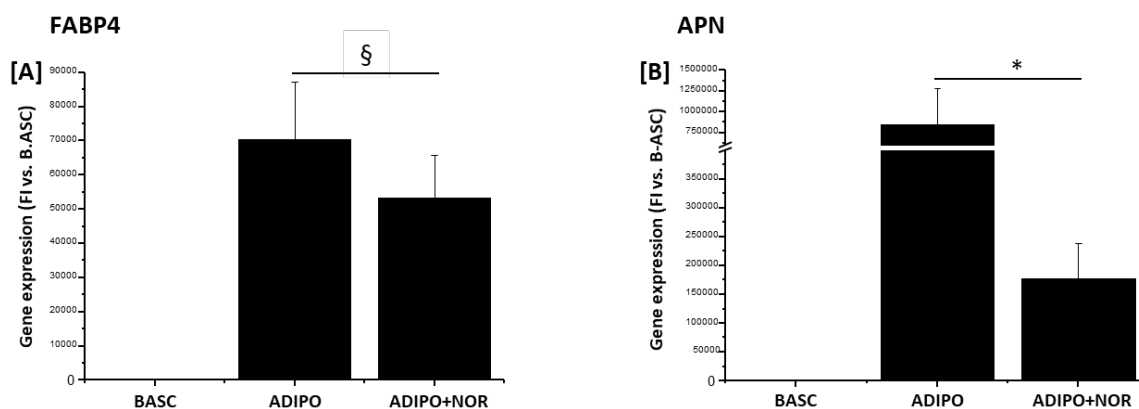




**Figura 14. Capacità delle B-ASC di differenziare in vitro.** Le cellule sono state stimolate con il classico mezzo di induzione (ADIPO) e con il mezzo complementato con noradrenalina alla dose 10  $\mu$ M (ADIPO+NOR) e successivamente marcate con il colorante AdipoRed. L'istogramma mostra le medie  $\pm$  SE del fold increase relativo alla fluorescenza emessa rispetto alle B-ASC. § $P$ <0.000 vs B-ASC, \* $P$ <0.05 vs ADIPO.

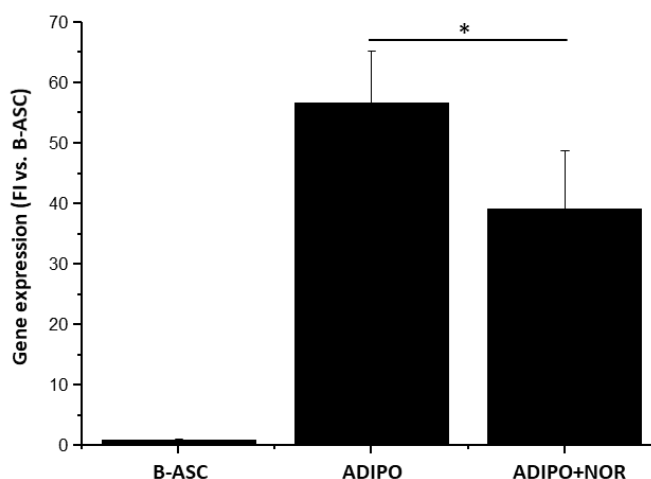
Ad avvenuto differenziamento, è stata valutata nelle cellule indifferenziate (B-ASC) e dopo induzione con i 2 mezzi (ADIPO e ADIPO+NOR), l'espressione genica di FABP4 e adiponectina (APN), mediante analisi *real time* PCR quantitativa TaqMan [figura 15A-B]. Come si può osservare dall'istogramma, l'analisi in TaqMan mostra un elevato livello di espressione del marcatore FABP4 nelle cellule indotte con entrambi i mezzi di induzione (ADIPO e ADIPO+NOR) e specialmente in quelle indotte con il semplice *cocktail* ADIPO, a dimostrazione del fatto che anche negli adipociti maturi *brown* si sono formati degli accumuli lipidici nelle cellule stimolate con ambedue i mezzi di induzione, rispetto alle B-ASC non indotte dove l'espressione di entrambi in geni era quasi indetectabile [figura 15A].

Per quanto riguarda l'adiponectina, *marker* specifico dell'adipocita maturo funzionale, abbiamo confermato l'elevata espressione in seguito a stimolazione con entrambi i cocktail rispetto alle B-ASC non indotte, anche se i livelli di espressione indotti dal cocktail contenente noradrenalina risultano sempre inferiori [figura 15B].



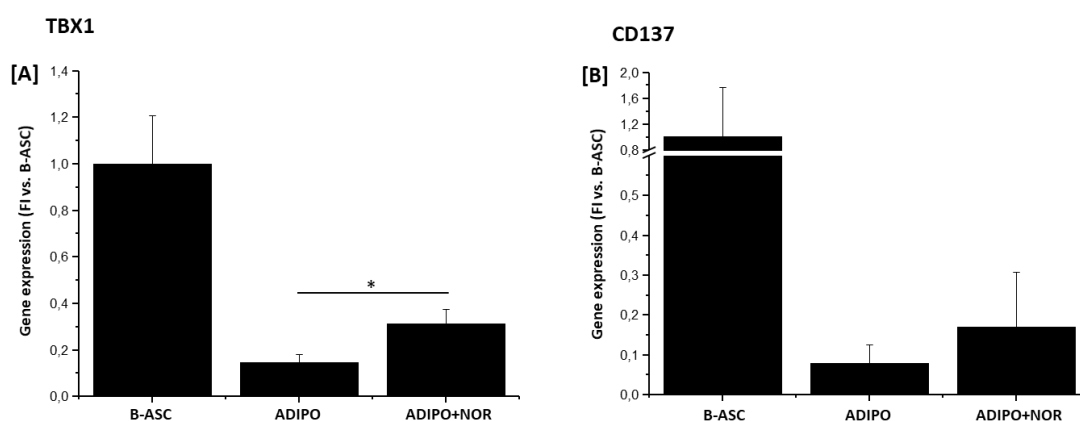
**Figura 15. Espressione genica di markers adipocitari bianchi nelle B-ASC.** Le cellule sono state differenziate in vitro con il classico mezzo di induzione (ADIPO) e con il mezzo complementato con noradrenalina alla dose 10  $\mu$ M (ADIPO+NOR). **A e B:** Analisi qRT-PCR TaqMan dell'espressione genica di FABP4 e APN. Gli istogrammi mostrano le medie  $\pm$  SE del fold increase dell'espressione genica vs B-ASC normalizzata sull'espressione di GAPDH come housekeeping gene. § $P < 0.000$ , \* $P < 0.05$  vs B-ASC.

Sempre mediante analisi Taqman, abbiamo valutato l'espressione del gene UCP-1, caratteristica del fenotipo adipocitario bruno ad attivazione tardiva. Dal grafico ottenuto [figura 16] possiamo osservare un netto differenziamento adipogenico delle cellule staminali B-ASC verso *lineage* adipocitario di tipo bruno con entrambi i mezzi differenziativi (ADIPO e ADIPO+NOR), in particolare in assenza di noradrenalina, come evidenziato dagli alti livelli di espressione di UCP-1 in modo statisticamente significativo rispetto alle cellule non indotte (B-ASC).



**Figura 16. Espressione genica del marker adipocitario bruno UCP-1 nelle B-ASC.** Le cellule sono state differenziate in vitro con il classico mezzo di induzione (ADIPO) e con il mezzo complementato con noradrenalina alla dose 10  $\mu$ M (ADIPO+NOR). Analisi qRT-PCR TaqMan dell'espressione genica di UCP-1. L'istogramma mostra le medie  $\pm$  SE del fold increase dell'espressione genica vs B-ASC normalizzata sull'espressione di GAPDH come housekeeping gene. \* $P < 0.05$  vs B-ASC.

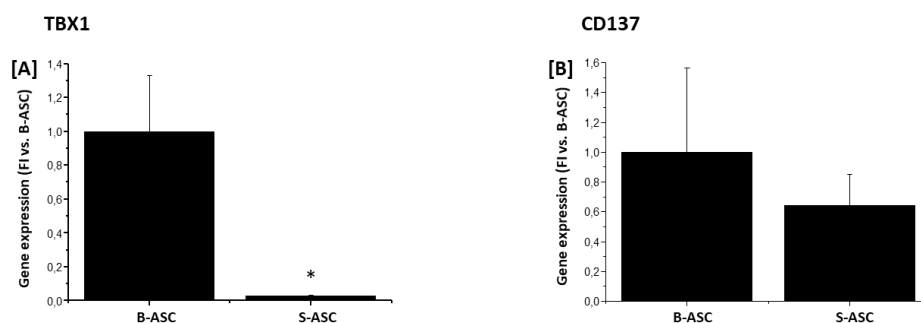
Infine, per confermare la natura *brite* e non classica del nostro controllo positivo abbiamo indagato mediante analisi TaqMan l'espressione dei marcatori staminali caratteristici del lineage *brite*, TBX1 e CD137 (Cawthorn *et al.* 2012), nelle B-ASC indifferenziate. Come si evince dagli istogrammi [figura 17A-B] il calo dei livelli di espressione dei 2 marcatori che si osserva durante il differenziamento conferma l'avvenuta maturazione, mentre i livelli maggiori osservati nella stimolazione del differenziamento quando presente la noradrenalina, confermano la natura *brite* inducibile di questa popolazione cellulare.



**Figura 17. Espressione genica di markers adipocitari *brite* nelle B-ASC.** Le cellule sono state differenziate *in vitro* con il classico mezzo di induzione (ADIPO) e con il mezzo complementato con noradrenalina alla dose 10  $\mu$ M (ADIPO+NOR). **A e B:** Analisi qRT-PCR TaqMan dell'espressione genica di TBX1 e CD137. Gli istogrammi mostrano le medie  $\pm$  SE del fold increase dell'espressione genica vs B-ASC normalizzata sull'espressione di GAPDH come housekeeping gene. \* $P < 0.05$  vs B-ASC.

#### 4.7 Espressione di marcatori *brite* nelle S-ASC e B-ASC a confronto

Abbiamo condotto un'ultima analisi TaqMan per studiare l'espressione dei marcatori staminali piú specifici del lineage *brite* TBX1 e CD137 nelle S-ASC di natura bianca a confronto le B-ASC, già precedentemente risultate positive per l'espressione di questo pannello di marcatori. Come si può osservare dagli istogrammi [figura 18A-B], le popolazioni S-ASC, dove non è presente il lineage B-ASC, mostrano livelli ridotti di espressione dei due marcatori *brite*, rispetto all'espressione nelle B-ASC, che risultano infatti arricchite di progenitori bruni. In particolare, la differenza risulta statisticamente significativa per il TBX1, e solo un *trend* per l'altro marcatore CD137.



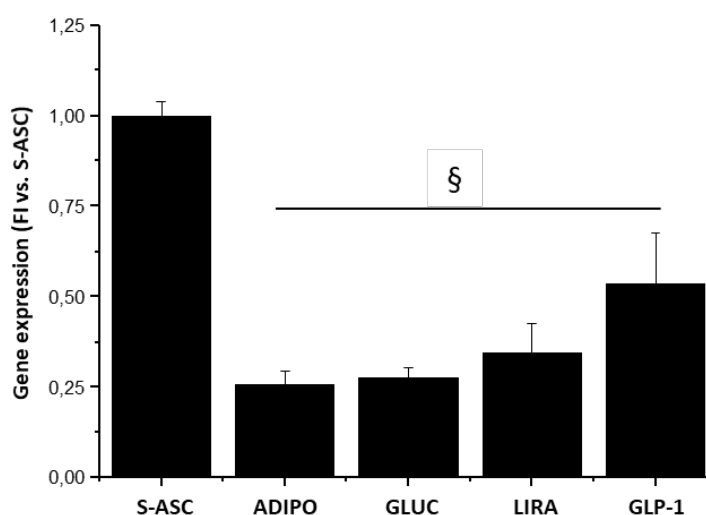
**Figura 18. Espressione genica di markers adipocitari del lineage brite nelle B-ASC.** Le cellule sono state differenziate *in vitro* con il classico mezzo di induzione (ADIPO) e con il mezzo complementato con noradrenalina alla dose 10  $\mu$ M (ADIPO+NOR). **A e B:** Analisi qRT-PCR TaqMan dell'espressione genica di TBX1 e CD137. Gli istogrammi mostrano le medie  $\pm$  SE del fold increase dell'espressione genica vs B-ASC normalizzata sull'espressione di GAPDH come housekeeping gene. \* $P < 0.05$  vs B-ASC.

#### 4.8 Valutazione del processo di browning nelle S-ASC differenziate in presenza di glucagone, liraglutide e GLP-1

Il fenomeno di *browning* sta ad indicare la comparsa atipica di adipociti bruni maturi all'interno di depositi di tessuto adiposo bianco: questa categoria di adipociti, per essere distinta da quella degli adipociti bruni classici, è stata denominata *brite*. A differenza delle cellule adipose brune classiche, gli adipociti *brite* risultano essere negativi per il fattore miogenico 5 (Myf-5-), caratteristico del lineage adiposo bruno classico, ma positivi per il marcatore tipico del fenotipo adipocitario bruno maturo UCP-1, a comune con gli adipociti bruni classici e quelli di tipo *brite* (Giralt & Villaroya 2013, Wu *et al.* 2012). Una delle ipotesi che sostengono questo fenomeno, riconduce la comparsa di cellule *brite* ad un'adipogenesi *de novo*, a partire da progenitori bruni residenti all'interno dei depositi di grasso bianco (Wang *et al.* 2013). Nonostante ci sia ancora poca chiarezza sulla dinamica di questo processo, sia per quanto riguarda i meccanismi molecolari che ne stanno alla base sia per quanto riguarda i fattori coinvolti, è oggi appurato che si tratta di un processo che può essere indotto da fattori endogeni di varia natura.

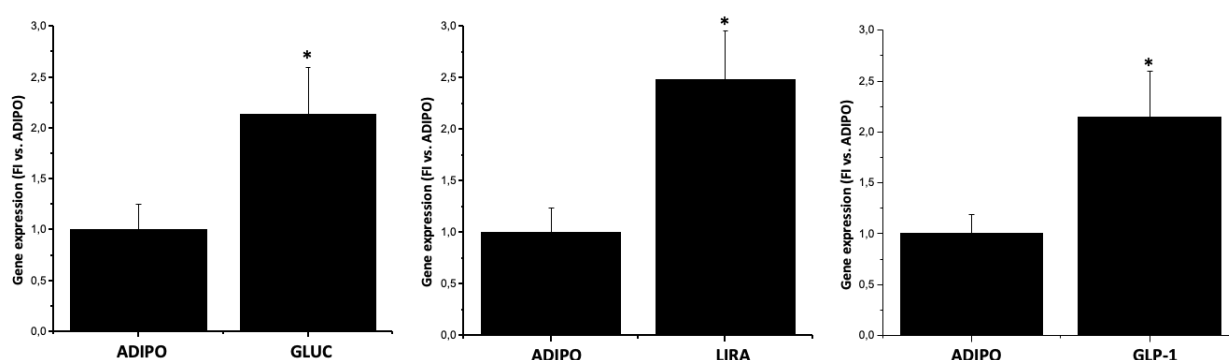
Allo scopo di indagare l'effetto delle tre molecole oggetto del nostro studio sul processo di *browning*, che abbiamo visto essere inducibile *in vitro* in una popolazione arricchita di cellule B-ASC (vedi sopra) abbiamo valutato mediante analisi *real time* PCR quantitativa TaqMan l'espressione del marcatore preadipocitario bruno PRDM16 in un modello di S-ASC stimulate a differenziare *in vitro* verso adipocita in presenza di glucagone, liraglutide e GLP-1(7-36) alla dose

equimolare 10 nM. I risultati ottenuti dimostrano come l'espressione di PRDM16 risulti diminuita significativamente nel corso di differenziamento, indipendentemente dalla presenza delle tre diverse molecole rispetto alle S-ASC indifferenziate, dove invece il *marker* preadipocitario risulta essere espresso [figura 19].



**Figura 19. Espressione genica di PRDM16 nei precursori adiposi.** Le S-ASC sono state differenziate in vitro in assenza (ADIPO) o in presenza di glucagone (GLUC), liraglutide (LIRA) e GLP-1 nativo alla concentrazione 10 nM. Analisi qRT-PCR TaqMan dell'espressione genica di PRDM16. L'istogramma mostra le medie  $\pm$  SE del fold increase dell'espressione genica vs S-ASC normalizzata sull'espressione di GAPDH come housekeeping gene. \* $P < 0.05$  vs ADIPO. § $P < 0.000$  vs S-ASC.

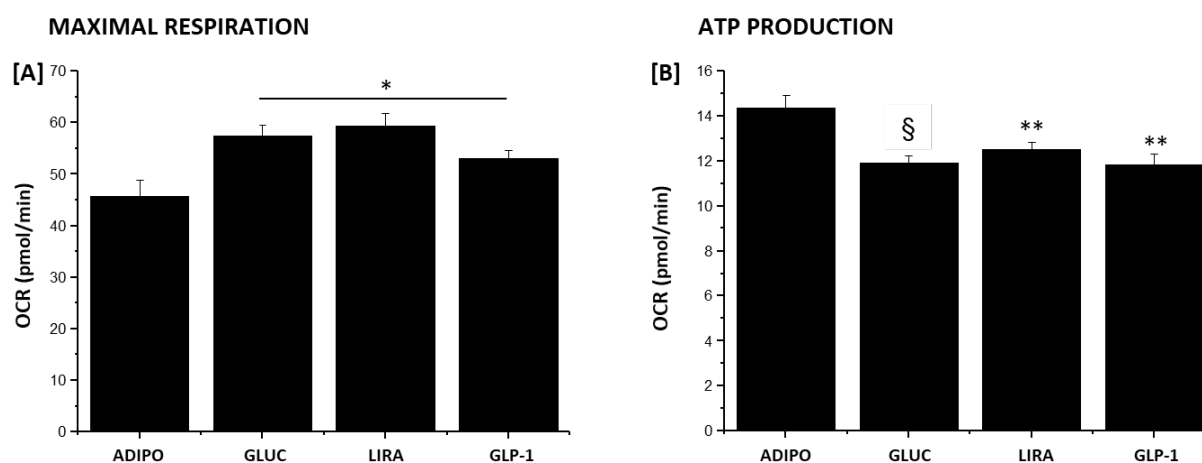
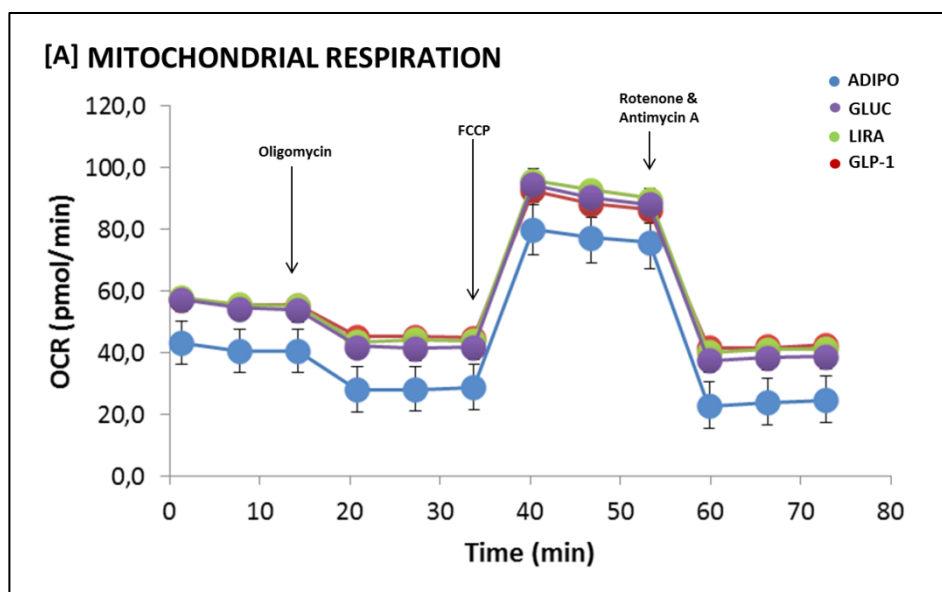
Per quanto riguarda l'espressione di UCP-1, che caratterizza l'adipocita maturo bruno, l'istogramma [figura 20] mostra come i livelli di espressione genica siano superiori in maniera statisticamente significativa nelle cellule in cui il differenziamento sia stato condotto in presenza delle tre molecole, in particolare di liraglutide. Questi dati suggeriscono che glucagone, liraglutide e GLP-1(7-36) alla dose 10 nM siano in grado di indurre uno *shift* verso fenotipo *brown* nelle cellule S-ASC che stanno differenziando, in favore dunque di una stimolazione del meccanismo di *browning*, con effetti variabili da parte delle tre molecole.



**Figura 20. Espressione genica di UCP-1 nelle S-ASC differenziate.** Le S-ASC sono state indotte *in vitro* in assenza (ADIPO) o in presenza di glucagone (GLUC), liraglutide (LIRA) e GLP-1 nativo alla concentrazione 10 nM. Analisi qRT-PCR TaqMan dell'espressione genica di UCP1. L'istogramma mostra le medie  $\pm$  SE del fold increase dell'espressione genica vs ADIPO normalizzata sull'espressione di GAPDH come housekeeping gene. Glucagone: 2.06 FI, Liraglutide: 2.47 FI, GLP1: 2.1 FI \* $P < 0.05$  vs ADIPO.

#### 4.9 Effetto di glucagone, liraglutide e GLP-1 sulla respirazione mitocondriale

Sulla base delle evidenze descritte, abbiamo valutato la respirazione mitocondriale degli adipociti differenziati *in vitro* in assenza o in presenza di glucagone, liraglutide e GLP-1 nativo. A tale scopo è stato utilizzato lo strumento Seahorse che permette di misurare *in vivo* il *rate* del consumo di ossigeno (*oxygen consumption rate*, OCR) nel tempo come indicatore chiave della funzionalità mitocondriale. Al termine del periodo necessario per il differenziamento, al mezzo di coltura sono stati aggiunti dei reagenti che interferiscono con i complessi della catena respiratoria mitocondriale [figura 21A] per poter valutare i livelli minimi e massimi della respirazione. Come riportato negli istogrammi, glucagone, liraglutide e GLP-1(7-36) determinano un aumento della massima respirazione basale e una riduzione della produzione di ATP rispetto agli adipociti non trattati, statisticamente significativa per tutte e tre le molecole [figura 21B-C].



**Figura 21. Respirazione mitocondriale nelle S-ASC differenziate in vitro in presenza di glucagone, liraglutide e GLP-1.** Le S-ASC sono state indotte in vitro in assenza (ADIPO) o in presenza di glucagone (GLUC), liraglutide (LIRA) e GLP-1 nativo alla concentrazione 10 nM. Al termine del periodo di induzione al mezzo sono stati aggiunti oligomicina, FCCP, rotenone e antimicina A che interferiscono con i complessi della catena respiratoria mitocondriale.

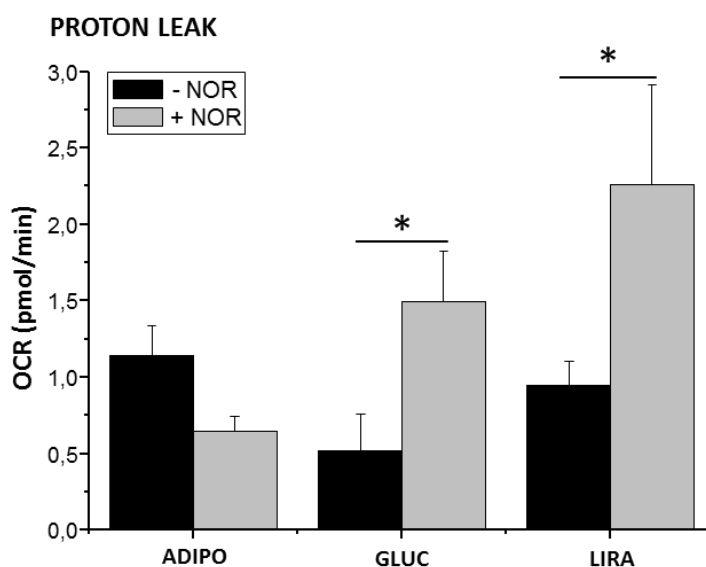
**A:** Plot rappresentativo dell'andamento dell'OCR nel tempo misurato tramite Seahorse.

**B:** Nell'istogramma è riportata la respirazione massima ottenuta come media  $\pm$  SE dei valori di OCR misurati nel tempo. \* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.005$ , § $P < 0.000$  vs ADIPO.

**C:** Nell'istogramma è riportata la produzione di ATP ottenuta come media  $\pm$  SE dei valori di OCR misurati nel tempo. \* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.005$ , § $P < 0.000$  vs ADIPO.

#### 4.10 L'UCP-1 espressa dagli adipociti bruni differenziati in presenza di glucagone e liraglutide è attiva perché è in grado di disaccoppiare la respirazione mitocondriale

Una volta dimostrato che glucagone, liraglutide e GLP1 sono in grado di stimolare la formazione di adipociti bruni nel corso dell'induzione adipogenica in vitro, come evidenziano gli aumentati livelli di espressione del gene UCP-1, abbiamo voluto valutare se la proteina UCP-1 fosse anche funzionalmente attiva. Per dimostrare la funzionalità della proteina, abbiamo valutato mediante Seahorse il disaccoppiamento della respirazione mitocondriale (*proton leak*) indotto dalla somministrazione in acuto durante la respirazione adipocitaria di noradrenalina. Come mostrato in [figura 22], l'aggiunta di noradrenalina durante la registrazione della OCR è in grado di stimolare un aumento significativo della respirazione disaccoppiata negli adipociti differenziati in presenza di glucagone e di liraglutide rispetto agli adipociti di controllo, suggerendo quindi che l'UCP-1 presente negli adipociti bruni sia funzionalmente attiva.



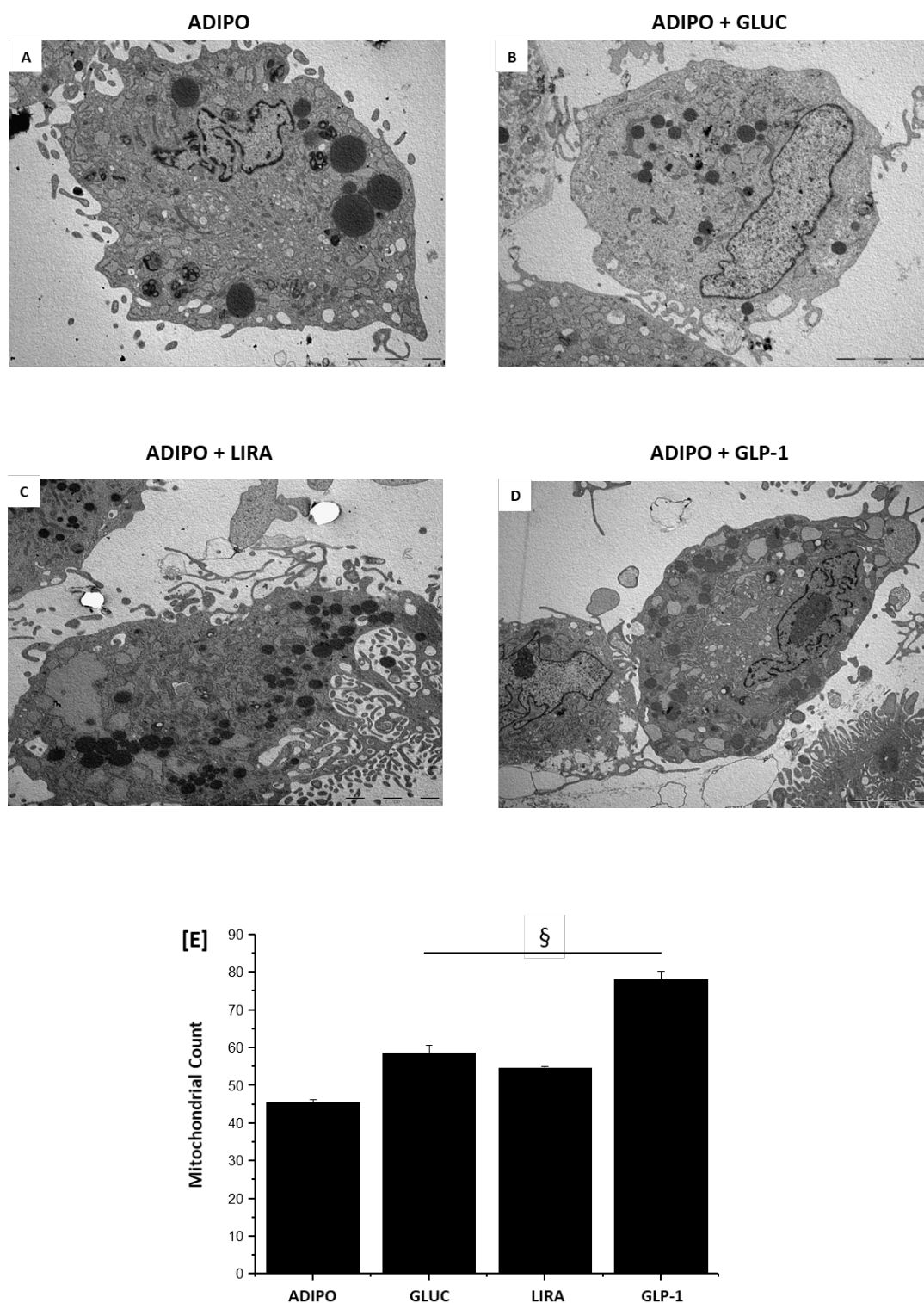
**Figura 22. La stimolazione dell'UCP-1 negli adipociti bruni determina un aumento del disaccoppiamento della respirazione mitocondriale.** Le S-ASC sono state indotte a differenziare verso adipocita in vitro in assenza (ADIPO) o in presenza di glucagone (GLUC) o liraglutide (LIRA) alla concentrazione 10 nM. Al termine del periodo il pozzetto è stato stimolato in acuto con noradrenalina 10  $\mu$ M (NOR) in acuto mentre veniva registrata la componente di OCR legata al disaccoppiamento mitocondriale. Gli istogrammi riportano le medie  $\pm$  SE dei valori di OCR legata al disaccoppiamento della respirazione (*proton leak*) negli adipociti non stimolati con NOR (no treatment, colonne rosse) usati come controllo, oppure in seguito a stimolazione respirazione acuta con noradrenalina 10  $\mu$ M (+NOR, colonne verdi), come valutati al Seahorse. Le colonne blu rappresentano le medie  $\pm$  SE delle differenze di OCR dopo stimolazione con NOR rispetto al controllo non stimolato, nelle tre condizioni di differenziamento adipocitario (ADIPO, solo cocktail differenziativo, GLUC in presenza di glucagone, LIRA in presenza di liraglutide). \* $P < 0.05$  vs il rispettivo controllo.



#### 4.11 Alterazioni quantitative morfometriche dei mitocondri indotte da glucagone, liraglutide e GLP-1 nel corso di differenziamento adipocitario

Dopo aver osservato l'effetto di glucagone, liraglutide e GLP-1 sulla funzionalità mitocondriale, siamo andati a studiare l'organizzazione ultrastrutturale e la morfologia mitocondriale degli adipociti differenziati *in vitro* in presenza o assenza delle tre molecole. Le S-ASC sono state indotte a differenziare in assenza (ADIPO) e in presenza dei tre trattamenti e, successivamente, sono state analizzate mediante microscopio elettronico a trasmissione (*transmission electron microscopy*, TEM). Come è possibile vedere dalle immagini rappresentative [figura 23A-D], ottenute con l'utilizzo di un ingrandimento 15000X, il numero totale dei mitocondri aumenta negli adipociti differenziati in presenza delle tre molecole rispetto all'adipocita ottenuto in assenza di trattamento. Questo dato è stato confermato da un'analisi quantitativa dei mitocondri effettuata al ME. Come riportato nell'istogramma [figura 23E] il numero dei mitocondri risulta aumentato in maniera statisticamente significativa quando il differenziamento avveniva in presenza delle tre molecole rispetto all'adipocita di controllo.

Inoltre, dalle immagini rappresentative ottenute in microscopia elettronica, viene confermata anche la differenza nel numero e nella morfologia delle gocce lipidiche intracellulari. L'adipocita differenziato con il solo *cocktail* di induzione presenta un numero inferiore di gocce lipidiche, con gocce lipidiche di maggiori dimensioni caratteristiche dell'adipocita bianco differenziato *in vitro*. Al contrario, gli adipociti maturi ottenuti dal differenziamento in presenza delle tre molecole presentano un numero superiore di gocce lipidiche, caratterizzata da minori dimensioni tipiche di un fenotipo di tipo bruno [figura 23B-D].

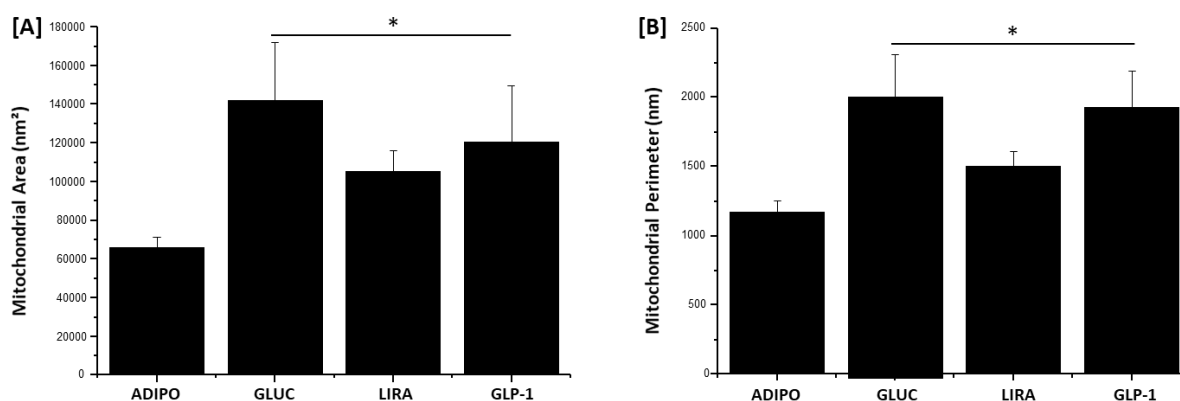


**Figura 23. Glucagone, liraglutide e GLP-1(7-36) determinano un aumento del numero dei mitocondri negli adipociti differenziati in vitro.** Le S-ASC sono state indotte in vitro in assenza (ADIPO) o in presenza di glucagone (GLUC), liraglutide (LIRA) e GLP-1 nativo alla concentrazione 10 nM.

**A-D:** Immagini rappresentative ottenute al microscopio elettronico a trasmissione con ingrandimento 15000X degli adipociti differenziati in vitro.

**E:** L'istogramma rappresenta la media  $\pm$  SE del numero di mitocondri contati. § $P < 0.000$  vs ADIPO.

Per completare l'analisi morfometrica dei mitocondri, le immagini in microscopia elettronica ottenute a ingrandimento maggiore (50000X e 80000X) sono state analizzate mediante il *software* di analisi delle immagini ITEM (SIS) andando a calcolare l'area e il perimetro di superficie dei mitocondri. Messa a confronto con i mitocondri degli adipociti indotti in assenza dei tre trattamenti, i mitocondri degli adipociti differenziati in presenza di glucagone, liraglutide e GLP-1(7-36) presentano un aumento statisticamente significativo dell'area e del perimetro dei mitocondri, a conferma di una maggiore attività di respirazione mitocondriale, tipica dell'adipocita bruno [figura 24A-B]



**Figura 24. Glucagone, liraglutide e GLP-1(7-36) determinano un aumento dell'area e del perimetro dei mitocondri negli adipociti differenziati in vitro. A e B:** Le S-ASC sono state indotte in vitro in assenza (ADIPO) o in presenza di glucagone (GLUC), liraglutide (LIRA) e GLP-1 nativo alla concentrazione 10 nM. L'istogramma rappresenta la media  $\pm$  SE dell'area, A, o del perimetro, B, dei mitocondri. \* $P < 0.05$  vs ADIPO.

## 5. DISCUSSIONE

Il tessuto adiposo è un importante organo endocrino deputato al mantenimento dell'omeostasi energetica per via della sua capacità di immagazzinare trigliceridi e di secernere ormoni. Tuttavia, un eccessivo accumulo di grasso bianco con sua relativa disfunzione e disregolazione della funzione adipocitaria, si associa a patologie metaboliche quali obesità e varie comorbidità, come diabete e disordini cardiovascolari. L'obesità morbigena rappresenta il principale fattore di rischio per lo sviluppo del diabete mellito di tipo 2 (T2D) associato ad insulino-resistenza: secondo quanto affermato dalla *World Health Organization* (WHO), insieme, queste due patologie metaboliche rappresentano la più grande epidemia del ventunesimo secolo, definita coniato una nuova patologia, la "*diabesity*" (Golay & Ybarra 2005). Il tessuto adiposo bruno (BAT), a differenza di quello bianco, accumula un minor quantitativo di lipidi che trasforma in calore nel processo di termogenesi e sembra esercitare una funzione di regolazione positiva sull'equilibrio metabolico. I depositi di grasso bruno sono presenti nell'uomo quasi esclusivamente nel periodo fetale e neonatale, e si riducono come estensione e come funzionalità con l'età e con lo sviluppo di patologie metaboliche. Studi precedenti condotti su modelli murini hanno dimostrato che l'attivazione di tessuto adiposo bruno (BAT) è inversamente correlata al BMI, alla massa grassa e all'insulino-resistenza (Tews & Wabitsch 2011). Per questi motivi, se da una parte vi è un crescente interesse nella ricerca di nuove strategie terapeutiche basate su un'azione diretta sul tessuto adiposo bianco, allo stesso tempo risulta rilevante la possibilità di stimolare il tessuto adiposo bruno nell'adulto a scapito dell'espansione anomala e disfunzionante del WAT in caso di disordini patologici, quali l'obesità e il diabete mellito di tipo 2. Inoltre, la recente scoperta di adipociti *beige/brite* dispersi all'interno del WAT nell'uomo adulto, derivanti da un differente *lineage* rispetto a quelli bruni classici Myf-5+, potrebbe rappresentare un target per terapie mirate alla loro stimolazione: questi adipociti possono infatti essere attivati da stimoli di diversa natura (farmacologici ed endogeni) attraverso il processo di *browning*. Tra gli elementi induttori di *shift* da fenotipo bianco a bruno dell'adipocita sono stati descritti finora le catecolamine, l'ormone irisina prodotto dal muscolo durante esercizio fisico, il peptide natriuretico atriale del cuore, l'FGF21 e il BMP7 prodotti dal fegato, e anche l'esposizione cronica a basse temperature (Villarroya & Vidal-Puig 2013, Himms-Hagen 2000). Tuttavia, riprodurre farmacologicamente gli effetti delle catecolamine, come la noradrenalina, al fine di stimolare l'attivazione del BAT e il processo di

*browning* è potenzialmente molto rischioso per i possibili effetti sulla pressione. Il *goal* terapeutico per stimolare il processo di *browning* sarebbe, quindi, rappresentato dallo stimolo di fattori ormonali endogeni in grado di stimolare direttamente il tessuto adiposo e la conversione WAT-BAT.

Gli agonisti del recettore del GLP-1 (GLP-1Ras) sono farmaci in grado di mimare l'azione del GLP-1 umano, resistenti all'azione dell'enzima DPP-4, utilizzati attualmente per il trattamento del diabete mellito di tipo 2. Oltre alla riduzione della glicemia, alcune di queste molecole hanno mostrato un effetto di riduzione del peso corporeo, rivelandosi efficaci agenti terapeutici per il trattamento dell'obesità. In un recente studio preclinico, il nostro laboratorio ha dimostrato l'effetto inibitorio di alcuni agonisti del recettore del GLP-1 (GLP-1 nativo (7-36) e liraglutide) sulla proliferazione e sul differenziamento *in vitro* di cellule staminali adulte ottenute da biopsie di tessuto adiposo bianco sottocutaneo (S-ASC) (Cantini *et al.* 2017, 2015). La caratterizzazione di questa popolazione di precursori adiposi ha consentito la messa a punto di un modello cellulare valido per lo studio *in vitro* dei meccanismi fisiopatologici alla base della corretta funzione e disfunzione del tessuto adiposo (Baglioni *et al.* 2012, 2009). Negli ultimi anni c'è stato un crescente interesse nello sviluppo di molecole ad azione co-agonista del GLP-1R, GLP-1Ras, con l'obiettivo di combinarne l'azione potenziandola per migliorare costantemente l'efficacia di questi farmaci sul controllo della glicemia e sulla perdita di peso. In questa direzione, uno degli approcci in fase di studio, è l'utilizzo del GLP-1 in associazione con il glucagone (Day *et al.* 2009) o lo sviluppo di un peptide *dual agonist* per il recettore del GLP-1 e il recettore del glucagone (Pocai *et al.* 2009). Il glucagone e il GLP-1 sono processati a partire dal medesimo precursore, il proglucagone. Il gene del proglucagone è espresso nelle  $\alpha$ -cellule pancreatiche, nelle cellule enteroendocrine intestinali e nei neuroni del tratto solitario e dell'ipotalamo, e codifica una proteina di 180 aminoacidi che viene processata in modo differenziale nei vari tipi di cellule a causa dell'espressione tessuto specifica dell'enzima pro-ormone convertasi (PC), il quale taglia il proglucagone in differenti siti (Cantini *et al.* 2016). Nelle  $\alpha$ -cellule, la presenza massiva di PC2 determina la produzione predominante di glucagone. Contrariamente, nelle L-cellule intestinali e nel SNC, la presenza predominante di PC1/3 permette la produzione di GLP-1. Il glucagone viene rilasciato in seguito a calo del glucosio nel sangue e determina inibizione del rilascio di insulina, ha effetti glicogenolitici sul fegato e di gluconeogenesi, anche se più recentemente è stato visto come l'azione del glucagone potenzia la secrezione di insulina nelle  $\beta$ -cellule del pancreas attraverso l'attivazione dei GCGR alle concentrazioni fisiologiche di glucosio nel sangue (Zhang *et al.* 2021)

Abbiamo ritenuto, quindi, interessante valutare una eventuale azione diretta del glucagone sul comparto adiposo, utilizzando il modello sviluppato in laboratorio di cellule staminali adipose adulte. Analogamente a quanto osservato con gli agonisti del GLP-1R, sono stati analizzati gli effetti del glucagone sulla capacità proliferativa delle S-ASC. Gli esperimenti di conta cellulare diretta hanno dimostrato, infatti, un effetto inibitorio del glucagone sulla crescita cellulare in maniera tempo-dipendente e dose-dipendente. L'effetto anti-proliferativo del glucagone è stato poi confermato mediante l'analisi citofluorimetrica della conta cellulare e tramite saggi di incorporazione della timidina triziata. Mediante esperimenti di citofluorimetria con l'Annexina V, abbiamo valutato l'eventuale attivazione precoce dell'apoptosi nelle S-ASC da parte del glucagone. Diversamente da quanto osservato con gli agonisti del GLP-1R (Cantini *et al.* 2015), l'effetto inibitorio sulla crescita cellulare del glucagone non sembra essere mediato dall'induzione del processo apoptotico nelle S-ASC. Sulla base dei dati ottenuti, siamo andati a studiare il ciclo cellulare mediante analisi citofluorimetrica. In questo caso, è stato osservato che i trattamenti con glucagone determinano una riduzione del numero di cellule che entrano nella fase S, suggerendo che l'effetto di riduzione del *rate* proliferativo potrebbe essere correlato al blocco del ciclo cellulare in questa fase.

Successivamente, abbiamo valutato l'effetto del glucagone sulla capacità differenziativa della cellula precursore verso l'adipocita bianco maturato *in vitro*. I trattamenti con le diverse dosi di glucagone hanno evidenziato una riduzione dell'accumulo di lipidi intracellulari negli esperimenti di induzione dell'adipogenesi *in vitro* delle S-ASC, nonché una riduzione dell'espressione di *marker* dell'adipocita maturo, come HSL e FABP4 e di *marker* più precoci, come PPAR $\gamma$ . Tali risultati suggeriscono, quindi, che il glucagone ha sia un effetto inibitorio sulla proliferazione dei precursori adipocitari determinando un blocco dell'espansione clonale a livello del compartimento staminale adiposo, sia un'azione diretta sull'adipocita maturo limitando la capacità differenziativa delle S-ASC. A differenza di quanto atteso sulla base dell'effetto opposto evidenziato per gli agonisti del GLP-1 verso il glucagone sul controllo glicemico, sulle ASC, i due tipi di molecole presentano effetti simili. Del resto, glucagone e GLP-1, come prodotti del gene pro-glucagone condividono un'ampia omologia di sequenza e, entrambi i recettori, appartengono alla famiglia dei recettori accoppiati a proteine G. A supporto di questa analogia, è stato dimostrato che alcuni pesci, come *zebrafish*, non esprimono il GLP-1R, ma presentano un recettore alternativo, zfGPCR, in grado di interagire sia con GLP-1 che con glucagone (Oren *et al.* 2016).

In letteratura, i meccanismi di azione degli agonisti del GLP-1R a livello del tessuto adiposo non

sono del tutto chiari, poiché l'espressione del recettore classico GLP-1R resta ancora dibattuta. Gli effetti anti-proliferativi degli agonisti del GLP-1R sulle S-ASC e la reversibilità di tali effetti tramite l'utilizzo dell'antagonista del recettore, l'exendin(9-39), suggeriscono l'espressione del GLP-1R nel tessuto adiposo (Cantini *et al.* 2015). L'espressione del GLP-1R è stata dimostrata anche nelle cellule staminali mesenchimali derivanti da midollo osseo (Lee *et al.* 2015, Sanz *et al.* 2010).

In questo lavoro abbiamo dimostrato l'espressione proteica del GLP-1R e del GCGR nelle S-ASC e nel tessuto adiposo mediante tecniche diverse, suggerendo quindi che gli effetti diretti degli agonisti del GLP-1 e del glucagone sul comparto staminale adiposo possano essere mediati da tali recettori. Inoltre, il nostro scopo è stato quello di definire i meccanismi molecolari coinvolti nell'azione delle due molecole sui precursori adiposi umani e di chiarire il ruolo di entrambi i recettori nel mediare tali effetti in particolare per quanto riguarda gli effetti simili.

Per chiarire il rispettivo coinvolgimento dei 2 recettori GLP-1R e GCGR nel mediare gli effetti del glucagone, poiché è stato ipotizzato che gli effetti extrapancreatici del GLP-1 possano essere mediati dal coinvolgimento di un recettore alternativo o da meccanismi alternativi di eterodimerizzazione fra GLP-1R e GCGR che medierebbero quindi vie intracellulari di segnalazione selettive (Cantini *et al.* 2016), abbiamo utilizzato l'antagonista selettivo del recettore del glucagone, des-His1-[Glu9]-glucagon(1-29), e in parallelo, l'antagonista del recettore del GLP-1, exendin(9-39), entrambi con elevata specificità per il proprio recettore. Gli esperimenti di conta cellulare diretta hanno dimostrato che l'effetto inibitorio del glucagone sulla proliferazione delle S-ASC è completamente revertito dall'antagonista del GCGR e, anche se in misura minore, dall'antagonista del GLP-1R. I risultati ottenuti suggeriscono il coinvolgimento di entrambi i recettori nel mediare gli effetti di glucagone e GLP-1 nelle S-ASC, indipendentemente dal ligando. A supporto di questa ipotesi abbiamo dimostrato l'assenza di un effetto sinergico tra glucagone e GLP-1 nel mediare l'effetto anti-proliferativo quando le S-ASC vengono trattate con entrambe le molecole. Analogamente, entrambi gli antagonisti sono stati utilizzati identificare il coinvolgimento dei due recettori nel mediare gli effetti sulla capacità differenziativa della cellula precursore verso l'adipocita bianco maturato *in vitro*. Anche in questo caso, abbiamo osservato una reversione degli effetti inibitori del glucagone sull'adipogenesi *in vitro*, sia in termini di depositi intracellulari di trigliceridi che di espressione di *marker* adipocitari da parte di entrambi gli antagonisti. In definitiva, i risultati ottenuti suggeriscono che gli effetti del glucagone sono mediati dal legame della molecola con il proprio recettore e con il recettore del GLP-1, che risultano entrambi espressi nelle S-ASC, nello specifico il GLP-1R a livello maggiore rispetto al GCGR. Inoltre, l'azione della

forma troncata, GLP-1(9-36), con bassa affinità per il recettore classico del GLP-1, dimostrata nelle S-ASC in un recente studio (Cantini *et al.* 2017), fa ipotizzare la presenza di meccanismi alternativi ai recettori classici che potrebbero coinvolgere una possibile eterodimerizzazione con i due recettori (Cantini *et al.* 2016).

Nella seconda parte del lavoro, abbiamo comparato nello specifico gli effetti di glucagone, GLP-1 nativo e del suo analogo farmacologico, liraglutide, sull'adipogenesi *in vitro* delle cellule staminali derivate da tessuto adiposo bianco, con particolare attenzione al fenomeno di *browning*. Un recente studio ha dimostrato che in pazienti affetti da diabete mellito di tipo 2 e obesità addominale, la somministrazione di liraglutide riduce il grasso epicardico (EAT). Gli adipociti del grasso epicardico esprimono il recettore del GLP-1 che, quando attivato dall'agonista del GLP-1, induce riduzione dell'adipogenesi, maggiore ossidazione degli acidi grassi e differenziazione verso tessuto adiposo bruno (Zhao *et al.* 2021). Il trattamento con le tre molecole nel corso dell'induzione adipogenica *in vitro* ha evidenziato un ridotto *rate* di differenziamento adiposo, come dimostrato dalla diminuita espressione di FABP4, marcatore dell'adipocita maturo legante gli acidi grassi esterificati, e una riduzione nella capacità di accumulo intracellulare di trigliceridi: le gocce lipidiche intracellulari sono meno voluminose e di minori dimensioni, con una morfologia suggestiva dell'adipocita bruno multivacuolare. Questi risultati suggeriscono quindi un'azione diretta delle tre molecole nel ridurre la capacità differenziativa degli adipociti, che potrebbe giustificare il ridotto volume della massa grassa nei soggetti trattati con GLP-1 e liraglutide. Inoltre, il trattamento stimola l'espressione di adiponectina, un marcatore di funzionalità selettivo dell'adipocita maturo, suggerendo che l'effetto di queste tre molecole sia comunque positivo sulla funzionalità adipocitaria delle cellule in grado di differenziarsi. L'aspetto morfologico degli adipociti formati in seguito a stimolazione con le tre molecole, suggerisce poi uno *shift* verso la formazione di adipociti bruni, caratterizzati da accumuli lipidici in piccole e numerose goccioline intracellulari. Con lo scopo di indagare questo aspetto, è stata eseguita una valutazione molecolare del fenomeno del *browning*. Come controllo positivo abbiamo utilizzato una popolazione cellulare (B-ASC) precedentemente caratterizzata nel nostro laboratorio, costituita da precursori *brite* che portano alla formazione di adipociti bruni Myf5-. Le B-ASC di controllo sono state isolate da grasso bianco viscerale intorno al tumore della midollare del surrene, il feocromocitoma (Di Franco *et al.* 2014). La presenza di precursori *brite*, dispersi all'interno di depositi di tessuto adiposo bianco intorno al feocromocitoma, è dovuta al rilascio di elevati livelli di catecolamine da parte del tumore, fattori trofici per lo sviluppo e l'attivazione del BAT. Pertanto, questo modello è stato



utilizzato come controllo positivo dell'espressione dei marcatori di tipo bruno, al fine di valutarne la capacità differenziativa e l'espressione di marcatori del fenotipo adipocitario bianco e bruno in seguito a stimolazione con le tre molecole nelle popolazioni di ASCs bianche. In questo caso, il differenziamento adipocitario *in vitro* è stato indirizzato sia verso il fenotipo bianco, utilizzando l'opportuno mezzo di induzione standard, sia più specificamente verso quello bruno mediante addizione al *cocktail* differenziativo di noradrenalina. Dagli esperimenti di differenziamento *in vitro* condotti in parallelo verso fenotipo bianco e bruno, è emerso che le B-ASC presentano un potenziale differenziativo elevato verso il *lineage brown*, generando adipociti bruni indipendentemente dal tipo di induzione. Questo dato è stato confermato dall'elevata espressione del marcatore UCP-1 mediante analisi *real time* PCR quantitativa Taqman. Mentre, la valutazione dell'espressione genica di FABP4 e adiponectina, marcatori specifici dell'adipocita maturo, confermano l'avvenuto differenziamento con entrambi i mezzi di induzione, anche se i livelli di espressione indotti dal mezzo contenente noradrenalina risultano inferiori. Quanto osservato suggerisce che le B-ASC, per quanto in grado di immagazzinare trigliceridi, tendono a differenziare verso fenotipo bruno a scapito del bianco in corrispondenza di stimolazione noradrenergica (Himms-Hagen *et al.* 2000). Questi risultati, quindi, dimostrano come le popolazioni B-ASC contengano numerosi precursori inducibili di tipo *brite*, rappresentando un ottimo controllo per lo studio del *browning* nelle popolazioni bianche di S-ASC. Inoltre, per caratterizzare meglio il *lineage brite* della popolazione cellulare isolata, abbiamo dimostrato mediante analisi TaqMan che le B-ASC sono positive per l'espressione dei marcatori staminali *brite* TBX1 e CD137. Per valutare se l'azione di glucagone, liraglutide e GLP-1(7-36) è in grado di indurre uno *shift* verso il fenotipo *brown* degli adipociti differenziati a partire dalle S-ASC, abbiamo valutato i livelli di espressione di marcatori adipocitari del fenotipo bruno (PRDM16 e UCP-1) mediante analisi TaqMan nella nostra popolazione di S-ASC indifferenziate e inseguito a induzione del differenziamento in presenza delle tre molecole, comparando il risultato con quanto osservato nella popolazione di controllo arricchita di precursori B-ASCs. In particolare, i livelli di espressione di UCP-1 risultano più elevati negli adipociti differenziati in presenza di glucagone, liraglutide e GLP-1(7-36) rispetto alla semplice induzione adipogenica nelle ASCs bianche. Per supportare ulteriormente l'ipotesi della stimolazione del processo di *browning* delle S-ASC indotte, è stata valutata la funzionalità e morfologia dei mitocondri negli adipociti differenziati in presenza delle tre molecole. Come saggio funzionale abbiamo utilizzato l'analizzatore Seahorse con il saggio Mitostress che effettua la misurazione della respirazione mitocondriale in relazione al *rate* di consumo di ossigeno (OCR). I

risultati ottenuti mostrano che gli adipociti differenziati *in vitro* in presenza di glucagone, liraglutide e GLP-1(7-36) presentano un aumento della respirazione massimale e una riduzione della produzione di ATP. Inoltre, a seguito di stimolazione acuta con noradrenalina, negli adipociti ottenuti da differenziamento condotto in presenza di glucagone e liraglutide, ma non negli adipociti di controllo, si osserva un significativo incremento della respirazione mitocondriale disaccoppiata (*proton leak*), indice di avvenuta stimolazione dell'attività della proteina disaccoppiante UCP-1 presente negli adipociti bruni. Questo conferma la natura *brown* dei mitocondri, caratterizzati dalla presenza di UCP-1, responsabile del disaccoppiamento della catena respiratoria dalla fosforilazione ossidativa determinando ossidazione del substrato con esigua produzione di ATP. Per lo studio della morfologia mitocondriale, gli adipociti differenziati *in vitro* e trattati con le tre molecole sono stati analizzati mediante microscopio elettronico a trasmissione. Dalle immagini ottenute è stato possibile apprezzare come negli adipociti differenziati con l'aggiunta di glucagone, liraglutide e GLP-1(7-36) al mezzo di induzione i mitocondri sono più numerosi, voluminosi e ricchi di creste rispetto ai mitocondri presenti nelle cellule adipose non trattate. Inoltre, a supporto della stimolazione del processo di *browning*, l'analisi quantitativa morfometrica ha confermato un aumento del numero, dell'area superficiale e del perimetro dei mitocondri negli adipociti indotti in presenza delle tre molecole, suggerendo una maggiore attività del mitocondrio, a supporto della aumentata respirazione.

## 6. CONCLUSIONI

In conclusione, con questo lavoro abbiamo dimostrato per la prima volta che il glucagone ha un'azione diretta sul modello cellulare di precursori adiposi umani andando ad interferire con la proliferazione e sul differenziamento delle S-ASC. Questi effetti diretti sul tessuto adiposo, che risultano simili a quelli esercitati dal GLP-1 nativo e da liraglutide, potrebbero essere alla base di una quota della perdita di peso osservata con i co-agonisti glucagone/GLP1 e del miglioramento della funzionalità del tessuto adiposo associata. Inoltre, abbiamo dimostrato l'espressione del GCGR e del GLP-1 nel comparto staminale e che l'azione del glucagone è mediata da entrambi i recettori, con meccanismi che risultano, tuttavia, ancora da chiarire. In aggiunta, con questo studio si può ipotizzare che parte dell'effetto di riduzione del peso osservato dalla somministrazione di glucagone, GLP-1 nativo e liraglutide sia parzialmente mediato da un'azione diretta sul tessuto adiposo bianco che porta alla stimolazione della produzione di adipociti bruni a scapito dell'eccessiva maturazione di adipociti bianchi. Infatti, abbiamo dimostrato che il trattamento con glucagone, GLP-1 nativo e liraglutide è in grado di indurre uno *shift* verso il fenotipo bruno degli adipociti differenziati da cellule staminali derivanti da tessuto adiposo bianco sottocutaneo. Questi risultati *in vitro* fanno ipotizzare la possibilità di una stimolazione diretta del processo di *browning* utilizzando fattori endogeni, senza il coinvolgimento dell'asse centrale tipico di una stimolazione noradrenergica e, quindi, rappresentare un'evoluzione per l'elaborazione di nuovi trattamenti farmacologici contro l'obesità.

## 7. BIBLIOGRAFIA

Adamczak M, Wiecek A. (2013). The adipose tissue as an endocrine organ. *Semin Nephrol.* 33(1), pp. 2-13.

Ahima RS, Saper CB, Flier JS, Elmquist JK. (2000). Leptin regulation of neuroendocrine systems. *Front neuroendocrinology.* 21,263-307.

Ahima RS. (2006). Adipose tissue as an endocrine organ. *Obesity (Silver Spring).* 14 Suppl 5, pp. 242S-249S.

Alberti KG, Zimmet P, Shaw J, for the IDF Epidemiology Task Force Consensus Group. (2005). The metabolic syndrome – a new worldwide definition. *Lancet.* 366: 1059-62.

Ali AT, Warren EH, Renier M, Michael SP. (2013). Adipocyte and adipogenesis. *European Journal of Cell Biology.* Vol.92(6):229-236.

Amatuzio DS, Grande F, Wada S. Effect of glucagon on the serum lipids in essential hyperlipemia and in hypercholesterolemia. *Metabolism.* 1962; 11:1240–1249.

Aminova LR, Wilson BA. (2007). Calcineurin-independent inhibition of 3T3-L1 adipogenesis by *Pasteurella multocida* toxin: suppression of Notch1, stabilization of beta-catenin and pre-adipocyte factor 1. *Cell Microbiol.* 2007;9(10):2485-96.

Andrade JM, Frade AC, Guimaraes JB et al. (2014). Resveratrol increases brown adipose tissue thermogenesis markers by increasing SIRT1 and energy expenditure and decreasing fat accumulation in adipose tissue of mice fed a standard diet. *Eur J Nutr.* 53:1503–1510.

Apovian CM, Aronne LJ, Bessesen DH et al. (2015). Pharmacological management of obesity: an Endocrine Society clinical practice guideline. *J Clin Endocrinol Metab.* 100:342-362.

Arita Y, Kihara S, Ouchi N, Takahashi M, Maeda K, Miyagawa J, Hotta K, Shimomura I, Nakamura T, Miyaoka K, Kuriyama H, Nishida M, Yamashita S, Okubo K, Matsubara K, Muraguchi M, Ohmoto Y, Funahashi T, Matsuzawa Y Miftah. (1999). Paradoxical decrease of an adipose-specific protein, adiponectin, in obesity. *Biochem Biophys Res Commun.* 257:79-83.

Assimacopoulos-Jeannet F, Brichard S, Rencurel F, Cusin I and Jeanrenaud B. (1995). In vivo effects of hyperinsulinemia on lipogenic enzymes and glucose transporter expression in rat liver and adipose tissue. *Metabolism.* 44 228-233.

Avasthi S, Srivastava RN, Singh A, Srivastava M. (2008). Stem Cell: Past, Present and Future- A Review Article. *Internet Journal of Medical Update.* Vol. 3, No. 1, Jan-Jun.

Baggio LL, Drucker DJ. (2007). Biology of incretins: GLP-1 and GIP. *Gastroenterology.* 132:2131–2157.298.

Baggio, L. L., & Drucker, D. J. (2021). Glucagon-like peptide-1 receptor co-agonists for treating metabolic disease. *Molecular metabolism.* 46, 101090.

Baglioni S, Cantini G, Poli G, Francalanci M, Squecco R, Di Franco A, Borgogni E, Frontera S, Nesi G, Liotta F, Lucchese M, Perigli G, Francini F, Forti G, Serio M, Luconi M. (2012). Functional differences in visceral and subcutaneous fat pads originate from differences in the adipose stem cell. *PLoS One*. 7 (5), e36569.

Baglioni S, 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. (2009). Characterization of human adult stem-cell populations isolated from visceral and subcutaneous adipose tissue. *Faseb J*. Vol.23: 1-13.

Ban K, Kim KH, Cho CK, Sauvé M, Diamandis EP, Backx, PH, Drucker DJ, Husain M. (2010). Glucagon-like peptide (GLP)-1(9-36)amide-mediated cytoprotection is blocked by exendin(9-39) yet does not require the known GLP-1 receptor. *Endocrinology*. 151(4), 1520–1531.

Ban K, Noyan-Ashraf MH, Hoefler J, Bolz SS, Drucker DJ, Husain M. (2008). Cardioprotective and vasodilatory actions of glucagon-like peptide 1 receptor are mediated through both glucagon-like peptide 1 receptor-dependent and -independent pathways. *Circulation*. 117(18), 2340–2350.

Banerjee RR. (2003). Resistin: molecular history and prognosis. *Journal of Medicine*. 81(4):218-226.

Barbatelli G, Murano I, Madsen L, Hao Q, Jimenez M, Kristiansen K, Giacobino JP, De Matteis R, Cinti S. (2010). The emergence of cold-induced brown adipocytes in mouse white fat depots is determined predominantly by white to brown adipocyte transdifferentiation. *Am J Physiol Endocrinol Metab*. 298: E1244-E125.

Beiroa D, Imbernon M, Gallego R, Senra A, Herranz D, Villarroya F, Serrano M, Fernø J, Salvador J, Escalada J, Dieguez C, Lopez M, Frühbeck G, Nogueiras R. (2014). GLP-1 agonism stimulates brown adipose tissue thermogenesis and browning through hypothalamic AMPK. *Diabetes*. 63(10):3346-58.

Bell GI, Sanchez-Pescador R, Laybourn PJ, Najarian RC. Exon duplication and divergence in the human preproglucagon gene. *Nature*. 1983 Jul 28-Aug 3;304(5924):368-71.

Bing C, Frankish HM, Pickavance L, Wang Q, Hopkins DFC, Stock MJ, Williams G. 1998. Hyperphagia cold-exposed rats is accompanied by decreased plasma leptin but unchanged hypothalamic NPY. *American Journal of Physiology*. 274: R62-R68.

Birerdinc A, Jarrar M, Stotish T, Randhawa M and Baranova A. (2013). Manipulating molecular switches in brown adipocytes and their precursors: a therapeutic potential. *Prog Lipid Res*, 51-61, 2013.

Bollheimer LC, Landauer HC, Troll S, Schweimer J, Wrede CE, Schölmerich J, Buettner R. (2004). Stimulatory short-term effects of free fatty acids on glucagon secretion at low to normal glucose concentrations. *Metabolism: clinical and experimental*. 53(11), 1443–1448.

Bordicchia M, Liu D, Amri EZ, Ailhaud G, Dessì-Fulgheri P, Zhang C, Takahashi N, Sarzani R, Collins S. (2012). 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.

Bornstein SR, Abu-Asab M, Glasow A, Páth G, Hauner H, Tsokos M, Chrousos GP, Scherbaum WA. (2000). Immunohistochemical and ultrastructural localization of leptin and leptin receptor in human white adipose tissue and differentiating human adipose cells in primary culture. *Diabetes*. 49(4):532-8.

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. (2012). A PGC1- $\alpha$ -dependent myokine that drives brownfat-like development of white fat and thermogenesis. *Nature*. 481: 463-468.

- Brandt SJ, Götz A, Tschöp MH, Müller TD. (2018). Gut hormone polyagonists for the treatment of type 2 diabetes. *Peptides*. 100, 190–201.
- Brown JC, Dryburgh JR. (1971). A gastric inhibitory polypeptide. II. The complete amino acid sequence. *Can J Biochem*. Aug;49(8):867-72.
- Bruun JM, Lihn AS, Pedersen SB, Richelsen B. (2005). Monocyte chemoattractant protein-1 release is higher in visceral than subcutaneous human adipose tissue (AT): implication of macrophages resident in the AT. *J Clin Endocrinol Metab*. 90(4), pp. 2282-9.
- Buscemi S, Manneri R, Dia Noto A, Verga S. (1994). Valutazione della composizione corporea in gruppi di soggetti con differente taglia corporea. Confronto tra metodica plicometria ed impedenziometrica. *Ann Ital Med Int*. 9:223.
- Buse JB, Henry RR, Han J, Kim DD, Fineman MS, Baron AD. (2004). Effects of exenatide (exendin-4) on glycemic control over 30 weeks in sulfonylurea-treated patients with type 2 diabetes. *Diabetes Care*. 27: 2628 2635.
- Butler AE, Janson J, Bonner-Weir S, Ritzel R, Rizza RA, Butler PC. (2003).  $\beta$ -cell deficit and increased  $\beta$ -cell apoptosis in humans with type 2 diabetes. *Diabetes*. 52:102-10.
- Campbell JE, Drucker DJ. (2015). Islet  $\alpha$  cells and glucagon-critical regulators of energy homeostasis. *Nat. Rev. Endocrinol*. 1-10.
- Campbell JE, Drucker DJ. (2013) Pharmacology, physiology, and mechanisms of incretin hormone action. *Cell Metab*. 17(6):819-837.
- Cannon B, Nedergaard J. (2004). Brown adipose tissue: function and physiological significance. *Physiol Rev*. 84(1), pp. 277-359.
- Cantini G, Di Franco A, Mannucci E, Luconi M. (2017). Is cleaved glucagon-like peptide 1 really inactive? Effects of GLP-1(9-36) on human adipose stem cells. *Molecular and cellular endocrinology*. 439, 10–15.
- Cantini G, Di Franco A, Samavat J, Forti G, Mannucci E, Luconi M. (2015). Effect of liraglutide on proliferation and differentiation of human adipose stem cells. *Molecular and cellular endocrinology*. 402, 43–50.
- Cantini G, Mannucci E, Luconi M. (2016). Perspectives in GLP-1 research: new targets, new receptors. *Trends in Endocrinology & Metabolism*. 27(6):427-438.
- Caren R, Corbo L. (1960). Glucagon and cholesterol metabolism. *Metabolism*. 9:938–945.
- Carmen GY, Víctor SM. (2006). Signalling mechanisms regulating lipolysis. *Cell Signal*. 18(4), pp. 401-8.
- Cawthorn W, Scheller E, MacDougald O. (2012). Adipose tissue stem cells meet preadipocyte commitment: going back to the future. *J Lipid Res*, no. 53(2), pp. 227-46.
- Ceriello A, Novials A, Ortega E, Canivell S, La Sala L, Pujadas G, Esposito K, Giugliano D, Genovese S. (2013) Glucagon-like peptide 1 reduces endothelial dysfunction, inflammation, and oxidative stress induced by both hyperglycemia and hypoglycemia in type 1 diabetes. *Diabetes Care*. Aug;36(8):2346-50.

- Chai W, Zhang X, Barrett EJ, Liu Z. (2014). Glucagon-like peptide 1 recruits muscle microvasculature and improves insulin's metabolic action in the presence of insulin resistance. *Diabetes*. vol.63 no.8 2788-2799.
- Challa TD, Beaton N, Arnold M, Rudofsky G, Langhans W, Wolfrum C. (2012). Regulation of adipocyte formation by GLP-1/GLP-1R signaling. *J Biol Chem*. 287(9):6421-30.
- Chan JM, Rimm EB, Colditz GA, Stampfer WJ, Willet WC. (1994). Obesity, fat distribution and weight gain risk factors for clinical diabetes in men. *Diabetes Care*. 17:961
- Chang SH, Stoll CR, Song J, Varela JE, Eagon CJ, Colditz GA. (2014). The effectiveness and risks of bariatric surgery: an updated systematic review and metaanalysis, 2003-2012. *JAMA Surg*. 149: 275–287.
- Chen J, Ishac EJ, Dent P, Kunos G, Gao B. (1998). Effects of ethanol on mitogen-activated protein kinase and stress-activated protein kinase cascades in normal and regenerating liver. *Biochem. J*. 334(3):669–676.
- Cheng-Xue R, Gómez-Ruiz A, Antoine N, Noël LA, Chae HY, Ravier MA, Chimienti F, Schuit FC, Gilon P. (2013). Tolbutamide controls glucagon release from mouse islets differently than glucose: involvement of  $K_{ATP}$  channels from both  $\alpha$ -cells and  $\delta$ -cells. *Diabetes*. 62: 1612–1622.
- Choe SS, Huh JY, Hwang IJ, Kim JI, Kim JB. (2016). Adipose Tissue Remodeling: Its Role in Energy Metabolism and Metabolic Disorders. *Frontiers in endocrinology*. 7, 30.
- Christodoulides C, Lagathu C, Sethi JK, Vidal-Puig A. Adipogenesis and WNT signalling. (2009). *Trends Endocrinol Metab*. 20(1):16-24.
- Christodoulides C, Scarda A, Granzotto M, Milan G, Dalla Nora E, Keogh J, De Pergola G, Stirling H, Pannacciulli N, Sethi JK, Federspil G, Vidal-Puig A, Farooqi IS, O'Rahilly S, Vettor R. (2006). WNT10B mutations in human obesity. *Diabetologia*. 49(4):678-84.
- Cinti S, Zancanaro C, Sbarbati A, Cicolini M, Vogel P, Ricquier D, Fakan S. (1989). Immunoelectron microscopical identification of the uncoupling protein in brown adipose tissue mitochondria. *Biol Cell*. 67(3):359-62.
- Cinti S. (2005). The adipose organ. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids*. 73(1):9- 15.
- Cinti S. (2011). Between brown and white: novel aspects of adipocyte differentiation. *Ann. Med*. 43, 104–115.
- Cinti S. (2012). The adipose organ at a glance. *Dis. Model. Mech*. 5, 588–594.
- Cinti S. (2011). Between brown and white: novel aspects of adipocyte differentiation. *Ann Med*. 43(2), pp. 104-15.
- Clark A, Wells CA, Buley ID, Cruickshank JK, Vanhegan RI, Matthews DR, Cooper GJ, Holman RR, Turner RC. (1988). Islet amyloid, increased A-cells, reduced B-cells and exocrine fibrosis: quantitative changes in the pancreas in type 2 diabetes. *Diabetes Res*. 9(4):151-9.
- Coelho M, Oliveira T, Fernandes R. 2013. Biochemistry of adipose tissue: an endocrine organ. *Arch Med Sci*. 9(2), pp. 191-200.
- Conarello SL, Jiang G, Mu J, Li Z, Woods J, Zycband E, Ronan J, Liu F, Roy RS, Zhu L, Charron MJ, Zhang BB. (2007). Glucagon receptor knockout mice are resistant to diet-induced obesity and streptozotocin-mediated beta cell loss and hyperglycaemia. *Diabetologia*. 50(1):142-50.

Crepaldi G, Belfiore F, Bosello O, Caviezel F, Contaldo F, Enzi G, Melchionda N. (1991). Italian Consensus Conference-overweight, obesity and health. *Int J Obes.* 15(11):781-90.

Creutzfeldt WO, Kleine N, Willms B, Orskov C, Holst JJ, Nauck MA. (1996). Glucagonostatic actions and reduction of fasting hyperglycemia by exogenous glucagon-like peptide I(7-36) amide in type I diabetic patients. *Diabetes Care.*19(6):580-6.

Curi R, Pompéia C, Miyasaka CK, Procópio J. (2002). Entendendo a gordura: os ácidos graxos. São Paulo: Manole.

Cypess AM and Kahn CR. (2010). Brown fat as a therapy for obesity and diabetes. *Curr Opin Endocrinol Diabetes Obes* 17:143-9.

D'Alessio D, Vahl T, Prigeon R. (2004). Effects of glucagon-like peptide 1 on the hepatic glucose metabolism. *Horm Metab Res.* 36(11-12):837-41.

Davies MJ, Bergenstal R, Bode B, Kushner RF, Lewin A, Skjøth TV, Andreasen AH, Jensen CB, DeFronzo RA; NN8022-1922 Study Group. (2015). Efficacy of Liraglutide for Weight Loss Among Patients With Type 2 Diabetes: The SCALE Diabetes Randomized Clinical Trial. *JAMA.* 314(7):687-99.

Day JW, Gelfanov V, Smiley D, Carrington PE, Eiermann G, Chicchi G, Erion MD, Gidda J, Thornberry NA, Tschöp MH, Marsh DJ, SinhaRoy R, DiMarchi R, Poci A. (2012). Optimization of co-agonism at GLP-1 and glucagon receptors to safely maximize weight reduction in DIO-rodents. *Biopolymers.* 98(5):443-50.

Day JW, Ottaway N, Patterson JT, Gelfanov V, Smiley D, Gidda J, Findeisen H, Bruemmer D, Drucker DJ, Chaudhary N, Holland J, Hembree J, Abplanalp W, Grant E, Ruehl J, Wilson H, Kirchner H, Lockie SH, Hofmann S, Woods SC, Nogueiras R, Pfluger PT, Perez-Tilve D, DiMarchi R, Tschöp MH. (2009) A new glucagon and GLP-1 co-agonist eliminates obesity in rodents. *Nat Chem Biol.* (10):749-57.

De Francesco F, Ricci G, D'Andrea F, Nicoletti GF, Ferraro GA. (2015). Human Adipose Stem Cells (hASCs): from bench to bed-side. *Tissue Eng Part B.* (6):572-84.

DeFronzo RA, Ratner RE, Han J, Kim DD, Fineman MS, Baron AD. (2005). Effects of exenatide (exendin-4) on glycemic control and weight over 30 weeks in metformin- treated patients with type 2 diabetes. *Diabetes Care.* 28, 1092- 1100.

Degn KB, Juhl CB, Sturis J, Jakobsen G, Brock B, Chandramouli V, Rungby J, Landau BR, Schmitz O. (2004). One week's treatment with the long-acting glucagon-like peptide 1 derivative liraglutide (NN2211) markedly improves 24-h glycemia and alpha- and beta-cell function and reduces endogenous glucose release in patients with type 2 diabetes. *Diabetes.* 53: 1187-1194.

Del Prato S, Kahn SE, Pavo I, Weerakkody GJ, Yang Z, Doupis J, Aizenberg D, Wynne AG, Riesmeyer JS, Heine RJ, Wiese RJ, & SURPASS-4 Investigators. (2021). Tirzepatide versus insulin glargine in type 2 diabetes and increased cardiovascular risk (SURPASS-4): a randomised, open-label, parallel-group, multicentre, phase 3 trial. *Lancet (London, England).* 398(10313), 1811–1824.

Dharmalingam M, Sriram U, Baruah MP. (2011). Liraglutide: A review of its therapeutic use as a once daily GLP-1 analog for the management of type 2 diabetes mellitus. *Indian J Endocrinol Metab.* 15:9–17.



Di Franco A, Guasti D, Mazzanti B, Ercolino T, Francalanci M, Nesi G, Bani D, Forti, G, Mannelli M, Valeri, A, Luconi M. (2014). Dissecting the origin of inducible brown fat in adult humans through a novel adipose stem cell model from adipose tissue surrounding pheochromocytoma. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism*. 99(10), E1903–E1912.

Dicembrini I, Mannucci E, Rotella CM. (2012). Bone: incretin hormones perceiver or receiver?. *Experimental diabetes research*. 519784.

Dillon JS, Tanizawa Y, Wheeler MB, Leng XH, Ligon BB, Rabin DU, Yoo-Warren H, Permutt MA, Boyd AE 3rd. (1993). Cloning and functional expression of the human glucagon-like peptide-1 (GLP-1) receptor. *Endocrinology*. 133(4):1907-10.

Donnelly D. (2012). The structure and function of the glucagon-like peptide-1 receptor and its ligands. *Br. J. Pharmacol*. 166, 27-41.

Drucker DJ, Nauck MA. (2006). The incretin system: glucagon-like peptide-1 receptor agonist and dipeptidyl peptidase-4 inhibitors in type 2 diabetes. *Lancet*. 368: 1696-705.

Drucker DJ, Philippe J, Mojsov S, Chick WL, Habener JF. (1987). Glucagon-like peptide I stimulates insulin gene expression and increases cyclic AMP levels in a rat islet cell line. *Proc Natl Acad Sci USA*. 84: 3434–38.

Drucker J.D. (2006). The biology of incretin hormones. *Cell Metabolism*. 3,153- 165.

Dunning BE, Foley JE, Ahren B. (2005). Alpha cell function in health and disease: influence of glucagon-like peptide-1. *Diabetologia*. 48: 1700 –1713.

Eaton RP. 1973. Hypolipemic action of glucagon in experimental endogenous lipemia in the rat. *J. Lipid Res*. 14:312–318.

Ebtesam A, AL-Suhaimi, Adeeb Shehzad. (2013). Leptin, resistin and visfatin: the missing link between endocrine metabolic disorders and immunity. *Journal of Medical Research*. 18:12.

Eissing L, Scherer T, Tödter K, Knippschild U, Greve JW, Buurman WA, Pinnschmidt HO, Rensen SS, Wolf AM, Bartelt A, Heeren J, Buettner C, Scheja L. (2013). De novo lipogenesis in human fat and liver is linked to ChREBP- $\beta$  and metabolic health. *Nat Commun*. 4:1528.

Enerbäck S. (2010). Brown adipose tissue in humans. *Int J Obes (Lond)*. 34 Suppl 1, pp. S43-6.

Eng J, Kleinman WA, Singh L, Singh G, Raufman JP. (1992). Isolation and characterization of exendin-4, an exendin-3 analogue, from *Heloderma suspectum* venom. Further evidence for an exendin receptor on dispersed acini from guinea pig pancreas. *J Biol Chem*. 267: 7402-7405.

Eriksson J, Franssila-Kallunki A, Ekstrand A, Saloranta C, Widén E, Schalin C, Groop L. (1989). Early metabolic defects in persons at increased risk for non-insulin-dependent diabetes mellitus. *N Engl J Med*. 321:337.

Fain JN, Madan AK, Hiler ML, Cheema P, Bahouth SW. (2004). Comparison of the release of adipokines by adipose tissue, adipose tissue matrix, and adipocytes from visceral and subcutaneous abdominal adipose tissues of obese humans. *Endocrinology*. 145:2273–2282.

Fain JN, Madan AK. (2005). Regulation of monocyte chemoattractant protein 1 (MCP-1) release by explants of human visceral adipose tissue. *Int J Obes (Lond)*. 29:1299– 1307.

Fajas L, Auboeuf D, Raspé E, Schoonjans K, Lefebvre AM, Saladin R, Najib J, Laville M, Fruchart JC, Deeb S, Vidal-Puig A, Flier J, Briggs MR, Staels B, Vidal H, Auwerx J. (1997). The organization, promoter analysis, and expression of the human PPAR $\gamma$  gene. *J Biol Chem.* 272(30). pp. 18779-89.

Farilla L, Bulotta A, Hirshberg B, Li Calzi S, Khoury N, Noushmehr H, Bertolotto C, Di Mario U, Harlan DM, Perfetti R. (2003). Glucagon-like peptide 1 inhibits cell apoptosis and improves glucose responsiveness of freshly isolated human islets. *Endocrinology.* 144(12):5149-58.

Farmer SR. (2008). Brown fat and skeletal muscle: unlikely cousins?. *Cell.* 134(5). pp. 726-7.

Farmer SR. (2006). Transcriptional control of adipocyte formation. *Cell Metabolism.* 4 263-273.

Farooqi IS, Matarese G, Lord GM, Keogh JM, Lawrence E, Agwu C, Sanna V, Jebb SA, Perna F, Fontana S, Lechler RI, DePaoli AM, O'Rahilly S. (2002). Beneficial effects of leptin on obesity, T cell hyporesponsiveness, and neuroendocrine/metabolic dysfunction of human congenital leptin deficiency. *J Clin Invest.* 2002 Oct;110(8):1093-103.

Felber JP, Acheson KJ, Tappy L. (1993). *From Obesity to Diabetes.* Wiley, Chichester.

Ferre P and Fofelle F. (2007). SREBP-1c transcription factor and lipid homeostasis: clinical perspective. *Hormone Research.* 68 72-82.

Feuerer M, Herrero L, Cipolletta D, Naaz A, Wong J, Nayer A, Lee J, Goldfine AB, Benoist C, Shoelson S, Mathis D (2009). Lean, but not obese, fat is enriched for a unique population of regulatory T cells that affect metabolic parameters. *Nat Med.* 15(8):930-9.

Finan B, Clemmensen C, Muller TD. (2015). Emerging opportunities for the treatment of metabolic diseases: glucagon-like peptide-1 based multi-agonists. *Mol Cell Endocrinol* 418:42–54.

Fisher FM, Kleiner S, Douris N, Fox EC, Mepani RJ, Verdeguer F, Wu J, Kharitonov A, Flier JS, Maratos-Flier E, Spiegelman BM. (2012). FGF21 regulates PGC-1 $\alpha$  and browning of white adipose tissues in adaptive thermogenesis. *Genes Dev* 26: 271-281.

Fonseca-Alaniz MH, Takada J, Alonso-Vale MI, Lima FB. (2007). Adipose tissue as an endocrin organ: from theory to practice. *Jornal de Pediatria.* 83 (5): S192- S203.

Formoso Gloria, Consoli Agostino. (2006). Incretine e trattamento del diabete mellito tipo 2. Dipartimento di Medicina e Scienze dell'Invecchiamento-Università "G.D'Annunzio", Chieti-Pescara.

Frayn KN. (2002). Adipose tissue as a buffer for daily lipid flux. *Diabetologia.* 45 1201– 1210.

Frese L, Dijkman PE, Hoerstrup SP. (2016). Adipose Tissue-Derived Stem Cells in Regenerative Medicine. *Transfus Med Hemother* 43:268–274.

Friedenstein AJ, Piatetzky S II, Petrakova KV. (1966). Osteogenesis in transplants of bone marrow cells. *J Embryol Exp Morphol* 16:381-90.

Frontini A, Cinti S. (2010). Distribution and development of brown adipocytes in the murine and human adipose organ. *Cell Metab.* 11(4), pp. 253-6.

Fujishima Y, Maeda N, Inoue K, Kashine S, Nishizawa H, Hirata A, Kozawa J, Yasuda T, Okita K, Imagawa A, Funahashi T, Shimomura I. (2012). Efficacy of liraglutide, a glucagon-like peptide-1 (GLP-1) analogue, on body weight, eating behavior, and glycemic control, in Japanese obese type 2 diabetes. *Cardiovasc Diabetol.* 14;11:107.

Funahashi T, Nakamura T, Shimomura I, Maeda K, Kuriyama H, Takahashi M, Arita Y, Kihara S, Matsuzawa Y. (1999). Role of adipocytokines on the pathogenesis of atherosclerosis in visceral obesity. *Intern Med.* 38(2):202-6.

Geary N, Kissileff HR, Pi-Sunyer FX, Hinton V. (1992). Individual, but not simultaneous, glucagon and cholecystokinin infusions inhibit feeding in men. *Am. J. Physiol.* 262(Pt 2):R975–R980.

Gelling RW, Du XQ, Dichmann DS, Romer J, Huang H, Cui L, Obici S, Tang B, Holst JJ, Fledelius C, Johansen PB, Rossetti L, Jelicks LA, Serup P, Nishimura E, Charron MJ. (2003). Lower blood glucose, hyperglucagonemia, and pancreatic alpha cell hyperplasia in glucagon receptor knockout mice. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 100(3):1438-43

Gesta S, Tseng YH, Kahn CR. (2007). Developmental origin of fat: tracking obesity to its source. *Cell.* 131(2):242-56.

Giacobino JP. (1995). Beta 3-adrenoceptor: an update. *Eur J Endocrinol.* 132: 377-385.

Giralt M and Villaroya F. (2013). White, Brown, Beige/Brite: Different Adipose Cells for Different Functions? *Endocrinology.* 154: 2992-3000.

Golay A and Ybarra J. (2005). Link between obesity and type 2 diabetes. *Best practice & research. Clinical endocrinology & metabolism.* 19(4), 649–663.

Gregoire FM, Smas CM, Sul HS. (1998). Understanding adipocyte differentiation. *Physiol Rev.* 78:783–809.

Gromada J, Franklin I, Wollheim CB. (2007). Alpha-cells of the endocrine pancreas: 35 years of research but the enigma remains. *Endocr Rev.* 28: 84 –116.

Gromada J, Ma X, Høy M, Bokvist K, Salehi A, Berggren PO, Rorsman P. (2004). ATP-sensitive K channel-dependent regulation of glucagon release and electrical activity by glucose in wild-type and SUR1/mouse alpha-cells. *Diabetes.* 53 Suppl 3: S181– S189.

Guan, HP, Ishizuka T, Chui PC, Lehrke M, Lazar MA. (2005). Corepressors selectively control the transcriptional activity of PPARgamma in adipocytes. *Genes Dev.* 19(4), pp. 453-61.

Guettet C, Rostaqui N, Navarro N, Lecuyer B, Mathe D. (1991). Effect of chronic glucagon administration on the metabolism of triacylglycerol-rich lipoproteins in rats fed a high sucrose diet. *J. Nutr.* 121:24–30.

Guyton AC, Hall JE. (2000). *Textbook of Medical Physiology.* Philadelphia, PA: McGraw-Hill.

Habegger KM, Heppner KM, Geary N, Bartness TJ, DiMarchi R, Tschöp MH. (2010). The metabolic actions of glucagon revisited. *Nat Rev Endocrinol.* 6(12):689-97.

Habegger KM, Stemmer K, Cheng C, Müller TD, Heppner KM, Ottaway N, Holland J, Hembree JL, Smiley D, Gelfanov V, Krishna R, Arafat AM, Konkar A, Belli S, Kapps M, Woods SC, Hofmann SM, D'Alessio D, Pfluger PT, Perez-Tilve D, Seeley RJ, Konishi M, Itoh N, Kharitonov A, Spranger J, DiMarchi RD, Tschöp MH. (2013). Fibroblast growth factor 21 mediates specific glucagon actions. *Diabetes.* 62(5):1453- 63.

Haemmerle G, Zimmermann R, Hayn M, Theussl C, Waeg G, Wagner E, Sattler W, Magin TM, Wagner EF, Zechner R. (2002). Hormone-sensitive lipase deficiency in mice causes diglyceride accumulation in adipose tissue, muscle, and testis. *J Biol Chem.* 277(7), pp. 4806-15.

Haniffa MA, Collin MP, Buckley CD, Dazzi F. (2009). Mesenchymal stem cells: the fibroblasts' new clothes? *Haematologica.* (2009). 258-63. Review.

Hare KJ, Knop FK, Asmar M, Madsbad S, Deacon CF, Holst JJ, Vilsbøll T. (2009). Preserved inhibitory potency of GLP-1 on glucagon secretion in type 2 diabetes mellitus. *J Clin Endocrinol Metab.* 94(12):4679-87.

Harris CA, Haas JT, Streeper RS, Stone SJ, Kumari M, Yang K, Han X, Brownell N, Gross RW, Zechner R, Farese RV. (2011). DGAT enzymes are required for triacylglycerol synthesis and lipid droplets in adipocytes. *J Lipid Res.* 52(4), pp. 657-67.

Henriksen DB, Alexandersen P, Hartmann B, Adrian CL, Byrjalsen I, Bone HG, Holst JJ, Christiansen C. (2009). Four-month treatment with GLP-2 significantly increases hip BMD: a randomized, placebo-controlled, dose-ranging study in postmenopausal women with low BMD. *Bone.* 45(5):833-42.

Herman MA, Peroni OD, Villoria J, Schon MR, Abumrad NA, Blucher M, Klein S and Kahn BB. (2012). A novel ChREBP isoform in adipose tissue regulates systemic glucose metabolism. *Nature.* 484 333-338.

Himms-Hagen J, Melnyk A, Zingaretti MC, Ceresi E, Barbatelli G, Cinti S. (2000). Multilocular fat cells in WAT of CL-316243-treated rats derive directly from white adipocytes. *Am J Physiol Cell Physiol.* 279(3):C670-81.

Himms-Hagen J. (1990). Brown adipose tissue thermogenesis: interdisciplinary studies. *FASEB J.* 4: 2890-2898.

Hondares E, Iglesias R, Giralt A, Gonzalez FJ, Giralt M, Mampel T, Villarroya F. (2011). Thermogenic activation induces FGF21 expression and release in brown adipose tissue. *Journal of Biological Chemistry.* 286 12983-12990.

Hotamisligil GS. (2003). The irresistible biology of resistin. *J Clin Invest.* 111(2), pp. 173-4.

Hua J, Yu H, Dong W, Yang C, Gao Z, Lei A, Sun Y, Pan S, Wu Y, Dou Z. (2009). Characterization of mesenchymal stem cells (MSCs) from human fetal lung: potential differentiation of germ cells. *Tissue Cell.* (6):448-55.

Huang S, Leung V, Peng S, Li L, Wang T, Lu W, Cheung MCK, Zhou G. (2011). Cellular programming. 465-471.

Huang Y, Wilkinson GF, Willars GB. (2010) Role of the signal peptide in the synthesis and processing of the glucagon-like peptide-1 receptor. *Br J Pharmacol.* 159(1):237-51.

Hutley L, Shurety W, Newell F, McGeary R, Pelton N, Grant J, Herington A, Cameron D, Whitehead J and Prins J. (2004). Fibroblast growth factor 1: a key regulator of human adipogenesis. *Diabetes.* 53 3097–3106.

Hyokjoon Kwon, Jeffrey E. Pessin. (2013). Adipokines mediate inflammation and insuline resistance. *Front Endocrinol (Lausanne).* 4:71.

Ibrahim MM. (2010). Subcutaneous and visceral adipose tissue: structural and functional differences. *Obes Rev.* 11(1), pp. 11-8.

Ikezawa Y, Yamatani K, Ohnuma H, Daimon M, Manaka H, Sasaki H. (2003). Glucagon-like peptide-1 inhibits glucagon-induced glycogenolysis in perivenous hepatocytes specifically. *Regul Pept.* 111(1-3):207-10.

Imai T, Takakuwa R, Marchand S, Dentz E, Bornert JM, Messaddeq N, Wendling O, Mark M, Desvergne B, Wahli W, Chambon P, Metzger D. (2004). Peroxisome proliferator-activated receptor gamma is required in mature white and brown adipocytes for their survival in the mouse. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 101(13):4543-7.

Inzucchi SE, Bergenstal RM, Buse JB, Diamant M, Ferrannini E, Nauck M, Peters AL, Tsapas A, Wender R, Matthews DR; American Diabetes Association (ADA); European Association for the Study of Diabetes (EASD). (2012). Management of hyperglycemia in type 2 diabetes: a patient-centered approach: position statement of the American Diabetes Association (ADA) and the European Association for the Study of Diabetes (EASD). *Diabetes Care.* 35(6):1364-79.

Jennissen K, Siegel F, Liebig-Gonglach M, Hermann MR, Kipschull S, van Dooren S, Kunz WS, Fässler R, Pfeifer A. (2012). A VASP-Rac-soluble guanylyl cyclase pathway controls cGMP production in adipocytes. *Sci Signal.* 5(239):ra62.

Jin W, Takagi T, Kanesashi SN, Kurahashi T, Nomura T, Harada J, and Ishii S. (2006). Schnurri-2 controls BMP-dependent adipogenesis via interaction with Smad proteins. *Dev. Cell.* 10 461–471.

Joel CD. (1966). Stimulation of metabolism of rat brown adipose tissue by addition of lipolytic hormones in vitro. *J. Biol. Chem.* 241:814–821.

Kalinina NI, Sysoeva VY, Rubina KA, Parfenova YV, Tkachuk VA. (2011). Mesenchymal stem cells in tissue growth and repair. *Acta Naturae.* 3(4), pp. 30-7.

Kanoski SE, Fortin SM, Arnold M, Grill HJ, Hayes MR. (2011). Peripheral and central GLP-1 receptor populations mediate the anorectic effects of peripherally administered GLP-1 receptor agonists, liraglutide and exendin-4. *Endocrinology.* 152(8):3103-12.

Kaser S, Tatarczyk T, Stadlmayr A, Ciardi C, Röss C, Tschoner A, Sandhofer A, Paulweber B, Ebenbichler CF, Patsch JR. (2008). Effect of obesity and insulin sensitivity on adiponectin isoform distribution. *Eur J Clin Invest.* 38(11):827-34.

Kazda CM, Ding Y, Kelly RP, Garhyan P, Shi C, Lim CN, Fu H, Watson DE, Lewin AJ, Landschulz WH, Deeg MA, Moller DE, Hardy TA. (2016). Evaluation of Efficacy and Safety of the Glucagon Receptor Antagonist LY2409021 in Patients With Type 2 Diabetes: 12- and 24-Week Phase 2 Studies. *Diabetes Care.* 39(7):1241-9.

Kehle MS, Benas JS, Friedma MA. (2004). Obesity. *Enc Appl Psy.*

Kendall DM, Riddle MC, Rosenstock J, Zhuang D, Kim DD, Fineman MS, Baron AD. (2005). Effects of exenatide (exendin- 4) on glycemic control over 30 weeks in patients with type 2 diabetes treated with metformin and a sulfonylurea. *Diabetes Care.* 28, 1083-1091.

Kennell JA and MacDougald OA. (2005). Wnt signaling inhibits adipogenesis through beta-catenin-dependent and –independent mechanisms. *J. Biol. Chem.* 280 24004– 24010.

- Kersten S. (2014). Physiological regulation of lipoprotein lipase. *Biochim Biophys Acta*. 1841(7), pp. 919-33.
- Kieffer TJ, McIntosh CH, Pederson RA. (1995). Degradation of glucose- dependent insulinotropic polypeptide and truncated glucagon-like peptide 1 in vitro and in vivo by dipeptidyl peptidase IV. *Endocrinology*. 136, 3585–3596.
- Kim JW, Tang QQ, Li X, Lane MD. (2007). Effect of phosphorylation and S-S bond-induced dimerization on DNA binding and transcriptional activation by C/EBPbeta. *Proc Natl Acad Sci USA*. 104(6), pp. 1800-4.
- Kim W and Egan JM. (2008). The role of incretins in glucose homeostasis and diabetes treatment. *Pharmacol Rev*. 60:470–512.
- Kimball SR, Siegfried BA, Jefferson LS. (2004). Glucagon represses signaling through the mammalian target of rapamycin in rat liver by activating AMP-activated protein kinase. *J. Biol. Chem*. 279:54103–54109.
- Knoblich JA. (2008). Mechanisms of asymmetric stem cell division. *Cell*. 132(4), pp. 583-97.
- Knudsen Bjerre L, Moller Knudsen S, Wilken M, et al. (2005). Plasma protein binding of NN2211, a long-acting derivative of GLP-1, is important for its efficacy. *Diabetes*. 52 (suppl 1): 321–22.
- Knudsen LB, Nielsen PF, Huusfeldt PO, Johansen NL, Madsen K, Pedersen FZ, Thøgersen H, Wilken M, Agersø H. (2000). Potent derivatives of glucagon-like peptide-1 with pharmacokinetic properties suitable for once daily administration. *J Med Chem*. 4;43(9):1664-9
- Knudsen LB. (2010). Liraglutide: the therapeutic promise from animal models. *J. Clin Pract*. 63 (suppl.167) 4-11.
- Kolterman OG, Buse JB, Fineman MS, Gaines E, Heintz S, Bicsak TA, Taylor K, Kim D, Aisporna M, Wang Y, Baron AD. (2003). Synthetic exendin-4 (exenatide) significantly reduces postprandial and fasting plasma glucose in subjects with type 2 diabetes. *J Clin Endocrinol Metab*. 88(7):3082-9.
- Konishi M, Mikami T, Yamasaki M, Miyake A and Itoh N. (2000). Fibroblast growth factor-16 is a growth factor for embryonic brown adipocytes. *J. Biol. Chem*. 275, 12119–12122.
- Kooijman S, Wang Y, Parlevliet ET, Boon MR, Edelschaap D, Snaterse G, Pijl H, Romijn JA, Rensen PC. (2015). Central GLP-1 receptor signalling accelerates plasma clearance of triacylglycerol and glucose by activating brown adipose tissue in mice. *Diabetologia*. 58:2637–2646.
- Koppen A and Kalkhoven E. (2010). Brown vs white adipocytes: the PPARgamma coregulator story. *FEBS letters*, 584(15), 3250–3259.
- Krampera M, Glennie S, Dyson J, Scott D, Laylor R, Simpson E, Dazzi F. (2003). Bone marrow mesenchymal stem cells inhibit the response of naive and memory antigenspecific T cells to their cognate peptide. *Blood*. 101(9):3722-9.
- Kreier F, Fliers E, Voshol PJ, Van Eden CG, Havekes LM, Kalsbeek A, Van Heijningen CL, Sluiter AA, Mettenleiter TC, Romijn JA, Sauerwein HP, Buijs RM. (2002). Selective parasympathetic innervation of subcutaneous and intra-abdominal fatfunctional implications. *J Clin Invest*. 110(9):1243-50.
- Kuhbier JW, Weyand B, Sorg H, Radtke C, Vogt PM, Reimers K. (2010). Stem cells from fatty tissue : A new resource for regenerative medicine?. *Chirurg*. (9):826-32.

- Kuroshima A, Yahata T. (1979). Thermogenic responses of brown adipocytes to noradrenaline and glucagon in heat-acclimated and cold-acclimated rats. *Jpn. J. Physiol.* 29:683–690.
- Kuryszko J, Sławuta P, Sapikowski G. (2016). Secretory function of adipose tissue. *Polish Journal of Veterinary Science* Vol. 19, 441-446.
- Kwon H, Pessin JE. (2013). Adipokines mediate inflammation and insulin resistance. *Front Endocrinol (Lausanne)*. 4, pp. 71.
- Lafontan M and Berlan M. (1993). Fat cell adrenergic receptors and the control of white and brown fat cell function. *J Lipid Res* 34: 1057-1091.
- Lafontan M and Langin D. (2009). Lipolysis and lipid mobilization in human adipose tissue. *Progress in Lipid Research* 48 275–297.
- Lago F, Dieguez C, Gómez-Reino J, Gualillo O. (2007). The emerging role of adipokines as mediators of inflammation and immune responses. *Cytokine Growth Factor Rev.* 18(3-4):313-25.
- Langin D, Arner P. (2006). Importance of TNFalpha and neutral lipases in human adipose tissue lipolysis. *Trends Endocrinol Metab.* 17(8), pp. 314-20.
- Larsen PJ, Tang-Christensen M, Holst JJ, Orskov C. (1997). Distribution of glucagon-like peptide-1 and other proglucagon-derived peptides in the rat hypothalamus and brainstem. *Neuroscience.* Mar;77(1):257-70.
- Laudes M. (2011). Role of WNT signaling in the determination of human mesenchymal stem cells into preadipocytes. *Journal of Molecular Endocrinology.* 46,R65-R72.
- Laurent S. R. e S. Vinter. (2010). *Fas in Fat: How Obesity Threatens American Future*, Trust for America's Health.
- Lazar MA. (2008). Developmental biology. How now, brown fat? *Science.* 321(5892), pp. 1048-9.
- Lean ME, James WP, Jennings G, Trayhurn P. (1986). Brown adipose tissue in patients with pheochromocytoma. *Int J Obes.* 10:219– 227.
- Lee P, Linderman JD, Smith S, Brychta RJ, Wang J, Idelson C, Perron RM, Werner CD, Phan GQ, Kammula US, Kebebew E, Pacak K, Chen KY, Celi FS. (2014). Irisin and FGF21 are cold-induced endocrine activators of brown fat function in humans. *Cell Metab.* 4;19(2):302-9.
- Lee S and Lee BY. (2017). Glucagon-like peptide-1 and glucagon-like peptide-1 receptor agonists in the treatment of type 2 diabetes. *Ann Pediatr Endocrinol Metab.* 22(1): 15–26
- Lee HM, Joo BS, Lee CH, Kim HY, Ock JH, Lee YS (2015). Effect of Glucagon-like Peptide-1 on the Differentiation of Adipose-derived Stem Cells into Osteoblasts and Adipocytes. *Journal of menopausal medicine.* 21(2), 93–103.
- Li HX, Xiao L, Wang C, Gao JL, Zhai YG. (2010). Epigenic regulation of adipocyte differentiation and adipogenesis. *J Zhejiang Univ-Sci B (Biomed & Biotechnol).* 11(10): 784-791.
- Li M, Li S, Li Y. (2015). Liraglutide Promotes Cortical Neurite Outgrowth via the MEK-ERK Pathway. *Cell Mol Neurobiol,* 35(7):987-93.

- Li Z, Bowerman S, Heber D. (2005). Health ramifications of the obesity epidemic. *Surg Clin North Am.* (4):681-701.
- Liu L, Li YY, Tollefsbol T. (2008). Gene-environment interactions and epigenetic basis of human disease. *Curr. Issue MOL BIOL.* 10 (1): 25-36.
- Liu ZJ, Zhuge Y and Velazquez OC. (2009). Trafficking and differentiation of mesenchymal stem cells. *J Cell Biochem.* 106(6), pp. 984-91.
- Livak KJ, Schmittgen TD. (2001). Analysis of relative gene expression data using realtime quantitative PCR and the  $2^{-\Delta\Delta C(T)}$  Method. *Methods.* 25(4):402- 8.
- Lockie SH, Heppner KM, Chaudhary N, Chabenne JR, Morgan DA, Veyrat-Durebex C, Ananthakrishnan G, Rohner-Jeanrenaud F, Drucker DJ, DiMarchi R, Rahmouni K, Oldfield BJ, Tschöp MH, et al. (2012). Direct control of brown adipose tissue thermogenesis by central nervous system glucagon-like peptide-1 receptor signaling. *Diabetes.* 61:2753–2762.
- Logan CY, Nusse R. (2004). The Wnt signaling pathway in development and disease. *Annu Rev Cell Dev Biol.* 20:781-810.
- Long SD, O'Brien K, MacDonald KG Jr, Leggett-Frazier N, Swanson MS, Pories WJ, Caro JF. (1994). Weight loss in severely obese subjects prevents the progression of impaired glucose tolerance to type II diabetes. A longitudinal interventional study. *Diabetes Care.* 17(5):372-5
- Lowe CE, O'Rahilly S, Rochford JJ. (2011). Adipogenesis at a glance. *J Cell Sci.* 15;124(Pt 16):2681-6.
- Luconi M, Cantini G and Serio M. (2010). Peroxisome proliferator-activated receptor gamma (PPAR $\gamma$ ): Is the genomic activity the only answer? *Steroids.* 75(8-9) 585-94.
- Luo L and Liu M. (2016). Adipose tissue in control of metabolism. *J Endocrinol,* 231(3), pp. R77-R99.
- Lyer A., Fairlie D.P., Prins J.B., Hammock D.B. and Brown L. (2010). Inflammatory lipid mediators in adipocyte function and obesity. *NAv Rev. Endocrinol.* 6, 71-82.
- MacKeygus PM, Shah B, Marmot MG. (1991). Relation of central obesity and insulin resistance with high diabetes prevalence and cardiovascular risk in South Asians. *Lancet* 337:382.
- Maeda N, Shimomura I, Kishida K, Nishizawa H, Matsuda M, Magaretani H, Furuyama N, Kondo H, Takahashi M, Arita Y, Komuro R, Ouchi N, Kihara S, Tochino Y, Okutomi K, Horie M, Takeda S, Aoyama T, Funahashi T, Matsuzawa Y. (2002). Diet-induced insulin resistance in mice lacking adiponectin/ACRP30. *Nat Med,* 8(7): 731-737.
- Maggard-Gibbons M, Maglione M, Livhits M, Ewing B, Maher AR, Hu J, Li Z, Shekelle PG. (2013). Bariatric surgery for weight loss and glycemic control in nonmorbidly obese adults with diabetes: a systematic review. *JAMA.* 5;309(21):2250-61.
- Mannucci E. (2008). Gli inibitori della DPP-4 e gli incretino-mimetici. *Collana Editoriale AMD.*
- Marchetti P, Del Guerra S, Marselli L, Lupi R, Masini M, Pollera M, Bugliani M, Boggi U, Vistoli F, Mosca F, Del Prato S. (2004). Pancreatic islets from type 2 diabetic patients have functional defects and increased apoptosis that are ameliorated by metformin. *J Clin Endocrinol Metab.* 89(11):5535-41.
- Martin JR, Novin D. (1997). Decreased feeding in rats following hepatic-portal infusion of glucagon. *Physiol. Behav.* 19:461–466.



- Martina I. Lefterova, Anders K. Haakonsson, Mitchell A. Lazar, Susanne Mandrup. (2014). PPAR $\gamma$  and the global map of adipogenesis and beyond. *Trends in Endocrinology and Metabolism*. Vol.25, No.6: 294–302.
- Mayo KE, Miller LJ, Bataille D, Dalle S, Göke B, Thorens B, Drucker DJ. (2003). International Union of Pharmacology. XXXV. The glucagon receptor family. *Pharmacol Rev*. 2003 Mar;55(1):167-94.
- McIntosh K, Zvonic S, Garrett S, Mitchell JB, Floyd ZE, Hammill L, Kloster A, Di Halvorsen Y, Ting JP, Storms RW, Goh B, Kilroy G, Wu X, Gimble JM. (2006). The immunogenicity of human adipose-derived cells: temporal changes in vitro. *Stem Cells*. 24 (5): 1246-53.
- Meier JJ, Kjems LL, Veldhuis JD, Lefèbvre P, Butler PC. (2006). Postprandial suppression of glucagon secretion depends on intact pulsatile insulin secretion: further evidence for the inraislelet insulin hypothesis. *Diabetes* 55: 1051–1056.
- Meier C, Schwartz AV, Egger A, Lecka-Czernik B. (2016). Effects of diabetes drugs on the skeleton. *Bone*. 82:93-100.
- Mikhail N. (2014). Effects of incretin-based therapy in patients with heart failure and myocardial infarction. *Endocrine*. Vol.47:21-28.
- Min S, Kady J, Nam M, Rojas-Rodriguez R, Berkenwald A, Kim JH, Noh H, Kim JK, Cooper M, Fitzgibbons T, Brehm M and Corvera S. (2015). Human brite/beige adipocytes develop from capillary networks, and their implantation improves metabolic homeostasis in mice. *Nat Med*. vol 22 312-20.
- Monami M, Dicembrini I, Marchionni N, Rotella CM, Mannucci E. (2012). Effects of glucagon-like peptide-1 receptor agonists on body weight: a meta-analysis. *Exp Diabetes Res*. 2012:672658.
- Moon Randall T., Bruce Bowerman, Michael Boutros, Norbert Perrimon. (2002). The Promise and Perils of Wnt Signaling Through b-Catenin.VOL 296 SCIENCE.
- More VR, Lao J, McLaren DG, Cumiskey AM, Murphy BA, Chen Y, Previs S, Stout S, Patel R, Satapati S, Li W, Kowalik E, Szeto D, Nawrocki A, Poci A, Wang L, Carrington P. (2017). Glucagon like receptor 1/glucagon dual agonist acutely enhanced hepatic lipid clearance and suppressed de novo lipogenesis in mice. *PLoS One*. 12(10).
- Morrison SJ, Kimble J. (2006) Asymmetric and symmetric stem-cell divisions in development and cancer. *Nature*. 441(7097):1068-74.
- Nair KS, welle SL, Halliday D, Campbell RG (1988). Effect of beta-hydroxybutyrate on whole-body leucine kinetics and fractional mixed skeletal muscle protein synthesis in humans. *J. Clin. Invest*. 82:198–205.
- Nauck M, Stockmann F, Ebert R, Creutzfeldt W. (1986). Reduced incretin effect in type 2 (non-insulin-dependent) diabetes. *Diabetologia*. 29: 46-52.
- Nedergaard J, Bengtsson T and Cannon B. (2010). Three years with adult human brown adipose tissue. *Ann N Y Acad Sci*, no. Nov; 1212, pp. 20-36.
- Nedergaard J, Petrovic N, Lindgren EM, Jacobsson A, Cannon B. (2005). PPAR $\gamma$  in the control of brown adipocyte differentiation. *Biochim Biophys Acta* 1740: 293-304.
- Newmann, B, Selby JV, King MC, Shemenda C, Fabsitz R, Friedman GD. (1987). Concordance for type 2 (non-insulin-dependent) diabetes mellitus in male twins. *Diabetologia*. 30:763-8.

Niswender K, Pi-Sunyer X, Buse J, Jensen KH, Toft AD, Russell-Jones D, Zinman B. (2013). Weight change with liraglutide and comparator therapies: an analysis of seven phase 3 trials from the liraglutide diabetes development programme. *Diabetes Obes Metab.* Jan;15(1):42-54.

Noyan-Ashraf MH, Momen MA, Ban K, Sadi AM, Zhou YQ, Riazi AM, Baggio LL, Henkelman RM, Husain M, Drucker DJ. (2009). GLP-1R agonist liraglutide activates cytoprotective pathways and improves outcomes after experimental myocardial infarction in mice. *Diabetes.* 58(4):975-83.

Nyberg J, Anderson MF, Meister B, Alborn AM, Ström AK, Brederlau A, Illerskog AC, Nilsson O, Kieffer TJ, Hietala MA, Ricksten A, Eriksson PS. (2005). Glucose-dependent insulinotropic polypeptide is expressed in adult hippocampus and induces progenitor cell proliferation. *J Neurosci.* 16;25(7):1816-25.

Oh DK, Ciaraldi T, Henry RR. (2007). Adiponectin in health and disease. *Diabetes Obes Metab.* 9: 282-9.

Ohno H, Shinoda K, Spiegelman BM, Kajimura S. (2012). PPAR $\gamma$  agonists induce a white-to-brown fat conversion through stabilization of PRDM16 protein. *Cell Metab.* 15: 395-404.

Oren DA, Wei Y, Skrabanek L, Chow BK, Mommsen T, Mojsov S. (2016). Structural Mapping and Functional Characterization of Zebrafish Class B G-Protein Coupled Receptor (GPCR) with Dual Ligand Selectivity towards GLP-1 and Glucagon. *PloS one.* 11(12), e0167718.

Otto, T. C. and Lane, M. D. (2005). Adipose development: from stem cell to adipocyte. *Crit Rev Biochem Mol Biol.* 40(4), pp. 229-42.

Paloyan E, Harper PV Jr. (1961). Glucagon as a regulating factor of plasma lipids. *Metabolism.* 10:315–323.

Park A, Kim VK, Bae KH. (2014). Distinction of white, beige and brown adipocytes derived from mesenchymal stem cells. *World Journal of stem cells.* 6(1): 33-42.

Parkes DG, Pittner R, Jodka C, Smith P, Young A. (2001). Insulinotropic actions of exendin-4 and glucagon-like peptide-1 in vivo and in vitro. *Metabolism.* 50: 583-589.

Pei D. (2009). Regulation of pluripotency and reprogramming by transcription factors. *J Biol Chem.* 284(6):3365-9.

Pénicaud L, Cousin B, Leloup C, Lorsignol A, Casteilla L. (2009). The autonomic nervous system, adipose tissue plasticity, and energy balance. *Nutrition.* 16(10):903-8

Penick SB, Hinkle LE Jr. (1961). Depression of food intake induced in healthy subjects by glucagon. *N. Engl. J. Med.* 264:893–897.

Perea A, Clemente F, Martinell J, villanueva-Peñacarrillo ML, Valverde I. (1995). Physiological effect of glucagon in human isolated adipocytes. *Horm. Metab. Res.* 27:372–375.

Perry IJ, Wannamethee SG, Walker MK, et al. (1995). Prospective studies of risk factors for development of non insulin-dependent diabetes mellitus. *Br Med J.* 310:560.

Petrovic N, Walden TB, Shabalina IG, Timmons JA, Cannon B, Nedergaard, J. (2010). Chronic peroxisome proliferator-activated receptor gamma (PPAR $\gamma$ ) 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(10), 7153–7164.

Piesterzeniewicz K, Łuczak K, Komorowski J, Maciejewski M, Jankiewicz Wika J, Goch JH. (2008). Resistin increases with obesity and atherosclerotic risk factors in patients with myocardial infarction. *Metabolism*. 57(4), pp. 488-93.

Piro S, Purrello F. (2008). Il ruolo delle alfa e delle beta-cellule nel diabete mellito di tipo 2. Collana Editoriale AMD.

Pittenger MF, Mackay AM, Beck SC, Jaiswal RK, Douglas R, Mosca JD, Moorman MA, Simonetti DW, Craig S, Marshak DR. (1999). Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells. *Science*. 284(5411):143-7

Pocai A, Carrington PE, Adams JR, Wright M, Eiermann G, Zhu L, Du X, Petrov A, Lassman ME, Jiang G, Liu F, Miller C, Tota LM, Zhou G, Zhang X, Sountis MM, Santoprete A, Capito' E, Chicchi GG, Thornberry N, Bianchi E, Pessi A, Marsh DJ, SinhaRoy R. (2009). Glucagon-like peptide 1/glucagon receptor dual agonism reverses obesity in mice. *Diabetes*. 58(10):2258-66.

Polonsky KS, Given BD, Hirsch LJ, Tillil H, Shapiro ET, Beebe C, Frank BH, Galloway JA, Van Cauter E. (1988). Abnormal patterns of insulin secretion in non-insulin-dependent diabetes mellitus. *N Engl J Med*. 318(19):1231-9.

Pond C. (2001). Ecology of storage and al location of resources: animals. In: *Encyclopedia of Life Sciences*. Chichester, UK: John Wiley & Sons; p. 1-5.

Pountos, I. and Giannoudis, P. V. (2005). Biology of mesenchymal stem cells. *Injury*, 36 Suppl 3. pp. S8-S12.

Pratley RE, Weyer C. (2001). The role of impaired early insulin secretion in the pathogenesis of type II diabetes mellitus. *Diabetologia*. 44:929-45.

Qian SW, Tang Y, Li X, Liu Y, Zhang YY, Huang HY, Xue RD, Yu HY, Guo L, Gao HD, Liu Y, Sun X, Li YM, Jia WP, Tang QQ. (2013). BMP4-mediated brown fat-like changes in white adipose tissue alter glucose and energy homeostasis. *Proc Natl Acad Sci USA*. 110: E798-E807.

Rachman J, Barrow BA, Levy JC, Turner RC. (1997). Near-normalisation of diurnal glucose concentrations by continuous administration of glucagon-like peptide-1 (GLP-1) in subjects with NIDDM. *Diabetologia*. 40: 205-211.

Ràfols ME. (2014). Adipose tissue: cell heterogeneity and functional diversity. *Endocrinol. Nutr*. 61 (2): 100-112.

Rajala MW, Scherer PE. (2003). Minireview: The adipocyte--at the crossroads of energy homeostasis, inflammation, and atherosclerosis. *Endocrinology*. 144(9):3765-73.

Ratajczak MZ, Zuba-Surma EK, Wysoczynski M, Wan W, Ratajczak J, Wojakowski W and Kucia M. (2008). Hunt for pluripotent stem cell-regenerative medicine search for almighty cell. *J Autoimmun*. 30(3), pp. 151-62.

Rial E, Gonzalez-Barroso MM. (2001). Physiological regulation of the transport activity in the uncoupling proteins UCP1 and UCP2. *Biochim Biophys Acta*. 1504:70 – 81.

Richards, P. et al. (2014). Identification and characterization of GLP-1 receptor-expressing cells using a new transgenic mouse model. *Diabetes*. 63, 1224–1233.

Richter WO, Robl H, Schwandt P. (1989). Human glucagon and vasoactive intestinal polypeptide (VIP) stimulate free fatty acid release from human adipose tissue in vitro. *Peptides*. 10:333– 335.

Ricquier D, Nechad M, Mory G. (1982). Ultrastructural and biochemical characterization of human brown adipose tissue in pheochromocytoma. *J Clin Endocrinol Metab*. 54:803–807.

Rosati P, Colombo R. (1997). *I tessuti*. ed. Edi.Ermes.

Rosen ED, Hsu CH, Wang X, Sakai S, Freeman MW, Gonzalez FJ, Spiegelman BM. (2002). C/EBPalpha induces adipogenesis through PPARGgamma: a unified pathway. *Genes Dev*. 1;16(1):22-6.

Rosen, ED and MacDougald OA (2006). Adipocyte differentiation from the inside out. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 7(12), pp. 885-96.

Rosenwald M, Perdikari A, Rüllicke T, Wolfrum C. (2013). Bi-directional interconversion of brite and white adipocytes. *Nat Cell Biol*. 15: 659-667.

Ross DA, Rao PK, Kadesch T. (2004). Dual roles for the Notch target gene Hes-1 in the differentiation of 3T3-L1 preadipocytes. *Mol Cell Biol*. 24(8):3505-13.

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

Runge S, Thøgersen H, Madsen K, Lau J, Rudolph R. (2008). Crystal structure of the ligand-bound glucagon-like peptide-1 receptor extracellular domain. *J Biol Chem*. 25;283(17):11340-7.

Salem V, Izzi-Engbeaya C, Coello C, Thomas DB, Chambers ES, Comninou AN, Buckley A, Win Z, Al-Nahhas A, Rabiner EA, Gunn RN, Budge H, Symonds ME, Bloom SR, Tan TM, Dhillo WS. (2016). Glucagon increases energy expenditure independently of brown adipose tissue activation in humans. *Diabetes Obes Metab*. 18(1):72-81.

Salter JM, Ezrin C, Laidlaw JC, Gornall AG. (1960). Metabolic effects of glucagon in human subjects. *Metabolism*. 9:753–768.

Sánchez-Garrido MA, Brandt SJ, Clemmensen C, Müller TD, DiMarchi RD, Tschöp MH. (2017). GLP-1/glucagon receptor co-agonism for treatment of obesity. *Diabetologia*. 60(10):1851-1861.

Sancho V, Trigo MV, Martín-Duce A, Gonz Lez N, Acitores A, Arnés L, Valverde I, Malaisse WJ, Villanueva-Peñacarrillo ML. (2006). Effect of GLP-1 on D-glucose transport, lipolysis and lipogenesis in adipocytes of obese subjects. *Int J Mol Med*. 17(6):1133-7.

Sandoval D, D'Alessio D. (2015). Physiology of proglucagon peptides: role of glucagon and glp-1 in health and disease. *Physiol Rev* 95: 513–548.

Sanz C, Vázquez P, Blázquez C, Barrio PA, Alvarez M, Blázquez, E. (2010). Signaling and biological effects of glucagon-like peptide 1 on the differentiation of mesenchymal stem cells from human bone marrow. *American journal of physiology. Endocrinology and metabolism*. 298(3), E634–E643.

Savino F, Petrucci E and Nanni G. (2008). Adiponectin: an intriguing hormone for paediatricians. *Acta Paediatr*. 97(6), pp. 701-5.

Scarpellini E and Tack J. (2012). Obesity and Metaboli Syndrome: An inflammatory Condition. *Dig Dis*; 30: 148-153.

Schondorf T, Maiworm A, Emmison N, Forst T, Pflutzner A. (2005). Biological background and role of adiponectin as marker for insulin resistance and cardiovascular risk. *Clin Lab*. 51: 489-494.

Sciaudone M, Gazzero E, Priest L, Delany AM, Canalis E. (2003). Notch 1 impairs osteoblastic cell differentiation. *Endocrinology*. 144(12):5631-9.

Sethi JK, Hotamisligil GS. (1999). The role of TNF alpha in adipocyte metabolism. *Semin Cell Dev Biol*, 10(1):19-29.

Sharp LZ, Shinoda K, Ohno H, Scheel DW, Tomoda E, Ruiz L, Hu H, Wang L, Pavlova Z, Gilsanz V, Kajimura S. (2012). Human BAT possesses molecular signatures that resemble beige/ brite cells. *PLoS One*. 7: e49452.

Smith SR. (1996). The endocrinology of obesity. *Endocrinol Metab Clin North Am*. 25(4):921-42.

Smith PJ, Wise LS, Berkowitz R, Wan C & Rubin CS. (1988). Insulin-like growth factor-I is an essential regulator of the differentiation of 3T3-L1 adipocytes. *J. Biol. Chem*. 263, 9402–9408.

Smith SJ, Cases S, Jensen DR, Chen HC, Sande E, Tow B, Sanan DA, Raber J, Eckel RH and Farese RV. (2000). Obesity resistance and multiple mechanisms of triglyceride synthesis in mice lacking Dgat. *Nat Genet*. 25(1), pp. 87-90.

Smorlesi A, Frontini A, Giordano A, Cinti S. (2012). The adipose organ: white-brown adipocyte plasticity and metabolic inflammation. *Obes Rev*. 13 Suppl 2, pp. 83-96.

Soni, H. (2016). Peptide-based GLP-1/glucagon co-agonists: a double-edged sword to combat diabetes. *Medical Hypotheses* 95:5-9 .

Sonne DP, Engstrøm T, Treiman M. (2008). Protective effects of GLP-1 analogues exendin-4 and GLP-1(9-36) amide against ischemia-reperfusion injury in rat heart. *Regul Pept*. 146(1-3):243-9.

Sørensen H, Winzell MS, Brand CL, Fosgerau K, Gelling RW, Nishimura E, Ahren B. (2006). Glucagon receptor knockout mice display increased insulin sensitivity and impaired beta-cell function. *Diabetes*. 55(12):3463-9.

Spalding KL, Arner E, Westermark PO, Bernard S, Buchholz BA, Bergmann O, Blomqvist L, Hoffstedt J, Näslund E, Britton T, Concha H, Hassan M, Rydén M, Frisén J, Arner P. (2008). Dynamics of fat cell turnover in humans. *Nature*. 453(7196), pp. 783-7.

Sterodimas A, de Faria J, Nicaretta B, Pitanguy I. (2010). Tissue engineering with adipose-derived stem cells (ADSCs): current and future applications. *J Plast Reconstr Aesthet Surg*. 63: 1886–1892.

Strioga M, Viswanathan S, Darinkas A, Slaby O, Michalek J. (2012). Same or not the same? Comparison of adipose tissue-derived versus bone marrow-derived mesenchymal stem and stromal cells. *Stem Cells Dev*. 2724–2752.

Stunkard AJ, van Itallie TB, Reis BB. (1955). The mechanism of satiety: effect of glucagon on gastric hunger contractions in man. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med*. 89:258–261.

Suh JM, Gao X, McKay J, McKay R, Salo Z and Graff JM. (2006). Hedgehog signaling plays a conserved role in inhibiting fat formation. *Cell Metab*. 3 25–34.

Takemura Y, Ouchi N, Shibata R, Aprahamian T, Kirber MT, Summer RS, Kihara S, Walsh K. (2007). Adiponectin modulates inflammatory reactions via calreticulin receptor-dependent clearance of early apoptotic bodies. *J Clin Invest.* 117(2):375-86.

Tamori Y, Masugi J, Nishino N and Kasuga M. (2002). Role of peroxisome proliferator-activated receptor-gamma in maintenance of the characteristics of mature 3T3-L1 adipocytes. *Diabetes* 51 2045-2055.

Tang QQ, Otto TC and Lane MD. (2004). Commitment of C3H10T1/2 pluripotent stem cells to the adipocyte lineage. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 101 9607–9611.

Tang QQ and Lane MD. (2012). Adipogenesis: from stem cell to adipocyte. *Annu Rev Biochem.* 81, pp. 715-36.

Tchkonia T, Giorgadze N, Pirtskhalava T, Thomou T, DePonte M, Koo A, Forse RA, Chinnappan D, Martin-Ruiz C, von Zglinicki T, Kirkland JL (2006). Fat depot-specific characteristics are retained in strains derived from single human preadipocytes. *Diabetes.* 55(9):2571-8.

Tchkonia T, Tchoukalova YD, Giorgadze N, Pirtskhalava T, Karagiannides I, Forse RA, Koo A, Stevenson M, Chinnappan D, Cartwright A, Jensen MD, Kirkland JL. (2005). Abundance of two human preadipocyte subtypes with distinct capacities for replication, adipogenesis, and apoptosis varies among fat depots. *Am J Physiol Endocrinol Metab.* 288(1):E267-77.

Tews D, Wabitsch M. (2011). Renaissance of brown adipose tissue. *Horm Res Paediatr.* 75(4):231-9.

Thompson A, Kanamarlapudi V. (2014). The regions within the N-terminus critical for human glucagon like peptide-1 receptor (hGLP-1R) cell surface expression. *Sci Rep.* 15;4:7410.

Thorens B. (1992). Expression cloning of the pancreatic beta cell receptor for the gluco-incretin hormone glucagon-like peptide 1. *Proc Natl Acad Sci USA.* Sep 15;89(18):8641-5.

Tilg H, Moschen AR. (2006). Adipocytokines: mediators linking adipose tissue, inflammation and immunity. *Nat Rev Immunol.* 6(10): 772-783.

Timmons JA, Wennmalm K, Larsson O, Walden TB, Lassmann T, Petrovic N, et al. (2007). Myogenic gene expression signature establishes that brown and white adipocytes originate from distinct cell lineages. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 104:4401- 16.

Toft-Nielsen MB, Damholt MB, Madsbad S, Hilsted LM, Hughes TE, Michelsen BK, Holst JJ. (2001). Determinants of the impaired secretion of glucagon-like peptide-1 in type 2 diabetic patients. *J Clin Endocrinol Metab.* 86: 3717-3723.

Tomlinson E, Fu L, John L, Hultgren B, Huang X, Renz M, Stephan JP, Tsai SP, Powell-Braxton L, French D and Stewart TA. (2002). Transgenic mice expressing human fibroblast growth factor-19 display increased metabolic rate and decreased adiposity. *Endocrinology.* 143, 1741–1747.

Tong Q, Tsai J, Tan G, Dalgin G and Hotamisligil GS. (2005). Interaction between GATA and the C/EBP family of transcription factors is critical in GATA-mediated suppression of adipocyte differentiation. *Mol. Cell. Biol.* 25 706–715.

Tontonoz P, Hu E, Graves RA, Budavari AI, Spiegelman BM. (1994). mPPAR gamma 2: tissue-specific regulator of an adipocyte enhancer. *Genes Dev.* 8(10):1224-34.

Tontonoz P, Spiegelman BM. (2008). Fat and beyond: the diverse biology of PPAR $\gamma$ . *Annu. Rev. Biochem.* 77, 289-312.

Townsend K, Tseng YH. (2012). Brown adipose tissue: Recent insights into development, metabolic function and therapeutic potential. *Adipocyte.* 1;1(1):13-24.

Trayhurn P, Wood IS. (2004). Adipokines: Inflammation and the pleiotropic role of white adipose tissue. *Br J Nutr.* 92:347–355.

Trayhurn P., Hoggard N., Mercer J.G., Rayner D.V. (1999). Leptin: fundamental aspects. *International Journal of Obesity*, 23:22-28.

Trayhurn P., Hoggard N., Rayner D.V. (2001). White adipose tissue as a secretory and endocrine organ: Leptin and other secreted proteins. In *Adipose Tissue* [S Klaus, editor]. Austin, TX: Landes Bioscience.

Tschöp MH, Finan B, Clemmensen C, Gelfanov V, Perez-Tilve D, Müller TD, DiMarchi RD. (2016). Unimolecular Polypharmacy for Treatment of Diabetes and Obesity. *Cell Metab.* 12;24(1):51-62.

Ugleholdt R, Poulsen ML, Holst PJ, Irminger JC, Orskov C, Pedersen J, Rosenkilde MM, Zhu X, Steiner DF, Holst JJ. (2006). Prohormone convertase 1/3 is essential for processing of the glucose-dependent insulinotropic polypeptide precursor. *J Biol Chem.* 281:11050–11057.

Um JH, Park SJ, Kang H, Yang S, Foretz M, McBurney MW, Kim MK, Viollet B, Chung JH. (2010). AMP-activated protein kinase-deficient mice are resistant to the metabolic effects of resveratrol. *Diabetes.* 59(3):554-63.

Valverde I, Morales M, Clemente F, López-Delgado MI, Delgado E, Perea A, Villanueva-Peñacarrillo ML. (1994). Glucagon-like peptide 1: a potent glycogenic hormone. *FEBS Lett.* 349(2):313-6.

Van Genugten RE, Möller-Goede DL, van Raalte DH, Diamant M. (2013). Extrapropancreatic effects of incretin-based therapies: potential benefit for cardiovascular-risk management in type 2 diabetes. *Diabetes Obes Metab.* 15(7):593-606

Vázquez-Vela ME, Torres N, Tovar AR. (2008). White adipose tissue as endocrine organ and its role in obesity. *Arch Med Res.* 39(8):715-28.

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

Villanueva-Peñacarrillo ML, Martín-Duce A, Ramos-Álvarez I, Gutiérrez-Rojas I, Moreno P, Nuche-Berenguer B, Acitores A, Sancho V, Valverde I, González N. (2011). Characteristic of GLP-1 effects on glucose metabolism in human skeletal muscle from obese patients. *Regul Pept.* 168(1-3):39-44.

Villarroya F and Vidal-Puig A. (2013). Beyond the sympathetic tone: the new brown fat activators. *Cell Metab.* 17: 638-643.

Vilsboll T, Krarup T, Madsbad S, Holst JJ. (2002). Defective amplification of the late phase insulin response to glucose by GIP in obese Type II diabetic patients. *Diabetologia* 45: 1111-1119.

Vilsboll T, Zdravkovic M, Le-Thi T, et al. (2006). Liraglutide significantly improves glycemic control, and lowers body weight without risk of either major or minor hypoglycemic episodes in subjects with type 2 diabetes. *Diabetes.* 55 (suppl 1): 27-28 (abstr 115–OR ).

Vons C, Pegorier JP, Girard J, Kohl C, Ivanov MA, Franco D. (1991). Regulation of fatty-acid metabolism by pancreatic hormones in cultured human hepatocytes. *Hepatology*. 13(6):1126-30.

Vrang N, Larsen PJ. (2010). Preproglucagon derived peptides GLP-1, GLP-2 and oxyntomodulin in the CNS: role of peripherally secreted and centrally produced peptides. *Prog Neurobiol*. (3):442-62.

Waldén TB, Hansen IR, Timmons JA, Cannon B, Nedergaard J. (2012). Recruited vs. nonrecruited molecular signatures of brown, “brite,” and white adipose tissues. *Am J Physiol Endocrinol Metab*. 302: E19-E31.

Walston J, Silver K, Bogardus C, Knowler WC, Celi FS, Austin S, Manning B, Strosberg AD, Stern MP, Raben N, et al. (1995). Time of onset of non-insulin-dependent diabetes mellitus and genetic variation in the beta 3-adrenergic-receptor gene. *N Engl J Med*. 333(6):343-7.

Wang EA, Israel DI, Kelly S and Luxenberg DP. (1993). Bone morphogenetic protein-2 causes commitment and differentiation in C3H10T1/2 and 3T3 cells. *Growth Factors*. 9, 57–71.

Wang K, Xue T, Tsang SY, Van Huizen R, Wong CW, Lai KW, Ye Z, Cheng L, Au KW, Zhang J, Li GR, Lau CP, Tse HF, Li RA. (2005). Electrophysiological properties of pluripotent human and mouse embryonic stem cells. *Stem Cells*. 23,1526– 1534.

Wang P, Mariman E, Renes J, Keijzer J. (2008). The secretory function of adipocytes in the physiology of white adipose tissue. *J Cell Physiol*. 16(1):3-13.

Wang QA and Scherer PE. (2016). Human beige adipocytes: epiphenomenon or drivers of metabolic improvements? *Trends Endocrinol Metab*. 27(5): 244-46.

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

Warram, JH , Rich SS, Kowalewski AS. (1995). Epidemiology and genetics of diabetes mellitus. In: Kahn CR, Weir GC, editors. *Joslin’s diabetes mellitus*. Philadelphia: Lea and Febiger. pp. 201-16.

Wei Y, Mojsos S. (1995). Tissue-specific expression of the human receptor for glucagon-like peptide-I: brain, heart and pancreatic forms have the same deduced amino acid sequences. *FEBS Lett*. 358(3):219-24.

Weyer C, Bogardus C, Mott DM, Pratley RE. (1999). The natural history of insulin secretory dysfunction and insulin resistance in the pathogenesis of type 2 diabetes mellitus. *J Clin Invest*. 104:787-94.

Whalley NM, Pritchard LE, Smith DM, & White A. (2011). Processing of proglucagon to GLP-1 in pancreatic  $\alpha$ -cells: is this a paracrine mechanism enabling GLP-1 to act on  $\beta$ -cells?. *The Journal of endocrinology*. 211(1), 99–106.

Whitaker GM, Lynn FC, McIntosh CH, Accili EA. (2012). Regulation of GIP and GLP1 receptor cell surface expression by N-glycosylation and receptor heteromerization. *PLoS One*. 7(3):e32675.

Whittle AJ, Carobbio S, Martins L, Slawik M, Hondares E, Vázquez MJ, Morgan D, Csikasz RI, Gallego R, Rodríguez-Cuenca S, Dale M, Virtue S, Villarroya F, Cannon B, Rahmouni K, López M, Vidal-Puig A. (2012). BMP8B increases brown adipose tissue thermogenesis through both central and peripheral actions. *Cell*. 149: 871-885.

Who. (2003). Obesity and overweight, Fact sheet N°311 Updated March.



- Willert K, Brown JD, Danenberg E, Duncan AW, Weissman IL, Reya T, Yates JR and Nusse R. (2003). Wnt proteins are lipid-modified and can act as stem cell growth factors. *Nature*. 423(6938), pp. 448-52.
- Wright WS, Longo KA, Dolinsky VW, Gerin I, Kang S, Bennett CN, Chiang SH, Prestwich TC, Gress C, Burant CF, Susulic VS and MacDougald OA (2007). Wnt10b inhibits obesity in ob/ob and agouti mice. *Diabetes*. 56(2), pp. 295-303.
- Wu J, Boström P, Sparks LM, Ye L, Choi JH, Giang AH, Khandekar M, Virtanen KA, Nuutila P, Schaart G, Huang K, Tu H, van Marken Lichtenbelt WD, Hoeks J, Enerbäck S, Schrauwen P, Spiegelman BM. (2012). Beige adipocytes are a distinct type of thermogenic fat cell in mouse and human. *Cell*. 150: 366-376.
- Wu Z, Bucher NL, Farmer SR. (1996). Induction of peroxisome proliferator-activated receptor gamma during the conversion of 3T3 fibroblasts into adipocytes is mediated by C/EBP-beta, C/EBP-delta, and glucocorticoids. *Mol Cell Biol*. 64:251–260.
- Xu F, Lin B, Zheng X, Chen Z, Cao H, Xu H, Liang H, Weng J. (2016). GLP-1 receptor agonist promotes brown remodelling in mouse white adipose tissue through SIRT1. *Diabetologia*. 59(5):1059-69.
- Xu H, Barnes GT, Yang Q, Tan G, Yang D, Chou CJ, Sole J, Nichols A, Ross JS, Tartaglia LA, Chen H. (2003). Chronic inflammation in fat plays a crucial role in the development of obesity-related insulin resistance. *J Clin Invest*. 112:1821–1830.
- Yahata T, Habara Y, Kuroshima A. (1983). Effects of glucagon and noradrenaline on the blood flow through brown adipose tissue in temperature-acclimated rats. *Jpn. J. Physiol*. 33:367–376.
- Yamada Y, Tsukiyama K, Sato T, Shimizu T, Fujita H, Narita T. (2016). Novel extrapancreatic effects of incretin. *J Diabetes Investig*. 7(Suppl 1): 76–79.
- Yamasaki M, Emoto H, Konishi M, Mikami T, Ohuchi H, Nakao K and Itoh N. (1999). FGF-10 is a growth factor for preadipocytes in white adipose tissue. *Biochem. Biophys. Res. Commun*. 258 109–112.
- Yamauchi T, Kamon J, Waki H, Terauchi Y, Kubota N, Hara K, Mori Y, Ide T, Murakami K, Tsuboyama-Kasaoka N, Ezaki O, Akanuma Y, Gavrilova O, Vinson C, Reitman ML, Kagechika H, Shudo K, Yoda M, Nakano Y, Tobe K, Nagai R, Kimura S, Tomita M, Froguel P, Kadowaki T. (2001). The fat-derived hormone adiponectin reverses insulin resistance associated with both lipodystrophy and obesity. *Nat Med*. 7(8): 941-946.
- Yang X, Enerbäck S, Smith U. (2003). Reduced expression of FOXC2 and brown adipogenic genes in human subjects with insulin resistance. *Obes Res*. 11: 1182-1191.
- Yang J, Ren J, Song J, Liu F, Wu C, Wang X, Gong L, Li W, Xiao F, Yan F, Hou X, Chen L. (2013). Glucagon-like peptide 1 regulates adipogenesis in 3T3-L1 preadipocytes. *Int J Mol Med*. 31(6):1429-35.
- Yen M and Ewald MB. (2012). Toxicity of weight loss agents. *J Med Toxicol*. 8:145– 152.
- Zander M, Madsbad S, Madsen JL, Holst JJ. (2002). Effect of 6-weeks course of glucagon-like peptide 1 on glycaemic control, insulin sensitivity, and beta-cell function in type 2 diabetes: a parallelgroup study. *Lancet*. 359: 824-830.
- Zannettino AC, Paton S, Arthur A, Khor F, Itescu S, Gimble JM, Gronthos S. (2008). Multipotential human adipose-derived stromal stem cells exhibit a perivascular phenotype in vitro and in vivo. *J Cell Physiol*. 214(2):413-21.

Zechner R, Strauss JG, Haemmerle G, Lass A. and Zimmermann R. (2005). Lipolysis: pathway under construction. *Curr Opin Lipidol*, 16(3), pp. 333-40.

Zeyda M, Stulnig TM. (2009). Obesity, Inflammation, and Insulin Resistance-A mini-Review. *Gerontol*. 55:379-386.

Zhang JW, Klemm DJ, Vinson C, Lane MD. (2004). Role of CREB in transcriptional regulation of CCAAT/enhancer-binding protein beta gene during adipogenesis. *Journal of Biological Chemistry*. 279 4471-4478.

Zhang Y, Han C, Zhu W, Yang G, Peng X, Mehta S, Zhang J, Chen L, & Liu Y. (2021). Glucagon Potentiates Insulin Secretion Via  $\beta$ -Cell GCGR at Physiological Concentrations of Glucose. *Cells*. 10(9): 2495.

Zhang Y, Proenca R, Maffei M, Barone M, Leopold L. and Friedman JM. (1994). Positional cloning of the mouse obese gene and its human homologue. *Nature*. 372(6505), pp. 425-32.

Zhao N, Wang X, Wang Y, Yao J, Shi C, Du J, & Bai R. (2021). The Effect of Liraglutide on Epicardial Adipose Tissue in Type 2 Diabetes. *Journal of diabetes research*. 5578216.

Zhu E, Yang Y, Zhang J, Li Y, Li C, Chen L, Sun B. (2016). Liraglutide suppresses obesity and induces brown fat-like phenotype via Soluble Guanylyl Cyclase mediated pathway in vivo and in vitro. *Oncotarget*. 7(49): 81077–81089.

Zuk PA, Zhu M, Ashjian P, De Ungarte DA, Huang JI, Mizuno H, Alfonso ZC, Fraser JK, Benhaim P, Hedrick MH. (2002). Human adipose tissue is a source of multipotent stem cells. *Mol. Biol Cell*. (12) 4279-95.

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

Zuk PA. (2010). The adipose-derived stem cell: looking back and looking ahead. *Mol Biol Cell*. 21(11), pp. 1783-7.

## 8. PUBBLICAZIONI

Giulia Cantini, Martina Trabucco, Ilaria Dicembrini, Edoardo Mannucci, Michaela Luconi (2020). Chapter 16 - Intestinal Hormones. Editor: Gerald Litwack. *Hormonal Signaling in Biology and Medicine*. Academic Press. Pages 361-381.

Cantini G, Trabucco M, Di Franco A, Mannucci E, Luconi M (2019). *Glucagon modulates proliferation and differentiation of human adipose precursors*. J Mol Endocrinol. 63(4):249-260.

## Intestinal Hormones

Giulia Cantini<sup>1</sup>, Martina Trabucco<sup>1</sup>, Ilaria Dicembrini<sup>1,2</sup>,  
Edoardo Mannucci<sup>1,2</sup>, Michaela Luconi<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup>Department of Experimental and Clinical Biomedical Sciences “Mario Serio”, University of Florence, Florence, Italy;

<sup>2</sup>Careggi University Hospital (AOUC), Florence, Italy

### 1. OVERVIEW OF THE INTESTINAL HORMONES

Energy homeostasis is a finely regulated process, where food intake is the main source of energy to maintain the physiological functions of the organism and is counterbalanced by energy expenditure. When the balance between energy intake and energy expenditure fails, it triggers metabolic pathologies. Several genes have been identified to encode gut hormones involved in regulating metabolic physiology and appetite and intestinal nutrient absorption (Schwartz et al., 2000; Sahu, 2004). The endocrine activity of the intestine has been the object of intense studies for several decades, starting from the pioneering studies on secretin (Drucker et al., 2017). At the beginning of the 20th century, Bayliss and Starling by discovering this first gut hormone, secretin, in dog intestinal extract (Bayliss and Starling, 1902) founded not only gastrointestinal endocrinology but, more widely, endocrinology: in fact, in the Starling’s Croonian lecture in 1905 (Starling, 1905) the word hormone (from Greek *hormoa*) was coined. For many years the composition and the different functions of the factors present in the intestinal crude extract remained unclear, and only in the late 1990s the different hormones were identified.

These hormones act through a strict crosstalk between intestine, where the majority of the nutrient absorption takes place, and other organs such as the brain, pancreas, liver, and heart to control food intake, intestinal absorption, and glucose homeostasis. The main gut hormones, their activities, and properties are summarized in Table 16.1.

The gut–brain axis can be considered a complex neurohormonal communication network pivotal for the metabolic homeostasis. For the neural part, it

consists of the central nervous system (CNS), the local enteric nervous system, the autonomous nervous system, and its associated sympathetic and parasympathetic arms; whereas in the endocrine component, it comprehends the enteroendocrine cells dispersed in the stomach and intestine. In addition, the immunological system integrated in the mucosa and the microbiota populating the gut contribute to modulate the axis activity (Bliss and Whiteside, 2018). In the axis, sensory information, nutrients, and factors produced by microbiota are converted into neural, hormonal, and immunological signals, which are relayed back and forth from the CNS to the gut and vice versa (Mayer et al., 2015).

Gastric emptying is prolonged by the vagal activation and by the release of gut hormones, such as cholecystokinin (CCK), peptide YY (PYY), and glucagon-like peptide 1 (GLP-1) through a negative feedback to the brain or their local action in reducing food intake within 6 minutes of feeding in fasting re-fed rats (Davis and Smith, 1990) (Fig. 16.1).

### 2. THE INTESTINAL ENTEROENDOCRINE CELLS AND THE ENTEROENDOCRINE SYSTEM

Distribution of enteroendocrine cells (ECC) and their secretion in the human intestinal mucosa were elegantly described in pioneer immunocytochemical studies in the early 1980s (Sjölund et al., 1983). Endocrine cells mainly concentrate in the small intestine, although the large intestine has also more recently been described to express some hormone-secreting cells (Engelstoft et al., 2013). Together with the gastric tract, the intestine can be considered the largest and phylogenetically oldest endocrine organ in the organism. Functional and

## RESEARCH

# Glucagon modulates proliferation and differentiation of human adipose precursors

Giulia Cantini<sup>1</sup>, Martina Trabucco<sup>1</sup>, Alessandra Di Franco<sup>1</sup>, Edoardo Mannucci<sup>1,2</sup> and Michaela Luconi<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup>Endocrinology Unit, Department of Experimental and Clinical Biomedical Sciences, University of Florence, Florence, Italy

<sup>2</sup>Azienda Ospedaliera Universitaria Careggi (AOUC), Careggi Hospital, Florence, Italy

Correspondence should be addressed to G Cantini or M Luconi: [giulia.cantini@unifi.it](mailto:giulia.cantini@unifi.it) or [michaela.luconi@unifi.it](mailto:michaela.luconi@unifi.it)

## Abstract

Glucagon-like peptide 1 receptor agonists (GLP-1RAs), which are currently used for the treatment of type 2 diabetes, have recently been proposed as anti-obesity drugs, due to their relevant effects on weight loss. Furthermore, dual agonists for both GLP-1R and glucagon receptor (GCGR) are under investigation for their promising action on adiposity, although underlying mechanisms still need to be clarified. We have recently demonstrated that GLP-1 and liraglutide interfere with the proliferation and differentiation of human adipose precursors, supporting the hypothesis of a peripheral action of GLP-1RA on weight. Here, we investigated glucagon activity in an *in vitro* model of primary human adipose-derived stem cells (ASCs). Glucagon significantly inhibited ASC proliferation in a dose- and time-dependent manner, as evaluated by cell count and thymidine incorporation. When added during *in vitro*-induced adipogenesis, glucagon significantly reduced adipocyte differentiation, as demonstrated by the evaluation of intracellular fat content and quantitative expression of early and mature adipocyte markers (*PPAR $\gamma$*  and *FABP4*, *HSL*). Notably, the inhibitory effect of glucagon on cell proliferation and adipogenesis was reversed by specific GLP-1R (exendin-9) and GCGR (des-His<sup>1</sup>-Glu<sup>9</sup>-glucagon(1–29)) antagonists. The presence of both receptors was demonstrated by Western blot, immunofluorescence and cytofluorimetric analysis of ASCs. In conclusion, we demonstrated a direct inhibitory action of glucagon on the proliferation and differentiation of human adipose precursors, which seems to involve both GLP-1R and GCGR. These findings suggest that the adipose stem compartment is a novel target of glucagon, possibly contributing to the weight loss obtained *in vivo* with dual GLP-1R/glucagon agonists.

## Key Words

- ▶ glucagon
- ▶ adipose tissue
- ▶ glucagon receptor
- ▶ GLP-1 receptor agonists

*Journal of Molecular  
Endocrinology*  
(2019) **63**, 249–260

## Introduction

Obesity is one of the most critical risk factor for the development of type 2 diabetes (T2D); in fact, about 90% of persons with diabetes is obese or overweight (Pappachan *et al.* 2017). This led to the use of the term 'diabesity', indicating such a strong association between the two pathologies (Astrup & Finer 2000).

Among glucose-lowering drugs used for the treatment of T2D, glucagon-like peptide-1 (GLP-1) receptor agonists (GLP-1RAs) reduce body weight and adiposity both in T2D and in non-diabetic obese subjects (Monami *et al.* 2012, Pi-Sunyer *et al.* 2015, Cantini *et al.* 2016). One of the GLP-1RAs, liraglutide, has recently been approved for