



**UNIVERSITÀ POLITECNICA DELLE MARCHE  
DIPARTIMENTO DI SCIENZE DELLA VITA E  
DELL'AMBIENTE**

**Corso di Laurea Magistrale  
Biologia Molecolare e Applicata**

---

**IL SISTEMA COLINERGICO NON-NEURONALE MODULA  
L'INFIAMMAZIONE CHE CARATTERIZZA IL TESSUTO  
ADIPOSO DEI SOGGETTI CON OBESITÀ**

**THE NON-NEURONAL CHOLINERGIC SYSTEM  
MODULATES ADIPOCYTES INFLAMMATION  
ASSOCIATED WITH OBESITY**

Tesi di Laurea Magistrale di:  
**Valeria Ciavarella**

Relatore:  
**Dr.ssa Jessica Perugini**  
Correlatore:  
**Prof. Antonio Giordano**

**Sessione Straordinaria  
Anno Accademico 2022/2023**

## INDICE

<b>1. Introduzione</b>	3
<b>2. Scopo della tesi</b>	7
2.1 Obiettivi dello studio	7
<b>3. Metodi</b>	9
3.1 Animali e tessuti	9
3.2 Colture cellulari e trattamenti <i>in vitro</i>	10
3.3 qRT-PCR	12
3.4 Uptake del glucosio	13
3.5 Valutazione del rilascio di citochine nel mezzo di coltura	14
3.6 Western blotting	14
3.7 Immunoistochimica, microscopio confocale e analisi morfometrica	16
3.8 Ibridazione di RNA <i>in situ</i>	18
3.9 Cromatografia liquida/Spettrometria di massa tandem	19
3.10 Analisi statistica	21

<b>4. Risultati</b>	22
4.1 Nel tessuto adiposo epididimale di topo, l'obesità indotta da dieta influenza l'espressione genica dei markers molecolari del sistema colinergico	22
4.2 I macrofagi che infiltrano il tessuto adiposo epididimale di topo esprimono la proteina ChAT	26
4.3 I macrofagi che infiltrano il tessuto adiposo epididimale di topo esprimono l'mRNA di ChAT	34
4.4 Il tessuto adiposo di topi obesi contiene livelli più alti di acetilcolina e colina	36
4.5 Il tessuto adiposo omentale di soggetti con obesità è infiltrato da macrofagi che esprimono la ChAT	38
4.6 L'acetilcolina attenua, in adipociti umani in coltura, lo stato infiammatorio e migliora l'insulino-resistenza indotta da TNF $\alpha$	42
<b>5. Discussione</b>	47
5.1 Discussione dei risultati	47
5.2 Prospettive future	54
<b>6. Bibliografia</b>	56

## **Capitolo primo**

### **INTRODUZIONE**

L'obesità, caratterizzata da un eccessivo accumulo di tessuto adiposo bianco (WAT) nel corpo, è uno dei principali ed emergenti problemi di salute pubblica che comporta un rischio, significativamente alto, di sviluppare comorbidità croniche e rischiose per la vita, tra cui diabete di tipo 2, malattie cardiovascolari ed epatiche, alcuni tipi di cancro e neurodegenerazione [1-3]. Evidenze cliniche mostrano che le comorbidità associate all'obesità si sviluppano principalmente in soggetti con obesità viscerale, in cui il WAT intraperitoneale si espande, in prossimità e in stretta relazione funzionale, con gli organi e le strutture addominali [4,5].

Nei modelli animali obesi e nell'obesità umana, un processo infiammatorio cronico di basso grado è attivato precocemente nel WAT viscerale [6,7]. Di conseguenza, il tessuto adiposo viscerale mostra prominenti anomalie metaboliche tra cui ipertrofia e stress degli adipociti; tasso di mortalità degli adipociti avanzato; infiltrazione da parte di cellule infiammatorie, principalmente macrofagi; aumento della secrezione di acidi grassi liberi e mediatori proinfiammatori; disregolazione delle adipochine e degli esosomi [8-11]. Per quanto riguarda l'istologia, i macrofagi si organizzano distintamente attorno agli adipociti morti, formando le cosiddette strutture a

coroncina (CLS) – in cui aggregati di macrofagi attivati, a volte fusi in sincizi (cellule giganti multinucleate, MGC), eliminano i resti di adipociti morti. Con il passare del tempo, il WAT viscerale infiammato e disfunzionale sviluppa alterazioni, sempre più marcate, dell'apporto vascolare e fibrosi [12].

Nei mammiferi, gli adipociti bianchi esprimono recettori colinergici muscarinici (mAChR) [13] e, soprattutto, nicotinici (nAChR), la cui attivazione da parte della nicotina o di agonisti specifici dell'isotipo della nicotina è associata a benefici effetti metabolici e antinfiammatori che sono stati descritti in coltura negli adipociti bianchi di soggetti obesi, sia nell'uomo che nei topi [14-19]. In particolare, in topi obesi geneticamente (db/db) e topi con obesità indotta da dieta, l'attivazione dell' $\alpha 7$ nAChR da parte della nicotina, a dosi che non comportano cambiamenti nell'assunzione di cibo o nel peso corporeo, si traduce in una riduzione dell'infiammazione del tessuto adiposo e in un miglioramento dell'omeostasi del glucosio e della sensibilità all'insulina [20]. Inoltre, l'attivazione di  $\alpha 2$ nAChR nel tessuto adiposo sottocutaneo di topo, promuove lo sviluppo di adipociti bruni che dissipano energia, aumentano la termogenesi e migliorano l'obesità indotta da dieta [21].

Una domanda importante e ancora senza risposta è l'origine, o fonte cellulare, dell'acetilcolina (ACh), che è in grado di raggiungere gli adipociti bianchi e di

interagire con i loro recettori colinergici, i quali influenzano la biologia degli adipociti sia in condizioni fisiologiche che patologiche.

ACh è un neurotrasmettitore con larga distribuzione; sintetizzato, a partire dalla colina e dall'acetil-coenzima A, dalla colina acetiltransferasi (ChAT) nel citosol di diverse classi di neuroni del SNC e periferico. Successivamente, viene immagazzinato nelle vescicole sinaptiche dal trasportatore vescicolare dell'ACh (VAChT). Quando il potenziale d'azione raggiunge il terminale dell'assone colinergico, le vescicole si fondono con la membrana presinaptica, l'ACh viene secreta nella fessura sinaptica e raggiunge rapidamente la membrana postsinaptica, dove interagisce con i suoi recettori. L'ACh rilasciata dalle terminazioni nervose viene eliminata in modo efficace e rapido dall'acetilcolinesterasi (AChE) e dalla butirrilcolinesterasi (BuChE), che sono enzimi legati alla membrana e/o inseriti nella matrice extracellulare, i quali idrolizzano l'ACh in acetato e colina [22]. La colina, nutriente essenziale delle cellule dei mammiferi [23], viene rapidamente assorbita dallo spazio extracellulare dei neuroni e delle cellule effettrici attraverso il trasportatore di colina 1 (ChT1), per essere riutilizzata poi per la sintesi di ACh o per altre esigenze metaboliche. Nel SNP, la maggior parte dei neuroni postgangliari parasimpatici sono colinergici. Tuttavia, poiché il WAT sottocutaneo e

viscerale sono carenti di innervazione colinergica parasimpatica, [24], un'origine neuronale dell'ACh che agisce sugli adipociti bianchi è improbabile.

Nel corso degli ultimi decenni, un numero crescente di lavori scientifici ha dimostrato che le componenti molecolari necessarie per la neurotrasmissione colinergica si trovano anche in organi privi di innervazione (tipicamente la placenta) e negli organi privi di nervi colinergici (tipicamente la milza), e che oltre alle cellule neuronali, i markers molecolari del sistema colinergico sono espressi da cellule epiteliali, mesoteliali, endoteliali, circolatorie e immunitarie [25-27]. In diverse malattie infiammatorie, i granulociti, linfociti e macrofagi acquisiscono la capacità di sintetizzare e secernere ACh, che regola la risposta immunitaria e media gli effetti antinfiammatori attraverso loop auto- e/o paracrini [28,29].

## Capitolo secondo

### SCOPO DELLA TESI

#### *2.1 Obiettivi dello studio*

Il tessuto adiposo bianco (WAT) è privo di innervazione colinergica parasimpatica, quindi la fonte di acetilcolina (ACh) che agisce sui recettori colinergici degli adipociti bianchi è sconosciuta. Questo studio è stato progettato per identificare le cellule che producono ACh nel tessuto adiposo di topo e umano e per stabilire se nel tessuto adiposo infiammato dei soggetti con obesità si attiva un sistema colinergico non-neuronale.

I mammiferi infatti, oltre ad un sistema colinergico neuronale, possiedono un sistema colinergico non-neuronale in cui l'ACh secreta è coinvolta nella comunicazione cellula-cellula e controlla le funzioni cellulari di base tra cui mitosi, differenziamento, organizzazione del citoscheletro, contatto cellula-cellula, secrezione e assorbimento; pertanto, si è deciso di indagare se un sistema colinergico non-neuronale esiste nel WAT e se si attiva nel WAT infiammato dei soggetti con obesità, agendo nello specifico sugli adipociti bianchi.

Il WAT epididimale di topo (eWAT) e il tessuto adiposo omentale umano sono stati studiati in condizioni normali e in soggetti con obesità. È stata valutata

l'espressione delle molecole chiave coinvolte nel signalling del sistema colinergico mediante qRT-PCR e Western blotting, mentre la loro distribuzione tissutale e la loro localizzazione cellulare sono state indagate mediante immunistochemica, microscopia confocale ed ibridazione *in situ*. Inoltre, i livelli di ACh sono stati misurati mediante cromatografia liquida/spettrometria di massa tandem. Infine, gli effetti biologici dell'ACh sono stati valutati in colture primarie di adipociti umani (hMADS) isolati dal tessuto adiposo localizzato nella regione prepubica di giovani donatori.

## Capitolo terzo

### METODI

#### *3.1 Animali e tessuti*

Sono stati acquistati topi maschi C57BL/6 da Charles River (Lecco, Italia) e sono stati alloggiati in gabbie di plastica in condizioni ambientali costanti (ciclo luce/buio di 12 ore a 22 °C) con accesso *ad libitum* a cibo ed acqua. La cura degli animali è stata effettuata in conformità alla direttiva 2010/63/UE del Consiglio. Tutti gli esperimenti sono stati approvati dal Ministero della Salute (autorizzazione n. 405/2018-PR). Gli animali hanno inizialmente ricevuto una dieta standard a base di cibo (CD; Envigo, Indianapolis, IN; 24 kJ% da proteine, 18 kJ% da grassi, 58 kJ% da carboidrati). All'età di 5 settimane, alcuni topi sono passati ad una dieta ricca di grassi (HFD; Diete di ricerca, Nuovo Brunswick, NJ; 20 kJ% da proteine, 60 kJ% da grassi, 20 kJ% da carboidrati) per 15 settimane. Tutti gli esperimenti sono stati condotti su topi di età compresa tra 20 e 22 settimane. Per la qRT-PCR e il Western blotting, gli animali anestetizzati sono stati decapitati, il WAT epididimale (eWAT) è stato sezionato, congelato in azoto liquido e conservato a -80 °C. Per la cromatografia liquida/spettrometria di massa tandem (LC-MS-MS), l'eWAT è stato processato immediatamente e isolata la frazione stroma-vascolare (SVF). Per gli studi morfologici, gli animali anestetizzati sono stati perfusi per via

transcardiaca con il 4% di paraformaldeide in tampone fosfato (PB) 0,1 M, pH 7,4, l'eWAT è stato isolato utilizzando un microscopio operatorio Zeiss OPI1 (Carl Zeiss, Oberkochen, Germania) e ulteriormente fissato mediante immersione in paraformaldeide al 4% in PB per una notte a 4 °C. Dopo un accurato risciacquo in PB, i campioni sono stati disidratati in etanolo, chiarificati in xilene e incorporati in paraffina. I campioni umani erano biopsie di WAT omentale di 31 pazienti gravemente obesi (indice di massa corporea [BMI]  $\geq 35$  kg/m<sup>2</sup>) e di 10 soggetti di controllo (BMI  $\leq 30$  kg/m<sup>2</sup>) sottoposti rispettivamente a chirurgia bariatrica e colecistectomia presso L' Azienda Ospedaliera Universitaria (AOU, Ospedali Riuniti, Ancona, Italia). Ogni biopsia è stata divisa in due metà: i campioni per la qRT-PCR sono stati congelati in azoto liquido e conservati a -80 °C, mentre quelli per le analisi morfologiche sono stati fissati in formalina per 24h a 4°C ed inclusi in paraffina. Il protocollo di studio è stato approvato dal Comitato Etico degli Ospedali Riuniti (Ancona, Italia). I soggetti che hanno ricevuto farmaci antinfiammatori sono stati esclusi dallo studio.

### ***3.2 Colture cellulari e trattamenti in vitro***

I terreni di coltura cellulare, il siero fetale bovino (FBS), i tamponi e la tripsina provengono da Pan-Biotech GmbH (Aidenbach, Germania); i reagenti per

colture cellulari, tra cui Oil Red O, ACh, rivastigmina e insulina sono stati forniti da Sigma-Aldrich (Milano, Italia). Il fattore di crescita dei fibroblasti ricombinanti umani (hFGF)-2 e il fattore di necrosi tumorale ricombinante umano  $\alpha$  (TNF $\alpha$ ) è stato acquistato da PeproTech (Londra, Regno Unito). Le cellule staminali umane multipotenti isolate da tessuto adiposo della regione prepubblica di giovani donatori (hMADS; gentilmente fornite dal Prof. Christian Dani, Université Côte D'Azur, Nizza, Francia), sono state coltivate in terreno di proliferazione a basso contenuto di glucosio (1 g/l) (terreno di Dulbecco modificato di Eagle [DMEM]) addizionato con il 10% di FBS e 2,5 ng/ml di hFGF-2 e sono state utilizzate tra il 16° e il 19° passaggio. Per indurre il differenziamento adiposo, sono state seminate su terreno di proliferazione in piastre multi-pozzetto ad una densità di 4500 cellule/cm<sup>2</sup>. Raggiunta la confluenza, hFGF-2 non è stato più aggiunto. Il giorno successivo (giorno 0), le cellule sono state incubate in un mezzo adipogenico (terreno di proliferazione senza siero/terreno F-12 di Ham) contenente 10  $\mu$ g/ml di transferrina, 5  $\mu$ g/ml di insulina, 0,2 nM triiodotironina, 100  $\mu$ M di 3-isobutile-1-metilxantina, 1  $\mu$ M di desametasone e 100 nM di rosiglitazone. Il desametasone e la 3-isobutil-1-metilxantina non sono stati aggiunti dal giorno 3 e il rosiglitazone dal giorno 9. Il contenuto lipidico cellulare è stato valutato in diversi punti temporali mediante colorazione Oil Red O. Trattamenti e saggi

biologici sono stati effettuati su adipociti hMADS differenziati dal giorno 12 al giorno 15. La durata del trattamento e le concentrazioni di ACh, rivastigmina, TNF $\alpha$  e insulina sono riportate nel capitolo Risultati.

### **3.3 qRT-PCR**

L'RNA totale è stato estratto con il reagente TRIZOL (Invitrogen, Carlsbad, CA), purificato, digerito con desossiribonucleasi ribonucleasi-free e concentrato con il kit RNeasy Micro (Qiagen, Milano, Italia) secondo le istruzioni del produttore. Per la determinazione dei livelli di mRNA, 1  $\mu$ g di RNA è stato trascritto inversamente con il kit RT di cDNA ad alta capacità con inibitore delle RNasi (Applied BioSystems, Foster City, CA) in un volume totale di 20  $\mu$ l. La qRT-PCR è stata eseguita utilizzando i saggi di espressione genica TaqMan e Master Mix TaqMan (Applied BioSystem). Tutte le sonde provenivano da Applied BioSystems (Tabella 1A). Le reazioni sono state effettuate in un sistema Step One Plus Real Time PCR (Applied BioSystems) utilizzando 50 ng di cDNA in un volume di reazione di 10  $\mu$ l. Il protocollo del ciclo termico prevedeva l'incubazione iniziale a 95 °C per 10 minuti, 40 cicli a 95 °C per 15 s e di 60 °C per 20 s. Una reazione di controllo senza trascrittasi inversa nella miscela di amplificazione è stata eseguita per ciascun campione, per escludere la contaminazione genomica. Campioni non contenenti il

template sono stati inclusi in tutti gli esperimenti come controlli negativi. La TATA box-binding protein è stata utilizzata come controllo endogeno per normalizzare l'espressione genica. L'espressione relativa dell'mRNA è stata determinata col metodo  $\Delta\text{Ct}$  ( $2^{-\Delta\text{Ct}}$ ).

**TABLE 1A.** Taqman probes all from Applied Biosystems #4453320.

<b>Target Gene</b>	<b>Assay ID</b>
AChE	Hs00241307_m1
AChE	Mm00477275_m1
Adiponectin	Hs00605917_m1
Arg-1	Mm00475988_m1
BuChE	Hs00992319_m1
BuChE	Mm00515326_m1
CD206	Mm01329362_m1
ChAT	Hs00758143_m1
ChAT	Mm01221880_m1
ChT1	Hs00222367_m1
ChT1	Mm00452075_m1
GLUT4	Hs00168966_m1
IL-6	Hs00174131_m1
MCP-1	Hs00234140_m1
TBP	Hs00427620_m1
TBP	Mm00446973_m1
TNF $\alpha$	Mm00443258_m1
VACHT	Hs00268179_s1
VACHT	Mm00491465_s1

### ***3.4 Uptake del glucosio***

Gli adipociti hMADS sono stati differenziati in piastre a fondo nero a 96 pozzetti (Corning, Sigma-Aldrich) ed incubati in DMEM a basso contenuto di glucosio con 1 mM di ACh e 100 nM di rivastigmina per diversi periodi di tempo, riportati nei Risultati. Successivamente, gli adipociti sono stati incubati con o senza insulina 100 nM in Krebs-Ringer PB (pH 7,4) a 37 °C per 10 *min*.

Sono stati quindi trattati con 2-nitrobenzodesossiglucosio (50  $\mu$ M) per 60 minuti. L'intensità della fluorescenza è stata valutata a 550/590 nm utilizzando un lettore di piastre Infinite F200 PRO (Tecan, Mannedorf, Svizzera).

### ***3.5 Valutazione del rilascio di citochine nel mezzo di coltura***

Il rilascio di citochine è stato misurato mediante ELISA in terreni condizionati raccolti alla fine di ogni incubazione. I terreni sono stati successivamente centrifugati e conservati a -80 °C fino all'uso. L'interleuchina (IL)-6 (pg/ml) e l'adiponectina (ng/ml) sono state misurate secondo le istruzioni del fabbricante utilizzando rispettivamente il kit ELISA per adiponectina umana (# AG-45A-0001YEK-KI01, Adipogen Life Sciences, Svizzera) e il kit ELISA per IL-6 umana (# 501030, Cayman Chemical, Ann Arbor, MI).

### ***3.6 Western blotting***

Gli estratti proteici sono stati ottenuti da eWAT utilizzando il reagente per l'estrazione di proteine tissutali (T-PER, Pierce, Thermo Scientific, Rockford, IL), come indicato dal produttore, dopo aver aggiunto il cocktail di inibitori di proteasi e fosfatasi (Sigma-Aldrich). Il contenuto proteico è stato determinato col saggio proteico dell'acido bicinconinico (Euroclone, Milano, Italia). Una

quantità appropriata di proteine è stata usata per elettroforesi su gel di poliacrilammide con sodio dodecil solfato (SDS-PAGE) in condizioni riducenti per immunoblotting. Le proteine separate sono state poi trasferite su una membrana di nitrocellulosa (Bio-Rad, Milano, Italia) e le proteine di interesse sono state rilevate con anticorpi specifici (Tabella 1B). L'anti-vinculina è stata usata come controllo della corsa. Quando le membrane sono state utilizzate per la rilevazione di più di una proteina, i filtri sono stati sottoposti a stripping con Euroclone Restore Western Blot Stripping Buffer e poi incubati con l'anticorpo primario. L'immunostaining è stata rilevata utilizzando immunoglobuline anti-coniglio o anti-topo coniugate con perossidasi di rafano (Tabella 1C) [32]. Sono state misurate le quantità di ciascuna proteina utilizzando SuperSignal Substrate (Euroclone), analizzato con Chemidoc XRS+ e quantificato da ImageLab (entrambi di Bio-Rad).

**TABLE 1B.** Primary antibodies.

<b>Antibodies</b>	<b>Host*</b>	<b>Diluition</b>	<b>Source</b>
AChE	M	1:1000 (IHC) 1:1000 (WB)	Sigma-Aldrich/A6970
BuChE	G	1:1000 (IHC) 1:1000 (WB)	R&D Systems/AF-9024
CD11c	R	1:400 (IF)	Cell Signaling/97585
CD206	R	1:800 (IF)	Abcam/ab64693
CD68	M	1:250 (IF)	Agilent, DAKO/M081401
ChAT	G	1:600 (IHC) 1:400 (IF)	Merck Millipore/AB144P
ChAT	R	1:1000 (WB)	Merck Millipore/AB143
ChT1	R	1:600 (IHC) 1:1000 (WB)	Proteintech/21848-1AP
F4-80	R	1:400 (IF)	Cell Signaling/70076
Perilipin	R	1:500 (IF)	Abcam/ab3526

Vinculin	M	1:3000 (WB)	Sigma-Aldrich/MAB3574
----------	---	-------------	-----------------------

\*M, mouse; R, rabbit; G, goat; WB, western blotting; IHC, immunohistochemistry; IF, immunofluorescence.

**TABLE 1C.** Secondary antibodies.

Conjugated to	React*	Dilution	Source	ID
Peroxidase	M	1:5000	Jackson ImmunoResearch	715-036-150
Peroxidase	R	1:1000	Vector Laboratories	PI-1000
Fluorophore	G	1:400	Invitrogen	A-11055
Fluorophore	R	1:400	Invitrogen	A-31572
Biotinylated	G	1:200	Vector Laboratories	BA-5000
Biotinylated	R	1:200	Vector Laboratories	BA-1000
Biotinylated	M	1:200	Vector Laboratories	BA-2000

\*M, mouse; R, rabbit; G, goat.

### ***3.7 Immunoistochimica, microscopio confocale e analisi morfometrica***

L'immunoistochimica è stata eseguita su sezioni di paraffina spesse 3 µm. Le sezioni sono state deparaffinate, lavate in Tween-phosphate buffered saline 0,1% (PBS) e incubate con una soluzione di recupero dell'antigene (Histo-VT-One, PH 9, Nacalai Tesque, Kyoto, Giappone) per 40 *min* a 70 °C. Dopo un accurato risciacquo in PBS, le sezioni sono state messe in reazione con H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> allo 0,3% (in PBS; 30 *min*) per bloccare la perossidasi endogena, risciacquate con PBS e incubate in soluzione bloccante (3% di siero normale in PBS; 60 *min*). Successivamente, sono state incubate con anticorpo primario (Tabella 1B; in PBS; durante la notte a 4 °C). Dopo un accurato risciacquo in PBS, le sezioni sono state incubate in una soluzione 1:200 v/v di anticorpi secondari

biotinilati coniugati con HRP (Tabella 1C; in PBS; 30 *min*, a temperatura ambiente [RT]). Le reazioni istochimiche sono state eseguite utilizzando il kit Vectastain ABC (Vector Laboratories, Burlingame, CA) e Sigma Fast 3,3'-diaminobenzidina (Sigma-Aldrich) come substrato. Le sezioni sono state infine colorate con ematossilina, disidratate e montate in Eukitt (Sigma-Aldrich). La colorazione non è stata osservata quando l'anticorpo primario è stato omesso. Per gli esperimenti di immunofluorescenza e marcatura multipla, le sezioni sono state elaborate come descritto sopra fino all'incubazione con gli anticorpi primari (Tabella 1B). Il giorno dopo le sezioni sono state lavate due volte con PBS ed incubate con una miscela di anticorpi secondari diluiti in albumina sierica bovina all'1% PBS (Suppl. Tabella 1C) per una notte a 4 °C. Le sezioni sono state successivamente lavate due volte con Tween-PBS allo 0,1%, colorate con TO-PRO3 (T3605, Invitrogen, Carlsbad, CA), montate e coperte con Vectashield mounting medium (Vector Laboratories). Le sezioni sono state osservate con un microscopio motorizzato DM6000 (Leica Microsystems, Wetzlar, Germania) a diversi ingrandimenti. La fluorescenza è stata rilevata con un Microscopio confocale spettrale TCS-SL Leica equipaggiato con un laser a gas misto Argon e He/Ne. I fluorofori sono stati eccitati con le linee da 488, 543 e 649 nm e riprese separatamente. Sono state ottenute immagini (1024 × 1024 pixel) sequenzialmente da due canali

utilizzando un foro stenopeico confocale di 1.1200 e memorizzati come file TIFF. La luminosità e il contrasto delle immagini finali sono stati regolati utilizzando Photoshop 6 (Adobe Systems). La percentuale di macrofagi interstiziali positivi per F4/80, CD206 o CD11c, macrofagi CLS e cellule giganti multinucleate che esprimono anche ChAT sono state calcolate in 5 topi per gruppo sperimentale. Sono state analizzate tre sezioni rappresentative di 50 µm di ciascun topo; da ogni sezione, 10 immagini non sovrapposte sono state selezionate utilizzando un obiettivo ×63.

### ***3.8 Ibridazione di RNA in situ***

Sezioni incluse in paraffina di 5 µm di spessore sono state montate su vetrini SuperFrost Plus (Thermo Fisher, Waltham, MA), essiccate a RT per una notte, riscaldate a 60 °C per 1 ora e deparaffinate. L'ibridazione dell'RNA *in situ* (Tecnologia FISH RNAscope; ACDBio, Bio-Techne, Minneapolis, MN) è stata eseguita utilizzando sonde specifiche per RNA (Tabella 1D) secondo le istruzioni del produttore. Quindi, 3-plex negativo e 3-plex positivo ossia sonde di controllo, sono state elaborate in parallelo con le sonde target. Tutte le fasi di incubazione sono state eseguite a 40 °C utilizzando il sistema di ibridazione ACD HybEz (ACDBio). Le sezioni sono state successivamente incubate con H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> a RT per 10 minuti, risciacquate due volte in acqua distillata e

successivamente immerse nel tampone di recupero del bersaglio (ACDBio) a 95-97 °C per 15 *min*. I vetrini sono stati lavati in acqua distillata per 15 secondi e disidratati in etanolo al 10% per 30 *s*. Dopo l'essiccazione all'aria, è stata disegnata una barriera idrofobica utilizzando la penna ImmEdge e le sezioni sono stati incubate con Protease Plus (entrambi di ACDBio) per 30 minuti a 40 °C. La successiva ibridazione, amplificazione e rilevazione sono state eseguite secondo le istruzioni del produttore (Multiplex Kit di rilevazione fluorescente v2, ACDBio). Le sezioni sono state colorate con TO-PRO3, montate con ProLong Gold Antifade Mountant (Thermo Fisher) e conservate a 4 °C al buio.

**TABLE 1D.** RNAscope Probe all from ACD Bio.

<b>Target Gene</b>	<b>Assay ID</b>
ChAT	Mm - ChAT - mRNA (408731)
F4-80	Mm - Adgre1-C2 - mRNA (460651-C2)
ChT1	Mm - Slc5a7 - mRNA (439941)
3-plex Positive control	Mm (PN 320881)
3-plex Negative control	Mm (PN 320871)

### ***3.9 Cromatografia liquida/Spettrometria di massa tandem***

Per la quantificazione di ACh e colina, l'eWAT isolato da topi maschi (25 CD e 25 HFD) è stato pesato, lavato 3 volte con la soluzione salina bilanciata di Hanks (HBSS; Sigma-Aldrich) e addizionato con 150 µM rivastigmina. Per ogni condizione sperimentale, l'eWAT di 5 animali è stato raggruppato, posto

in una piastra Petri e tritato con forbici sterili. I frammenti di tessuto sono stati digeriti con una soluzione di collagenasi di tipo II (2 mg/ml in HBSS; Sigma-Aldrich) e 150  $\mu$ M di rivastigmina per 45 minuti in bagnetto a 37 °C, filtrati attraverso un colino cellulare da 100  $\mu$ m e poi centrifugati a 200 giri/min per 10 minuti a RT. Gli adipociti maturi flottanti sono stati scartati, mentre le cellule della frazione vascolare stromale (SVF) sono state lavate due volte con PBS contenente 150  $\mu$ M di rivastigmina, incubate con tampone di lisi eritrocitaria (155 mM NH<sub>4</sub>Cl, 5,7 mM K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 0,1 mM EDTA, pH 7,3) arricchito di 150  $\mu$ M di rivastigmina e poi centrifugate a 200 rpm per 10 minuti a RT. Il pellet cellulare è stato risospeso con una miscela di MeOH/H<sub>2</sub>O (80:20 v/v) contenente 1 ng/ $\mu$ l bromuro di colina-(metil-13C), utilizzato come standard interno (200 ng/campione) e centrifugato due volte a 12.000 giri/min per 10 *min* a 4 °C per rimuovere i detriti cellulari. Il lisato è stato essiccato sotto flusso di N<sub>2</sub> e risospeso in 5 mM di NH<sub>4</sub>HCOO in H<sub>2</sub>O (pH 7,5) prima dell'iniezione nello spettrometro di massa. La colina e l'Ach sono state quantificate con metodo LC-MS-MS utilizzando una colonna Luna 5  $\mu$ m HILIC 200Å LC (150 x 3 mm). Le fasi mobili per l'analisi sono stati la fase A, 5 mM NH<sub>4</sub>HCOO in H<sub>2</sub>O (pH 7,5) e la fase B, MeOH. La pendenza era T0 5% A, T21min 5% A, T5min 95% A, T5.1min 95% A, T7min 5% A, T15min 5% A con una portata di 500  $\mu$ l/min. I dati sono stati acquisiti su un Sciex Triple

Quad 3500 con un sistema HPLC e un autocampionatore incorporato (tutti da AB Sciex Milano, Italia). Il software MultiQuant (v. 3.0.2; AB Sciex) è stato utilizzato per l'analisi dei dati e per la revisione dei cromatogrammi. L'Ach e la colina sono state quantificate utilizzando una curva standard. I dati sono stati normalizzati in base al peso del tessuto espresso in grammi (g).

### ***3.10 Analisi statistica***

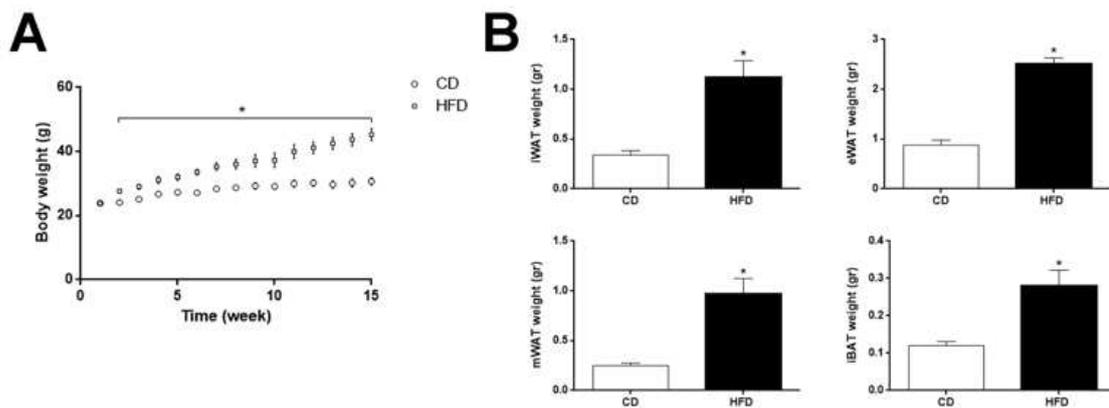
Tutti gli esperimenti sono stati eseguiti in triplicato. I risultati sono riportati come media  $\pm$  errore standard della media (SEM). I confronti tra 2 o più gruppi biologici sono stati eseguiti rispettivamente con il T test di Student e con l'analisi della varianza unidirezionale (ANOVA). Un valore  $P < 0,05$  è stato considerato come una differenza statisticamente significativa. Tutte le analisi statistiche sono state eseguite con il software GraphPad Prism 6.

## Capitolo quarto

### RISULTATI

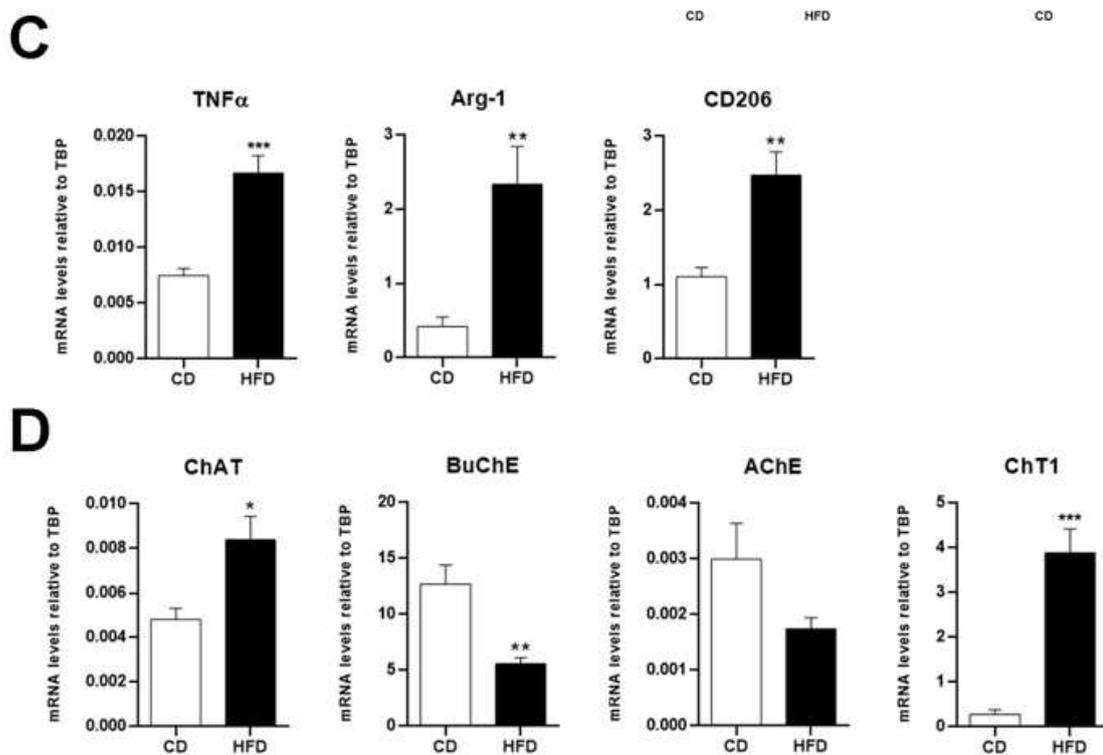
#### *4.1 Nel tessuto adiposo epididimale di topo, l'obesità indotta da dieta influenza l'espressione genica dei markers molecolari del sistema colinergico*

Per valutare se un sistema colinergico non-neuronale si attiva nel WAT di topi con obesità indotta da dieta, topi maschi adulti sono stati alimentati con una dieta iperlipidica (HFD) per 15 settimane. La dieta HFD ha determinato un aumento significativo del peso corporeo (Fig. 1.1 A) e del peso del deposito adiposo viscerale e sottocutaneo (Fig. 1.1 B) rispetto ai topi a dieta normale, di controllo (CD).



**Figura 1.1** Tendenze del peso corporeo nei topi alimentati con una dieta a basso contenuto di grassi (CD) e HFD per 15 settimane (A). Peso dei depositi adiposi viscerali e sottocutanei alla fine dell'esperimento (B).

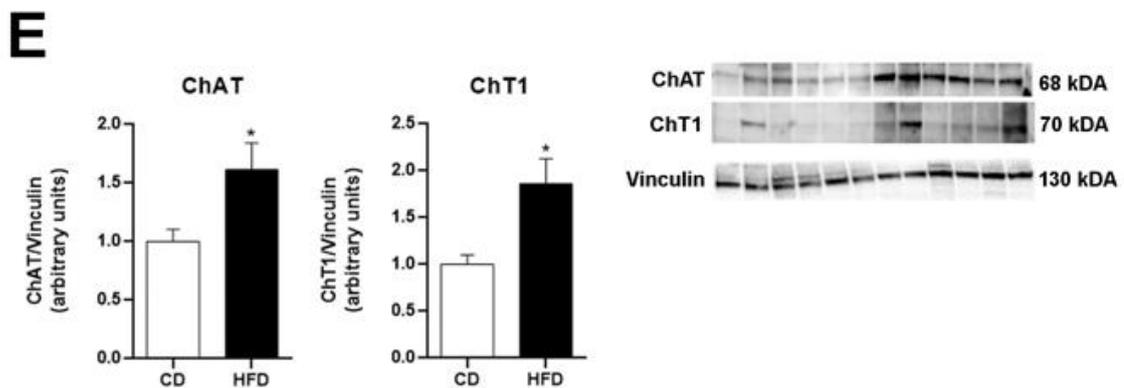
I risultati della qRT-PCR hanno dimostrato nel tessuto adiposo epididimale (eWAT) di topi HFD (rispetto ai topi CD) un'espressione significativamente più elevata di  $TNF\alpha$ , tipica citochina proinfiammatoria (marker dei macrofagi M1), dell'arginasi-1 e del recettore del mannosio-1 (CD206), due marcatori dei macrofagi M2 antinfiammatori [33] (Fig. 1.2 C).



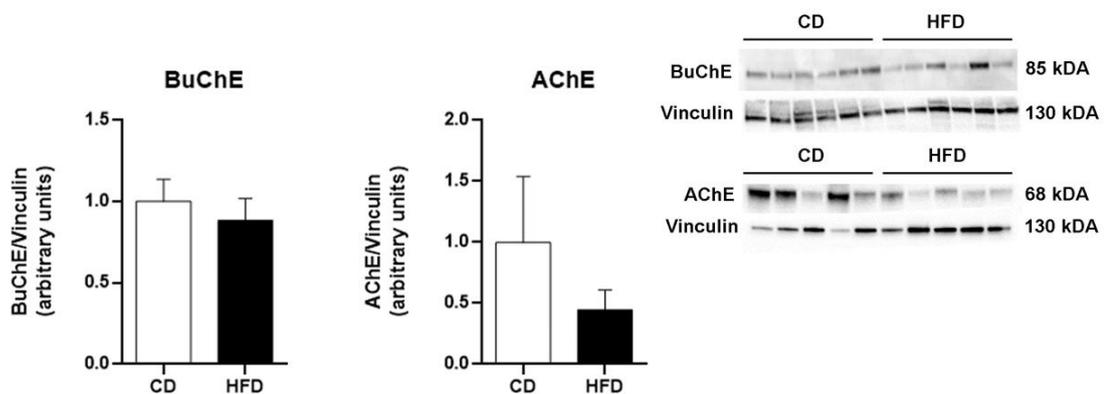
**Figura 1.2** Analisi qRT-PCR di marcatori macrofagici (C) e marker molecolari colinergici (D) in eWAT di topi CD (n = 6) e topi HFD (n = 6).

Questi dati hanno confermato che l'HFD ha determinato una significativa infiltrazione di macrofagi nel tessuto adiposo epididimale. La valutazione dell'espressione genica dei markers molecolari colinergici nell'eWAT ha

rivelato un aumento significativo dell'espressione degli mRNA di ChAT e ChT1 nei topi obesi rispetto ai topi di controllo, e una ridotta espressione degli mRNA di BuChE e AChE (sebbene per quest'ultimo marcatore la differenza non fosse significativa; Fig. 1.2 D). Né il controllo né i topi obesi hanno mostrato valori di mRNA di VACHT rilevabili (dati non mostrati). L'analisi di Western blot ha confermato il significativo aumento dell'espressione di ChAT e ChT1 riscontrata nell'eWAT di topo obeso (Fig. 1.3 E), dove, tuttavia, i livelli della proteina BuChE erano simili a quelli dei topi CD, mentre la proteina AChE ha mostrato una riduzione non significativa (Fig. 1.4).



**Figura 1.3** Immunoblot rappresentativo e quantificazione di ChAT e ChT1 in eWAT di topi CD (n=6) e topi HFD (n=6).

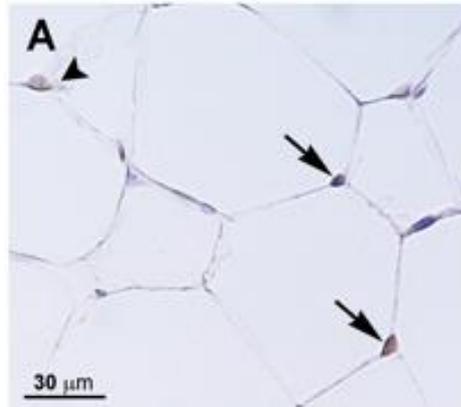


**Figura 1.4** Immunoblot rappresentativo e quantificazione di BuChE e AChE in eWAT di topi CD (n = 6) e HFD (n = 6).

Collettivamente, questi dati mostrano che l'HFD induce cambiamenti molecolari nell'eWAT, che sono coerenti con l'aumento della sintesi di ACh, probabilmente in parallelo con la sua ridotta degradazione. Suggestiscono anche che l'obesità aumenta o promuove l'attivazione del signalling colinergico nell' eWAT. La mancanza di mRNA di VACHT in eWAT è coerente con l'assenza di nervi colinergici nell' eWAT di topo [24]. Tuttavia, ciò non esclude la presenza e/o l'attivazione di un sistema colinergico non neuronale, in cui l'ACh è stata spesso trovata non nelle vescicole ma piuttosto sintetizzata a livello molto basso nel citosol per rilascio diretto [34-36], probabilmente attraverso il trasportatore cationico organico [37].

#### ***4.2 I macrofagi che infiltrano il tessuto adiposo epididimale di topo esprimono la proteina ChAT***

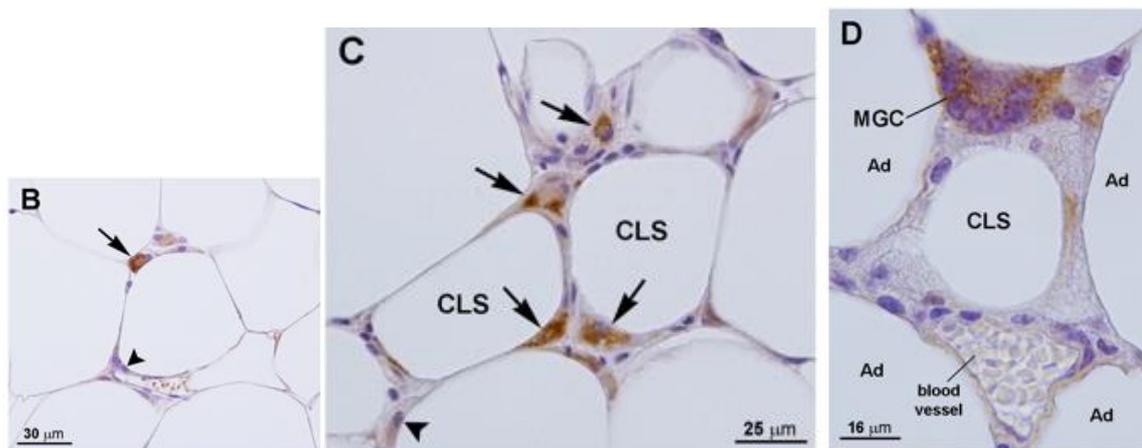
Per identificare le cellule coinvolte in questo presunto sistema colinergico adiposo non-neuronale, sono state dapprima impiegate tecniche immunoistochimiche per valutare l'espressione cellulare e la distribuzione tissutale dei markers molecolari colinergici. Istologicamente, l'eWAT di topi CD ha mostrato la tipica morfologia del tessuto adiposo bianco, mentre l'eWAT dei topi HFD ha mostrato aspetti morfologici caratteristici del tessuto adiposo dei soggetti con obesità, ossia con diversi CLS sparsi nei lobuli di grasso e tra gli adipociti ipertrofici; un numero considerevole di MGC, che si trovavano spesso vicino alle CLS; e un aumento della cellularità non solo nel parenchima ma anche in posizione peri o paravascolare (probabilmente cellule infiammatorie infiltranti). In topi CD, l'immunocolorazione di ChAT era appena rilevabile e poi solo in un piccolo numero di cellule non adipose, che spesso si raggruppavano tra gli adipociti bianchi (Fig. 2.1 A), e nei rari CLS e MGC.



**Figura 2.1** Rilevamento immunoistochimico di ChAT in eWAT di topo da topi CD e HFD.

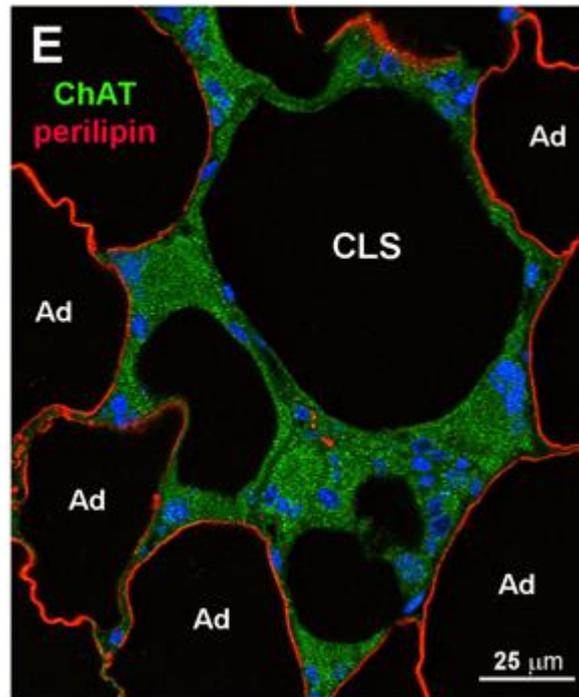
Immunoperossidasi: nei topi CD, la colorazione di ChAT è appena rilevabile in due cellule non adipose trovate tra gli adipociti bianchi (A, frecce).

Nei topi obesi, ChAT è espresso da un numero significativo di cellule infiltranti, che si trovano tra gli adipociti ipertrofici (Fig. 2.2 B), da numerose cellule che formano CLS (Fig. 2.2 C) e dalle MGC (Fig. 2.2 D).



**Figura 2.2** Nei topi HFD, ChAT è chiaramente espresso da una cellula infiltrante localizzata tra gli adipociti ipertrofici (B, freccia), da parte di alcune cellule formanti CLS (C, frecce) e da MGC (D). Le punte di freccia in A, B e C indicano cellule interstiziali negative.

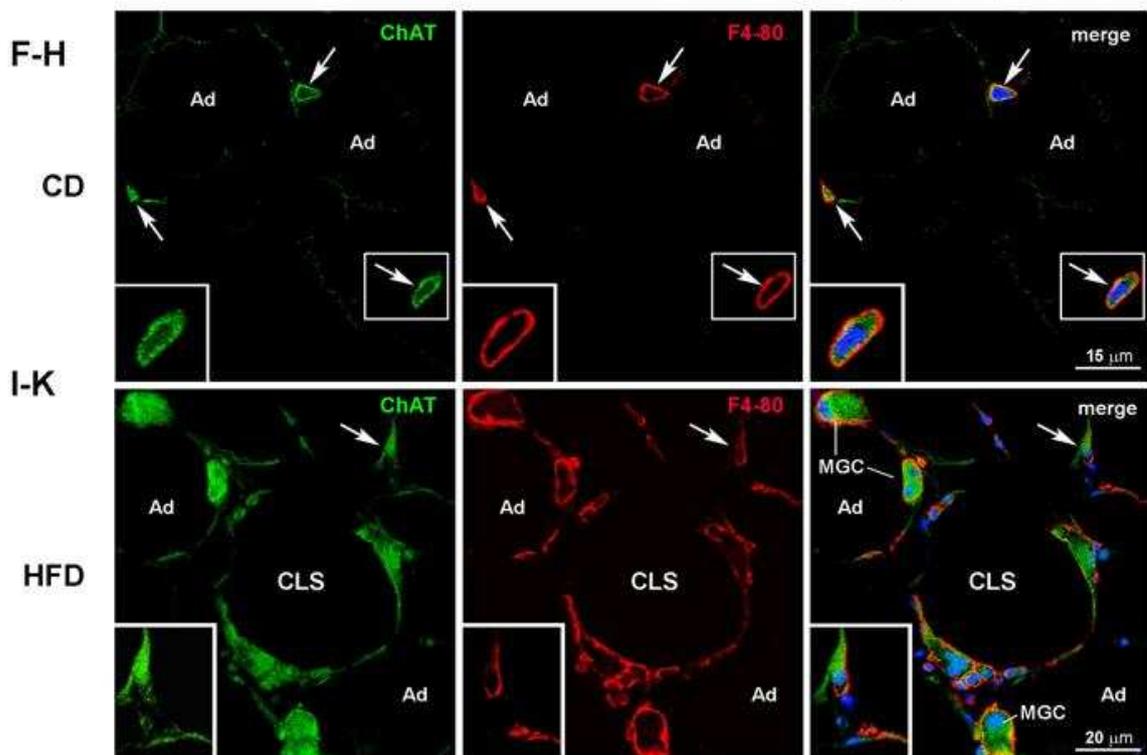
Gli adipociti bianchi non esprimono ChAT in nessuna delle condizioni sperimentali studiate (Fig. 2.3).



**Figura 2.3** Doppia colorazione e microscopia confocale (E) di adipociti perilipina-positivi (rosso) di topo HFD che non esprimono ChAT; si noti l'assenza di colorazione perilipina nel CLS raffigurato nell'immagine, che è formato da cellule ChAT-positive (verde).

Gli esperimenti di doppia colorazione e l'analisi al microscopio confocale hanno rivelato che nei topi CD praticamente tutte le cellule ChAT-positive infiltranti il parenchima adiposo erano anche positive per il marcatore di superficie delle cellule macrofagiche F4-80 [40] (Fig. 2.4 F-H), identificandole così come macrofagi interstiziali residenti. In netto contrasto, nei topi obesi HFD solo il  $67,79\% \pm 4,37$  delle cellule interstiziali ChAT-positive erano

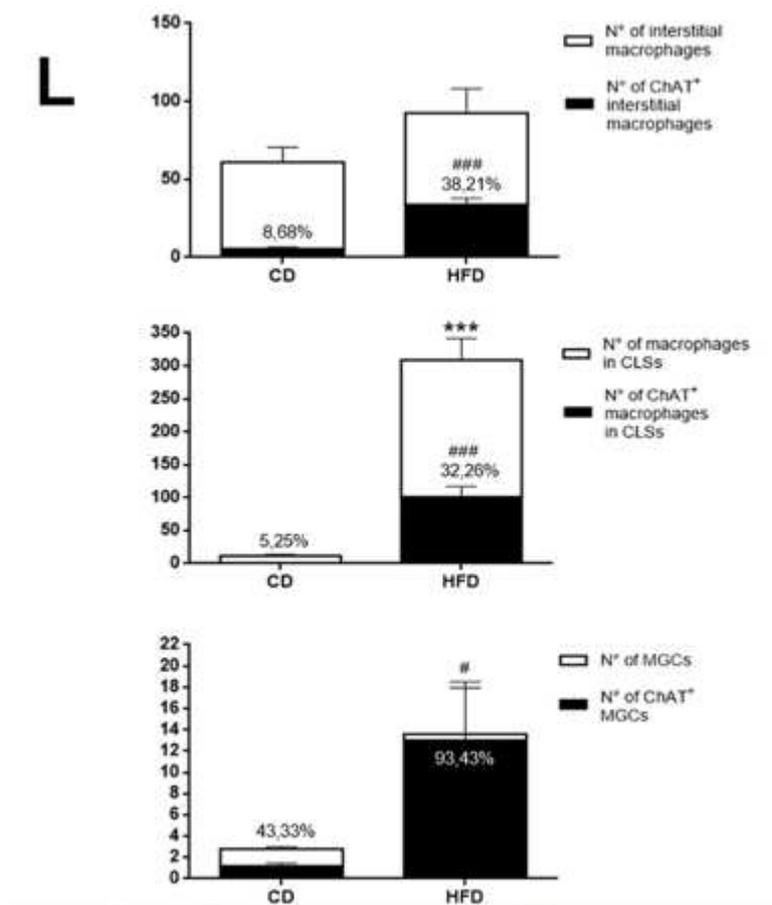
macrofagi F4-80-positivi (Fig. 2.4 I-K); questo dà supporto alla possibilità che nel tessuto adiposo dei topi in HFD altre cellule infiltranti, oltre ai macrofagi, acquisiscano la capacità di sintetizzare ACh.



**Fig. 2.4** Microscopia confocale: in un topo CD (F-H), tre cellule infiltranti ChAT-positivo (verdi, frecce) sono positive anche per il marcatore pan-macrofagico di superficie F4-80 (rosso, frecce); in un topo HFD (I-K) viene rilevata una colorazione specifica di ChAT (verde) in una cellula infiltrante F4-80-positiva (rosso, freccia) e in macrofagi F4-80-positivi che formano un CLS e tre MGC. Ad: adipocita.

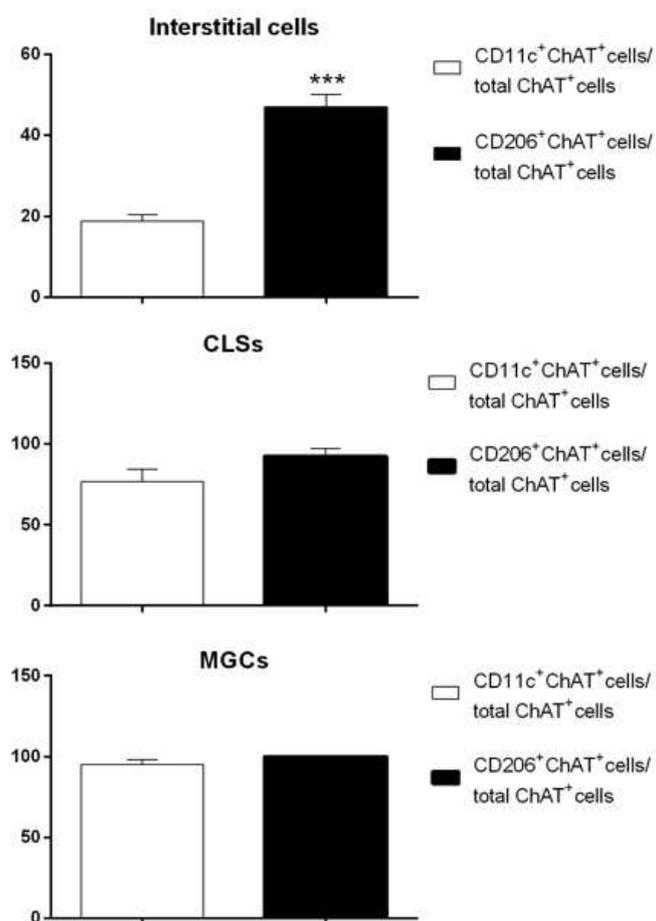
I riquadri sono ingrandimenti delle aree incorniciate corrispondenti.

Le analisi morfometriche hanno anche mostrato che nei topi CD l'8,68%  $\pm$  il 3,88 dei macrofagi interstiziali F4-80-positivi, il 5,25%  $\pm$  2,48 dei macrofagi F4-80-positivi associati a CLS e il 43,33%  $\pm$  6,66 delle MGC F4-80-positivo erano positivi anche per ChAT, mentre nei topi HFD l'espressione di ChAT è stato rilevato nel 38,21%  $\pm$  3,04 dei macrofagi interstiziali F4-80-positivi, nel 32,26%  $\pm$  1,65 dei macrofagi F4-80-positivi associati a CLS e nel 93,42%  $\pm$  4,69 delle MGC F4-80-positivo (Fig. 2.5 L).



**Fig. 2.5 L** Percentuali dei macrofagi interstiziali F4-80-positivi, macrofagi associati a CLS F4-80 positivi e MGC F4-80 positivi che sono anche positivi per ChAT in eWAT di topi CD (n = 5) e HFD (n = 5).

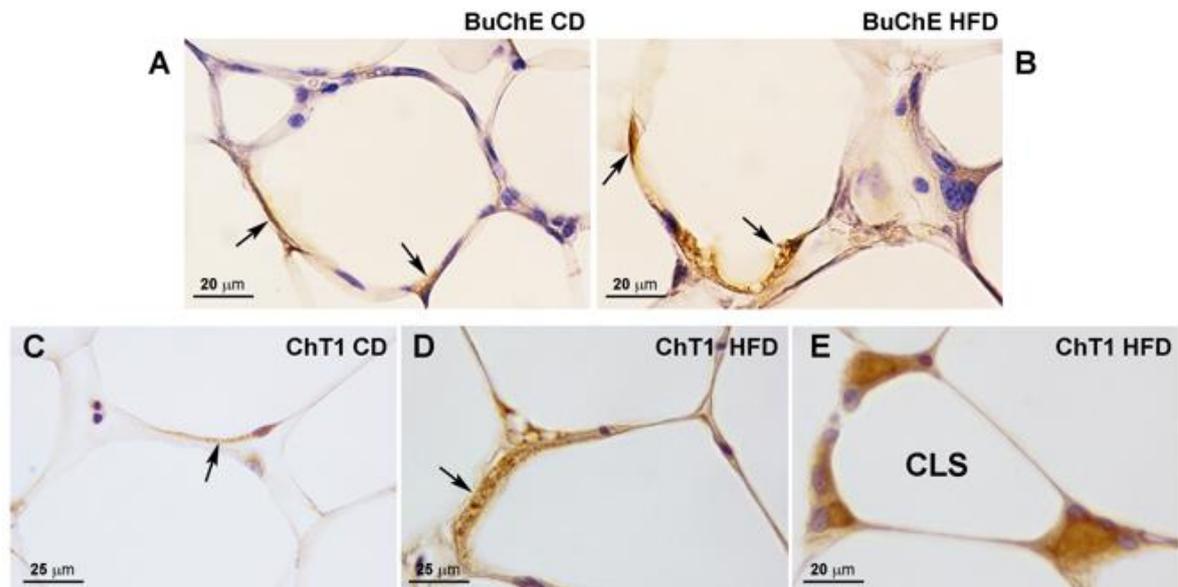
Poiché nell'obesità patologica il WAT è infiltrato da macrofagi derivati dal midollo osseo che mostrano un fenotipo proinfiammatorio M1[10,33], è stata valutata la percentuale di cellule ChAT-positive che esprimono anche il marcatore del macrofago M1-proinfiammatorio ossia il CD11c o il CD206, marcatore del macrofago antinfiammatorio M2. Nell'eWAT di topi obesi sono state rilevate percentuali simili di macrofagi M1 e M2 ChAT-positivi che formano CLS e MGC, mentre i macrofagi interstiziali ChAT-positivi mostravano in gran parte il fenotipo antinfiammatorio M2 (Fig. 2.6).



**Fig.2.6** Percentuale di cellule interstiziali, CLS e MGC ChAT-positive che esprimono il marcatore macrofagico proinfiammatorio CD11c M1 (barre bianche) o il marcatore macrofagico antinfiammatorio CD206 M2 (barre nere) in eWAT di topi HFD (n = 5).

Sebbene non siano stati trovati anticorpi primari adatti a rilevare l'AChE mediante immunistochemica, è stata trovata un'espressione simile di BuChE negli adipociti di topi CD e HFD, senza differenze evidenti tra le due condizioni, in linea con i dati ottenuti attraverso Western blotting (Fig 2.7). Al contrario, mentre ChT1 era scarsamente espresso in alcuni adipociti nei topi

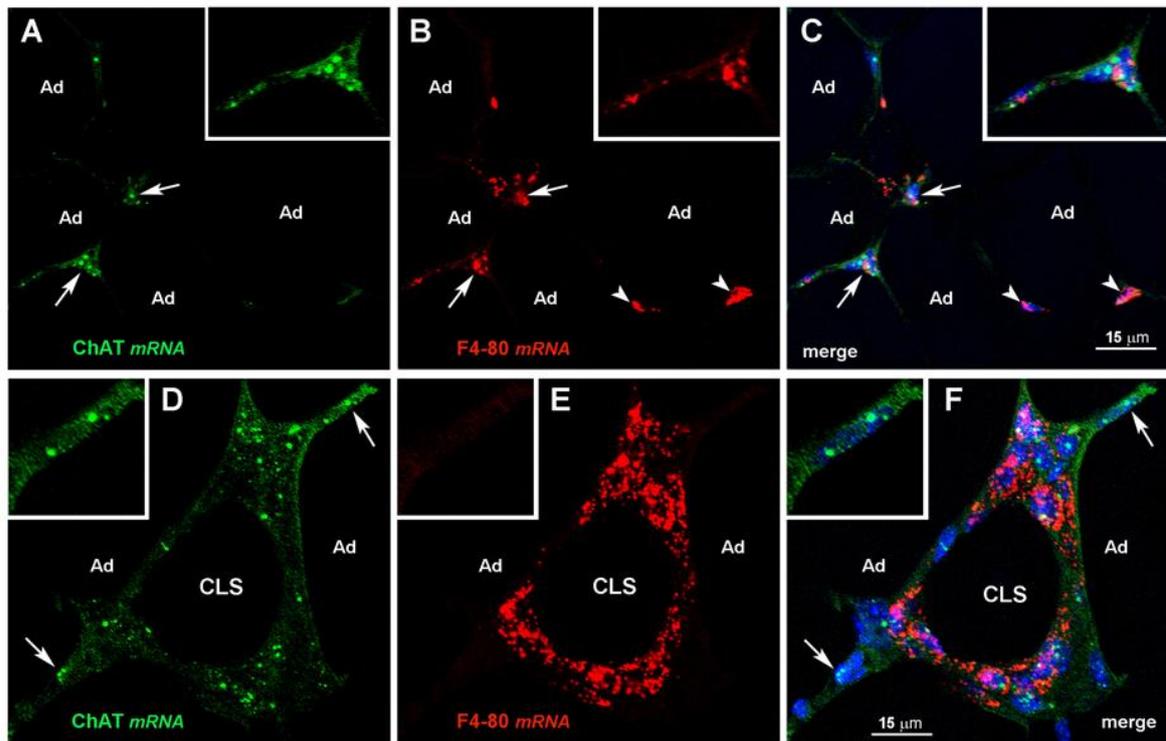
CD, era fortemente espresso da adipociti ipertrofici e da numerosi macrofagi di topi HFD (Fig. 2.7). Questi risultati hanno confermato il marcato aumento dell'espressione di questo marcatore colinergico identificato nei topi obesi mediante qRT-PCR e analisi Western blot.



**Fig. 2.7** Espressione di BuChE e ChT1 in eWAT murini di topi CD e HFD. Immunoperossidasi: l'immunoreattività di BuChE viene rilevata lungo porzioni limitate del bordo citoplasmatico di adipociti bianchi (freccie) sia nei topi CD (A) che HFD (B). In un topo CD (C), l'immunocolorazione di ChT1 è appena rilevabile nel bordo citoplasmatico di un adipocita (freccia); al contrario, in un topo HFD la colorazione di ChT1 è fortemente espressa dagli adipociti ipertrofici (D, freccia) e dai macrofagi che formano CLS (E).

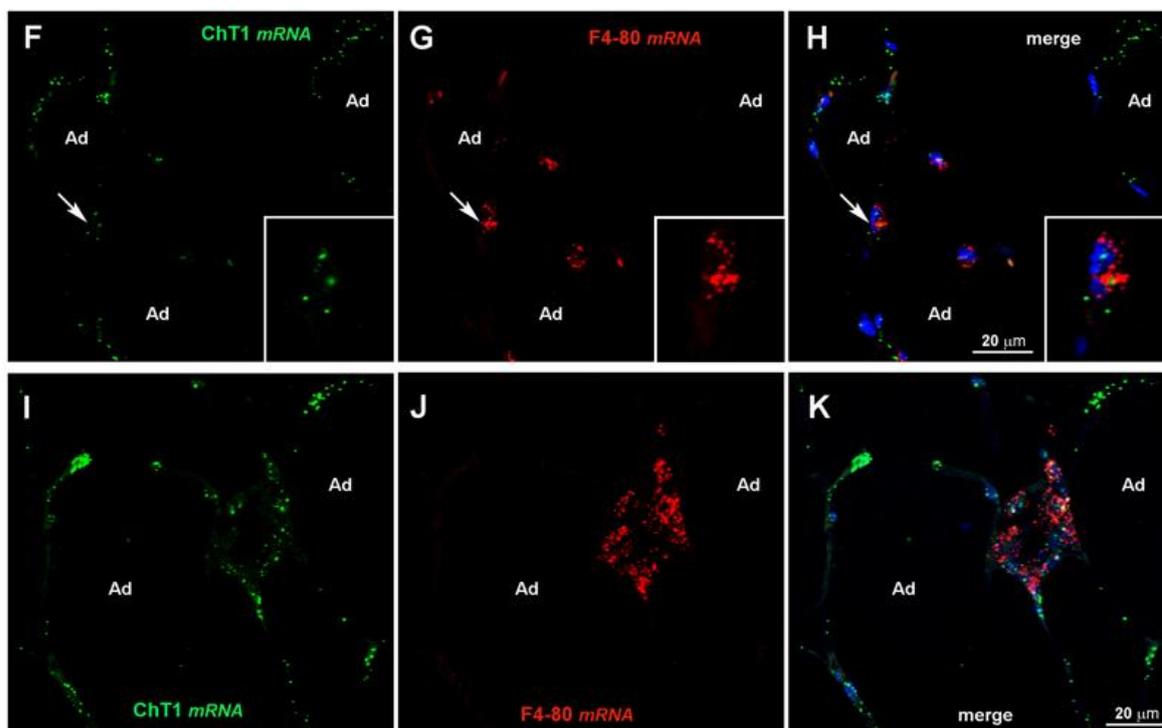
### ***4.3 I macrofagi che infiltrano il tessuto adiposo epididimale di topo esprimono l'mRNA di ChAT***

Ulteriori conferme, sul fatto che un certo numero di cellule non adipose nell'eWAT esprima la proteina ChAT e che sia potenzialmente in grado di sintetizzare ACh, sono state ricercate valutando l'espressione dell'mRNA di ChAT nell'eWAT di topi CD e HFD, attraverso l'ibridazione *in situ*. Mentre nei topi CD l'mRNA di ChAT è stato rilevato solo in un numero ristretto di macrofagi interstiziali F4-80-positivi (Fig. 3.1 A-C), nei topi HFD è stato espresso da un numero considerevole di macrofagi interstiziali F4-80-positivi e macrofagi che formano CLS o MGC (Fig.3.1 D-F). Come si evince dagli esperimenti immunostochimici, nell'eWAT di topi obesi alcune cellule trovate tra gli adipociti ipertrofici, erano positive per l'mRNA di ChAT ma non per l'mRNA di F4-80 ( riquadro di Fig.3.1 D-F). Gli esperimenti di ibridazione *in situ* hanno anche confermato che i macrofagi e gli adipociti ipertrofici hanno una maggiore espressione di ChT1 nei topi obesi rispetto a quelli CD (Fig. 3.2).



**Fig 3.1** Rilevazione di mRNA di ChAT in eWAT di topi CD e HFD mediante ibridazione *in situ*.

Ibridazione dell'RNA *in situ*: in un topo CD (A-C), l'mRNA di ChAT (verde) è rilevato in due cellule interstiziali contenenti anche mRNA di F4-80 (rosso, frecce); il macrofago che si trova nell'angolo in basso a sinistra è ingrandito nel riquadro. Si notino le due cellule interstiziali contenenti mRNA di F4-80 (B, rosso, punte di freccia) ma non l'mRNA di ChAT. Nei topi HFD (D-F), l'mRNA di ChAT (verde) viene rilevato in diversi macrofagi F4-80-positivi che formano CLS (rosso). Si notino le due cellule infiltranti che esprimono l'mRNA di ChAT (verde, frecce) ma non l'mRNA di F4-80.

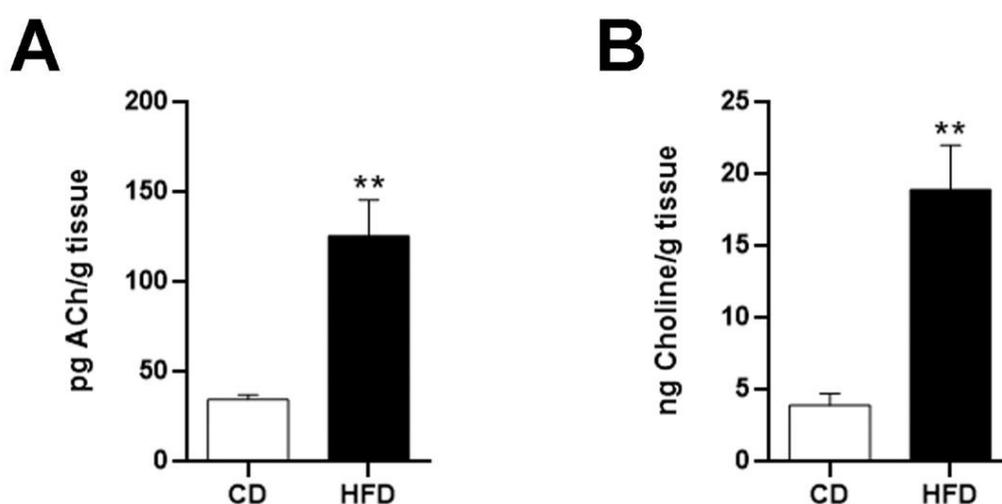


**Fig. 3.2** Ibridazione di RNA *in situ*: in un topo CD (F-H), una piccola quantità di mRNA di ChT1 si trova in alcuni adipociti, mentre in un topo HFD l'mRNA di ChT1 è più abbondante negli adipociti bianchi ed è rilevabile anche nei macrofagi contenenti mRNA di F4-80.

#### ***4.4 Il tessuto adiposo epididimale di topi obesi contiene livelli più alti di acetilcolina e colina***

Successivamente, è stata quantificata l'Ach e la colina nella SVF dell'eWAT di topi CD e HFD utilizzando LC-MS-MS. La frazione vascolare stromale del tessuto adiposo non contiene adipociti completamente differenziati ma è ricco di cellule interstiziali, endoteliali, progenitrici e, soprattutto, cellule immunitarie infiltranti [41]. Risultati normalizzati per il peso dei tessuti (g)

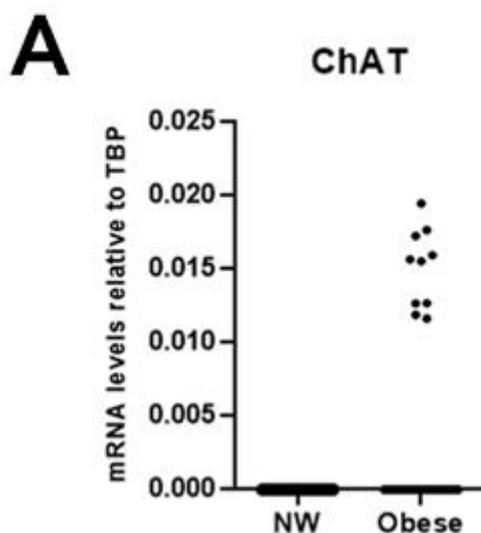
hanno dimostrato la presenza di Ach e colina nel SVF di topi CD (34.75 ± 2.479 pg/g e 3,95 ± 0,81 ng/g, SEM medio, rispettivamente). Tuttavia, nella SVF dei topi HFD, l'Ach è quasi quadruplicata (125,78 ± 20,17 pg/g, media SEM;  $p < 0,05$ ) (Fig. 4.1 A), mentre la colina era circa 4,7 volte superiore (18.95 ± 3.072 ng/g, media SEM;  $p < 0,05$ ) (Fig. 4.1 B). Collettivamente, questi dati mostrano che l'eWAT di topo presenta un sistema colinergico non-neuronale macrofago-dipendente. In topi sani il sistema gioca funzioni omeostatiche ancora non identificate, ma è significativamente presente e attivato nell'obesità morbosa.

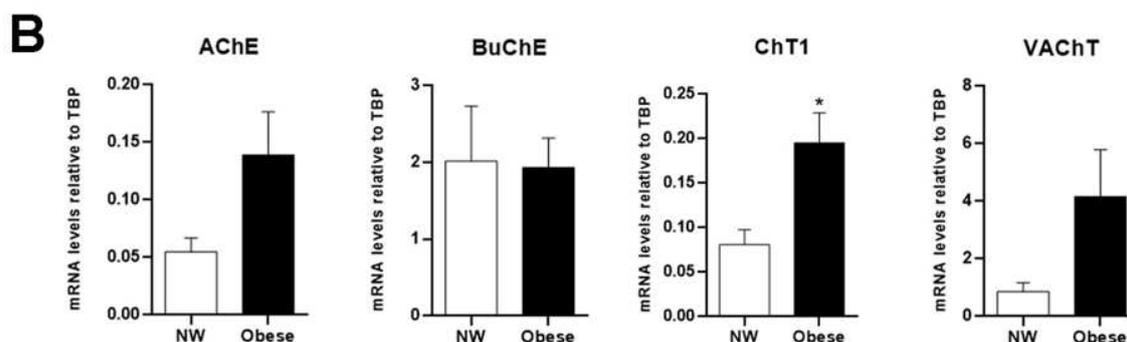


**Fig. 4.1** Analisi LC-MS-MS della SVF ottenuta da eWAT di topi CD e HFD. I livelli di Ach (A) e di colina (B) sono stati misurati in 4 campioni di SVF per condizione sperimentale; ogni campione è stato ottenuto raggruppando eWAT di 5 topi.

#### ***4.5 Il tessuto adiposo omentale di soggetti con obesità è infiltrato da macrofagi che esprimono la ChAT***

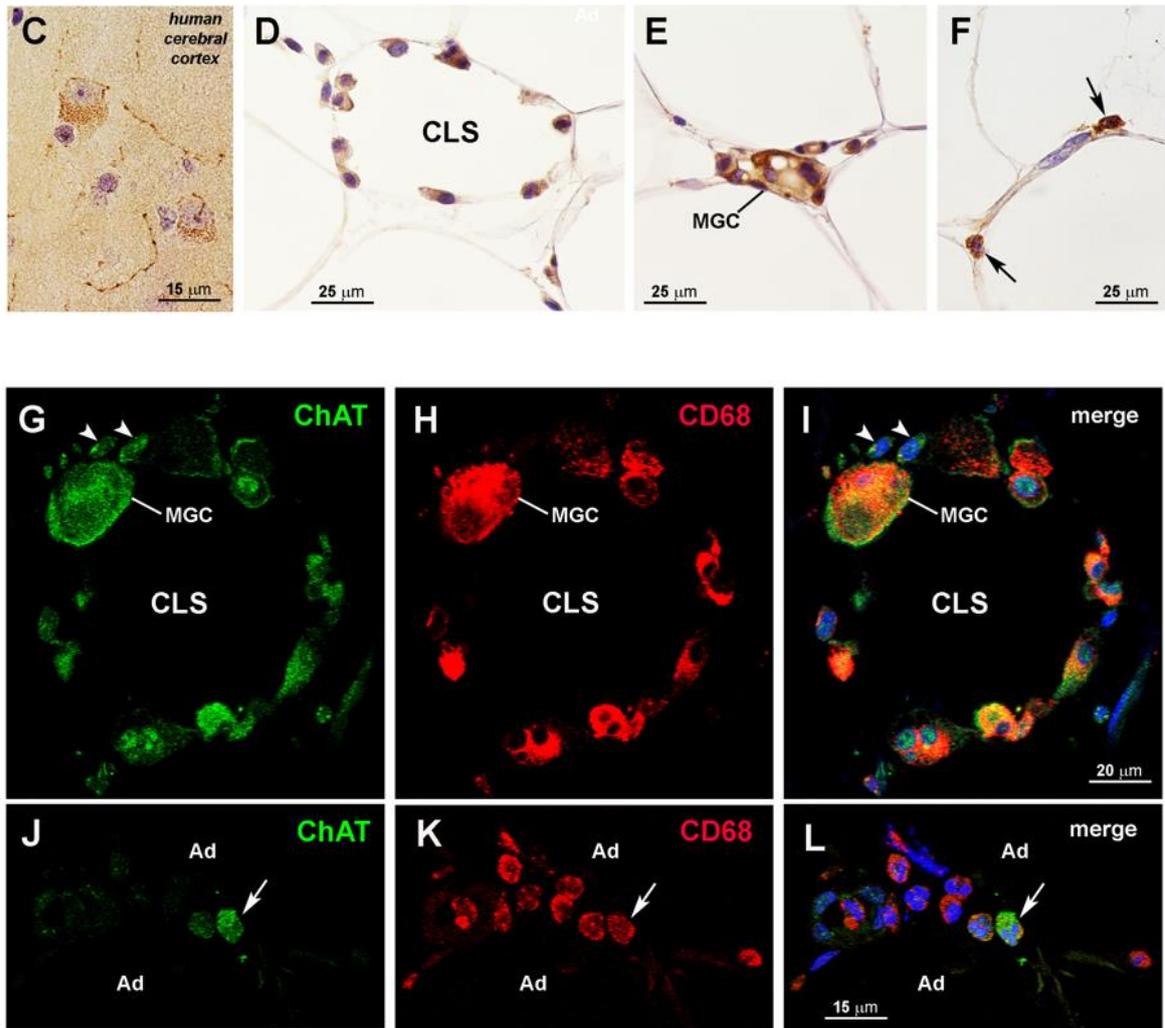
In una prospettiva traslazionale, è stato poi valutato se il sistema colinergico non-neuronale fosse presente anche nel WAT viscerale umano. In primo luogo, sono stati valutati i marcatori colinergici nel tessuto adiposo omentale umano mediante qRT-PCR. ChAT non è stato rilevato in nessuno dei soggetti sani (n=10), mentre è stato rilevato in 10 dei 31 individui obesi (Fig. 5.1 A). Rispetto ai pazienti sani, i pazienti obesi hanno mostrato un'espressione di AChE più elevata, anche se non significativa, livelli di BuChE invariati e, come osservato nei tessuti di topo, un aumento significativo dell'mRNA di ChT1. È interessante notare che, in netto contrasto con l'eWAT del topo, VACht è stato rilevato nel tessuto adiposo omentale, seppur la sua espressione è bassa e non significativamente più alta nei soggetti obesi (Fig. 5.1 B).





**Fig. 5.1** Presenza di un sistema colinergico non-neuronale nel tessuto adiposo di soggetti obesi. Analisi qRT-PCR di ChAT (A) e gli altri markers molecolari colinergici (B) in WAT omentale NW (NW; n=10) e soggetti obesi (n=31).

Anche se non sono stati trovati anticorpi correttamente funzionanti sulle sezioni di paraffina per rilevare AChE, BuChE e ChT1 con l'immunoistochimica, è stato utilizzato un anticorpo primario per detectare la ChAT umana, come dimostrato dalla sua colorazione specifica dei neuroni colinergici e proiezioni della corteccia cerebrale umana (Fig. 5.2 C). L'anticorpo non ha mai prodotto specifiche colorazioni di ChAT in sezioni di tessuto adiposo omentale di soggetti sani. Al contrario, ha colorato alcuni macrofagi CD68-positivi che formano le CLS (Fig. 5.2 D e G-I), le MGC (Fig. 5.2 E e G-I) ed alcuni macrofagi interstiziali trovati tra gli adipociti (Fig. 5.2 F e J-L) in 16 dei 31 pazienti obesi, anche se con notevole variabilità nel grado di positività.

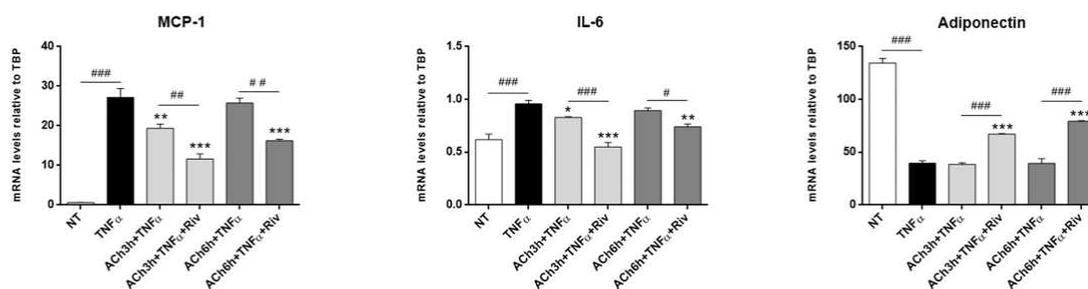


**Fig 5.2** Immunoperossidasi: viene rilevata una colorazione specifica di ChAT nei neuroni corticali cerebrali umani (C), utilizzati come controllo positivo; nel tessuto adiposo omentale di pazienti obesi, la colorazione di ChAT si riscontra nei macrofagi che formano CLS (D) e MGC (E) e in due cellule infiltranti (F, frecce). Microscopia a doppia colorazione e confocale (G-I): i macrofagi ChAT-positivi che formano CLS e MGC (verde) sono positivi anche per il marcatore macrofagico CD68 (rosso). Si notino due cellule ChAT-positive che tuttavia non sono positive, o molto debolmente positive per CD68 (punte di freccia). H-L: in un piccolo gruppo di macrofagi CD68-positivi (rossi) infiltranti il tessuto adiposo omentale in un soggetto obeso, una singola cellula (verde) è positiva anche per ChAT (freccia).

Un'analisi retrospettiva ha identificato i macrofagi ChAT-positivi, CLS e/o MGC in 7 dei 10 pazienti in cui la ChAT era stata rilevata da qRT-PCR e in 9 dei 22 pazienti in cui l'mRNA di ChAT era inosservabile. Non sono state trovate correlazioni significative tra la presenza e il numero di ChAT che esprimono macrofagi CD68 positivi ed età, sesso o BMI (non mostrati). Collettivamente, questi dati sono a sostegno della possibilità che anche nell'uomo – seppur con un'elevata variabilità che può dipendere dalla posizione anatomica del deposito adiposo, il sito di raccolta dei campioni e la durata e la gravità dell'obesità – è presente un sistema colinergico non-neuronale dipendente dai macrofagi che si attiva nel tessuto adiposo in corso di infiammazione che caratterizza l'obesità.

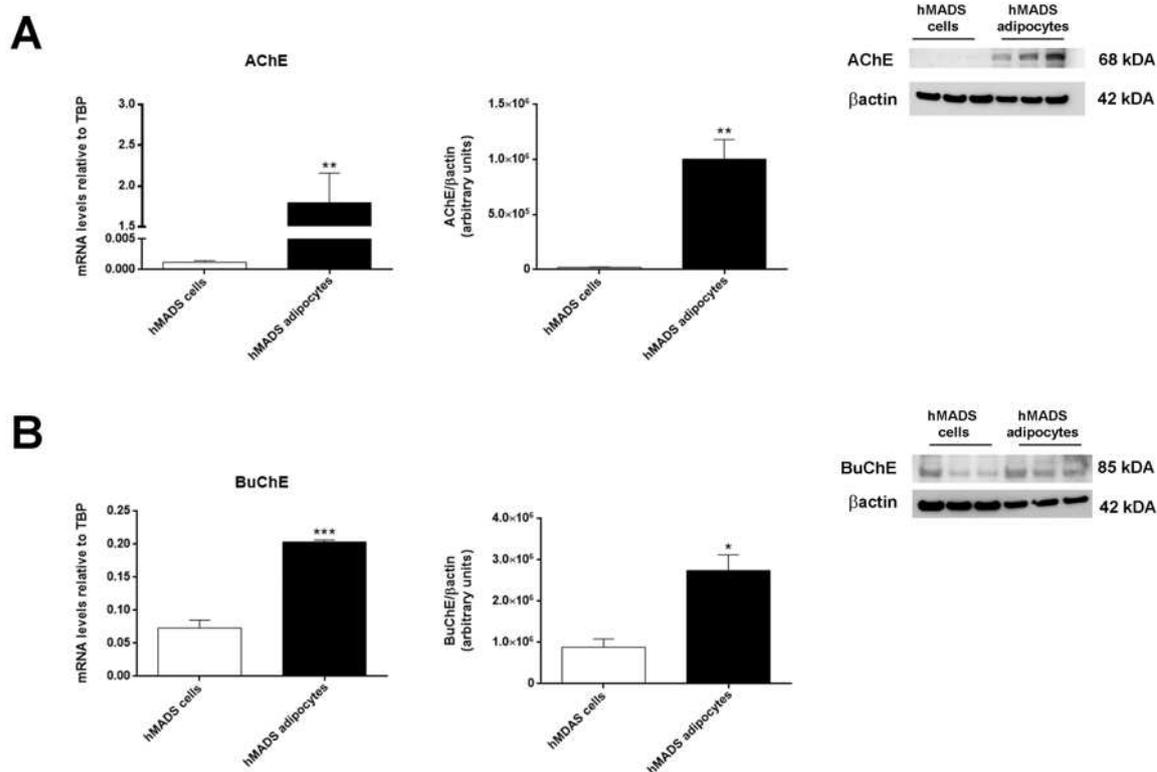
#### ***4.6 L'acetilcolina attenua, in adipociti umani in coltura, lo stato infiammatorio e migliora l'insulino-resistenza indotta da TNF $\alpha$***

I risultati sopra descritti suggeriscono che, in condizioni obesogene, il tessuto adiposo viscerale nel topo e probabilmente nell'uomo, è infiltrato da una popolazione di macrofagi che esprimono ChAT e che sono in grado di sintetizzare e rilasciare ACh, che diffondendosi in modo paracrino, può agire sugli adipociti e influenzare il loro metabolismo. Pertanto, abbiamo studiato sugli adipociti umani in coltura (hMADS), alcuni effetti biologici dell'ACh dove è stato indotto uno stato infiammatorio in seguito al trattamento con TNF $\alpha$  per 24 ore. Come previsto, TNF $\alpha$  ha indotto un aumento significativo dell'espressione della proteina chemoattrattiva monocitaria 1 (MCP-1), il principale fattore chemiotattico coinvolto nell'infiltrazione delle cellule infiammatorie nel tessuto adiposo obeso [42], e della citochina proinfiammatoria interleuchina (IL)-6, mentre ha ridotto significativamente l'espressione genica dell'adiponectina, ormone insulino-sensibilizzante (Fig. 6.1 A). Il trattamento con ACh per 3 o 6 ore ha significativamente attenuato gli effetti del TNF $\alpha$  sull'espressione di MCP-1 e IL-6, mentre non ha modificato l'espressione dell'adiponectina (Fig. 6.1 A).

**A**

**Fig. 6.1** Effetti dell'ACh antinfiammatori e promotori dell'insulina negli adipociti hMADS. A: Livelli di mRNA di MCP 1, IL-6 e adiponectina negli adipociti hMADS trattati per 24 ore con 10 ng/ml di TNF $\alpha$ , da solo o in combinazione con ACh 1 nM, con/senza rivastigmina 1 nM per 3 o 6 ore. Dati (da 3 esperimenti indipendenti) espressi come media  $\pm$  SEM; \*\*P<0,01, \*\*\*P<0,001 rispetto al trattamento con TNF $\alpha$ , #P<0,05, ## P<0,01, ### P<0,001 tra gruppi biologici come indicato dalla linea. Dati analizzati utilizzando ANOVA unidirezionale.

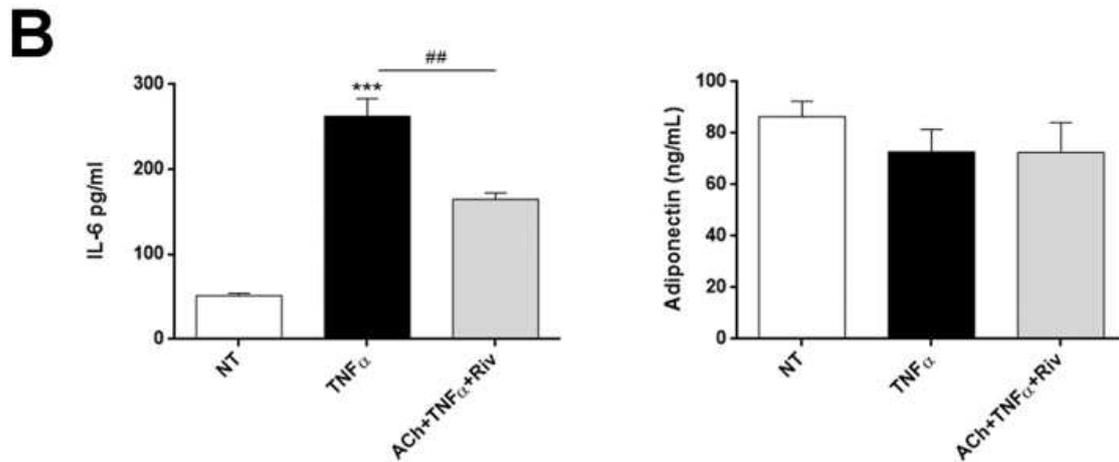
Tuttavia, come la maggior parte delle cellule di mammifero, anche gli adipociti hMADS esprimono quantità significative di AChE e BuChE, rilevabili sia come mRNA che come proteine (Fig. 6.2).



**Fig. 6.2** Espressione di AChE e BuChE negli adipociti hMADS. Analisi qRT-PCR (pannelli di sinistra), immunoblot rappresentativi e quantificazione (pannelli di destra) dell'espressione di AChE (A) e BuChE (B) nelle cellule hMADS (barre bianche) e negli adipociti hMADS (barre nere). I dati (da 3 campioni) sono mostrati come media  $\pm$  SEM; \*\* $P < 0,01$ , \*\*\* $P < 0,001$  rispetto a cellule hMADS. I dati sono stati analizzati utilizzando il test t di Student.

Così il trattamento degli adipociti hMADS con ACh e rivastigmina (un inibitore di AChE e BuChE che può prevenire la degradazione dell'ACh), ha attenuato gli effetti infiammatori indotti dal  $TNF\alpha$  riducendo l'espressione di MCP-1 e IL-6 in misura ancora maggiore e ha anche aumentato significativamente l'espressione dell'mRNA dell'adiponectina (Fig. 6.1 A).

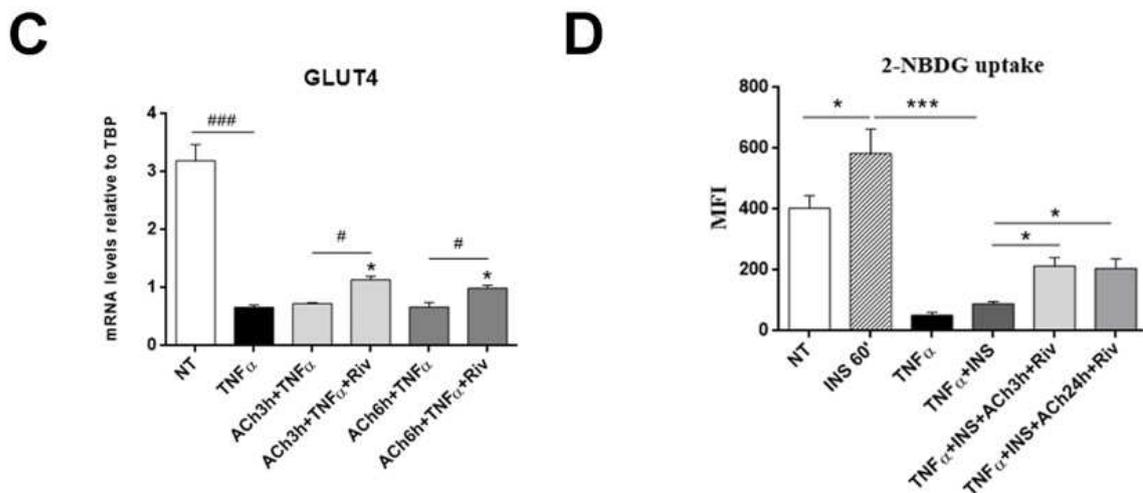
Il test ELISA, eseguito in surnatanti delle stesse colture cellulari, ha confermato che il trattamento con ACh e la rivastigmina ha ridotto significativamente l'aumento della secrezione di IL-6 negli adipociti hMADS stressati da TNF $\alpha$  ma non ha modificato la secrezione di adiponectina (Fig. 6.3 B).



**Fig 6.3** Concentrazioni di IL-6 e adiponectina misurate mediante ELISA nei supernatanti di colture cellulari. I dati (da 3 esperimenti indipendenti) sono espressi in media  $\pm$  SEM; \*\*\*P<0,001 rispetto alle cellule non trattate (NT) ## P<0,01, #tra gruppi biologici come indicato dalla linea. Dati analizzati utilizzando ANOVA unidirezionale.

Gli mRNA di IL-1 $\beta$  e leptina sono aumentati significativamente negli adipociti hMADS stressati da TNF $\alpha$ , ma ACh e/o ACh in combinazione con rivastigmina non ne modificano l'espressione (dati non visualizzati). Negli adipociti hMADS il trattamento con TNF $\alpha$  per 24 ore ha anche ridotto l'espressione dell'mRNA di GLUT4, che non è stata modificata dal trattamento con ACh per 3 o 6 ore, ma è stata significativamente ripristinata dal trattamento con ACh e

rivastigmina per 3 o 6 ore (Fig. 6.4 C). Infine, il trattamento con TNF $\alpha$  24 ore ha provocato una riduzione drastica dell'assorbimento di glucosio da parte delle hMADS, indotto dal trattamento insulinico di 60 minuti, ma il trattamento con ACh e rivastigmina per 3 o 24 ore ne ha migliorato significativamente l'assorbimento (Fig. 6.4 D).



**Fig. 6.4 C:** Livelli di mRNA di GLUT4 negli adipociti hMADS trattati per 24 ore con 10 ng/ml TNF $\alpha$ , da solo o in combinazione con 1 nM ACh, con/senza rivastigmina 1 nM per 3 o 6 ore. I dati (da 3 esperimenti indipendenti) sono espressi in media  $\pm$  SEM; \* P<0,05, rispetto alle cellule trattate con TNF $\alpha$ ; # P<0,05, ### P<0,001 tra i gruppi biologici come indicato dalla linea. I dati sono stati analizzati utilizzando ANOVA unidirezionale. **D:** assorbimento di 2-NBDG, espresso come intensità media di fluorescenza (MFI), negli adipociti hMADS (NT) non trattati e negli adipociti hMADS trattati con insulina 100 nM per 20 minuti; 10 ng/ml di TNF $\alpha$  per 24 ore; con TNF $\alpha$  e insulina; o con TNF $\alpha$ , insulina, 1 nM ACh e rivastigmina 1 nM per 3 o 24 ore. I dati (da 3 esperimenti indipendenti) sono espressi come media  $\pm$  SEM; \*P<0,05, \*\*\*P<0,001 tra gruppi biologici come indicato dalla linea. I dati sono stati analizzati utilizzando un metodo unidirezionale ANOVA.

## Capitolo quinto

### DISCUSSIONE

#### *5.1 Discussione dei risultati*

Nei roditori e nell'uomo, gli adipociti bianchi esprimono un pattern complesso, eterogeneo ed evoluto di recettori mAChR e nAChR, modulato da una serie di fattori fisiopatologici, tra cui il freddo e l'obesità [13-21]. Tuttavia, poiché il WAT manca di innervazione colinergica parasimpatica [24], l'ACh che agisce sugli adipociti non può essere di origine neuronale, ma deve essere sintetizzata e secreta dalle cellule non neuronali presenti nel WAT. È improbabile che il sangue sia la fonte di ACh endogena, poiché una significativa attività della colinesterasi nelle cellule del plasma, negli eritrociti, nel fegato e nel polmone la mantiene a livelli quasi impercettibili, per impedire che l'ACh possa fuoriuscire ed agire in modo diffuso, come un ormone [22,25-27]. Questa tesi dimostra come l'eWAT del topo sia dotato di un sistema colinergico non-neuronale in cui i macrofagi, nei tessuti sani e, soprattutto, in quelli con obesità patologica, possiedono e/o acquisiscono la capacità di esprimere la ChAT (mRNA e proteina), l'enzima che guida la sintesi dell'ACh. È interessante notare che nei topi obesi una consistente popolazione di cellule infiltranti ChAT-positive non è positiva per F4-80, una glicoproteina espressa in un ampio range di macrofagi del tessuto maturo ed è considerato un marcatore

pan-macrofagico [40]. Ciò solleva l'interessante possibilità che altri tipi di cellule, come linfociti e/o granulociti, possano avere la capacità di sintetizzare e secernere ACh nel tessuto adiposo infiammato dei soggetti obesi. Collettivamente, questi dati, insieme alla concentrazione di ACh, significativamente più elevata riscontrata nella SVF dei topi obesi rispetto a quelli normopeso, evidenziano la presenza di un sistema colinergico non-neuronale immunomediato nell'eWAT che è funzionalmente attivato dall'infiammazione indotta da obesità. Questa indagine è stata condotta su eWAT di topo per tre motivi principali. Anche se recenti studi sulle singole cellule hanno evidenziato una limitata sovrapposizione di adipociti umani e murini e depositi adiposi in condizioni normali e obese [43,44], il deposito di tessuto adiposo epididimale dei roditori è il più simile a quello viscerale umano, che condivide un'elevata suscettibilità all'infiltrazione dei macrofagi e fornisce una fonte di mediatori infiammatori che contribuiscono notevolmente alle complicanze metaboliche correlate all'obesità [4,5]. Inoltre, l'eWAT dei roditori è un grande deposito di tessuto adiposo completamente sezionabile, che può essere isolato senza contaminazione da organi/strutture adiacenti [45]. Infine, l'organizzazione anatomica dell'eWAT del topo è tale che, a differenza dei depositi adiposi mesenterici, parametrali e sottocutanei, non è attraversato da nervi colinergici motori o parasimpatici che hanno come bersaglio strutture

somatiche o viscerali adiacenti. Inoltre, non contiene né linfonodi né focolai permanenti di tessuto linfatico [46], che, esprimendo molecole coinvolte nella trasmissione colinergica, potrebbero interferire con lo studio delle molecole coinvolte nel signalling del sistema colinergico. I dati mostrati supportano l'ipotesi che nel WAT viscerale dei soggetti obesi, un gran numero di macrofagi, CLS e MGC – più numerosi nei topi che nell'uomo – sintetizzano e secernono ACh, che diffondendosi attraverso lo spazio extracellulare potrebbe influenzare il metabolismo degli adipociti. In linea con gli studi condotti con specifici agonisti dell'AChR in colture murine e umane di adipociti [14-19], è stato visto che l'ACh esercita effetti antinfiammatori e promuove la sensibilità all'insulina negli adipociti hMADS stressati dal trattamento con TNF $\alpha$ . È interessante notare come il blocco causato dalla rivastigmina dell'attività idrolitica di AChE e BuChE, che sono espressi dagli adipociti bianchi, aumenti gli effetti benefici. Mentre l'espressione di questi enzimi, da parte degli adipociti, concorda con la nozione che essi sono bersaglio dell'ACh, suggerisce inoltre che il potenziamento selettivo della segnalazione colinergica attraverso la riduzione delle attività di AChE e/o BuChE potrebbe fornire un nuovo approccio all'obesità patologica. Gli effetti dell'ACh secreta dalle cellule infiammatorie nel WAT possono contribuire all'eterogeneità morfologica e metabolica degli adipociti nel tessuto adiposo obeso, in cui spesso sono

frequenti adipociti dall'aspetto normale tra quelli stressati e danneggiati. Inoltre, il tessuto adiposo obeso mostra notevoli capacità rigenerative nel tempo [48]. Mentre un'eventuale azione dell'ACh sui precursori degli adipociti non è stata ancora investigata, le cellule staminali mesenchimali di derivazione adiposa, sia dei roditori che dell'uomo, esprimono mAChR e nAChR, la cui attivazione influisce sul differenziamento di esse [49,50]. Naturalmente, anche l'ACh prodotta dalle cellule infiammatorie che infiltrano il WAT obeso può influenzare le cellule non adipose per via autocrina o paracrina, ad esempio prendendo di mira i macrofagi. Mentre l'attivazione dei mAChR dei macrofagi esercita effetti proinfiammatori [51], l'attivazione del signalling dei nAChR nei macrofagi è generalmente associata ad un'azione antinfiammatoria. In particolare, l'attivazione di  $\alpha 7$ nAChR sembra ridurre la secrezione di citochine infiammatorie ed influenzare l'apoptosi, la proliferazione e polarizzazione dei macrofagi, riducendo infine la risposta infiammatoria sistemica [52]. È interessante notare che i topi knockout per  $\alpha 7$ nAChR stimolati con una HFD mostrano una maggiore infiammazione del tessuto adiposo e una più grave compromissione della sensibilità all'insulina [20,53]. Cellule endoteliali vascolari esprimono sia mAChR che nAChR e rispondono all'ACh rilasciando ossido nitrico, che promuove la vasodilatazione [54]; inoltre, la nicotina è un potente stimolatore dell'angiogenesi, mediata principalmente da  $\alpha 7$ nAChR e

coinvolge l'attivazione del fattore di trascrizione NF- $\kappa$ B [55]. Di conseguenza, il sistema colinergico adiposo non-neuronale identificato da questo studio potrebbe essere implicato negli importanti cambiamenti vascolari rilevati nel WAT in soggetti con obesità. Infine, l'ACh ha anche la potenzialità di influenzare la fibrosi del tessuto adiposo agendo sui fibroblasti [56]. In condizioni obesogene, il WAT, che normalmente contiene macrofagi residenti, è popolato da macrofagi derivati dal midollo osseo che mostrano un fenotipo proinfiammatorio polarizzato-M1, che promuove l'infiammazione di basso grado e la resistenza all'insulina [10,33]. Anche se recenti studi hanno sottolineato l'ampia eterogeneità dei compartimenti delle cellule adipose immunitarie in condizioni normali e obesogene, mettendo anche in discussione la netta distinzione tra macrofagi proinfiammatori M1 e antinfiammatori M2 [57], il fatto che ChAT fosse principalmente espressa dai macrofagi interstiziali antinfiammatori M2 CD206-positivi, suggerisce che l'attivazione del sistema colinergico non-neuronale si svolge in gruppi distinti di macrofagi, probabilmente quelli coinvolti nella plasticità e riparazione. Ulteriori aspetti che emergono dallo studio sono un aumento dell'espressione di ChT1 nel tessuto adiposo obeso, sia dei topi che dei soggetti umani, e livelli più elevati di colina nella SVF dell'eWAT di topi obesi. Questi risultati indicano che il metabolismo della colina è accelerato nell'obesità. L'attivazione del

metabolismo della colina nel tessuto adiposo obeso può, in una certa misura, riflettere l'attivazione del signalling colinergico non-neuronale. È interessante notare che la colina è un agonista parziale del nAChR e concentrazioni maggiori di quelle necessarie per bloccare i canali ionotropi, inducono la loro attivazione [58,59]. Così, un contributo di colina al sistema colinergico non - neuronale che agisce nel tessuto adiposo obeso non deve essere sottovalutato. D'altra parte, alcuni eventi cellulari che si verificano nel tessuto adiposo infiammato, tra cui l'ipertrofia degli adipociti e il reclutamento, migrazione e fagocitosi dei macrofagi, richiedono una sostanziale sintesi *de novo* della membrana cellulare, in cui la colina è richiesta per la sintesi di fosfolipidi essenziali della membrana. Qualunque sia la causa, l'aumento della quantità di colina necessaria per il rimodellamento del WAT durante l'obesità, può ridurre la disponibilità ad altri tessuti e organi, quindi aggravare alcune complicanze patologiche delle sue comorbidità. È interessante notare che negli esseri umani la carenza di colina alimentare provoca danni al fegato e ai muscoli, incluso la steatosi ed elevati livelli sierici di transaminasi epatiche e creatinfosfochinasi [60,61]. La sintesi di ACh e la presenza di mRNA e/o proteine ChAT nei macrofagi sono state segnalate per la prima volta nei macrofagi alveolari umani [62] e nei macrofagi renali di ratto durante il rigetto acuto dell'allotrapianto [63]. Successivamente, l'espressione del gene reporter è stata rilevata nei

macrofagi splenici di topi transgenici ChAT<sup>BAC</sup>-eGFP [64]. La scoperta di un sistema colinergico macrofago-dipendente non-neuronale nel WAT viscerale e la sua attivazione durante l'obesità è in linea con i lavori mostrati per cui i macrofagi che secernono l'ACh regolano l'attivazione termogenica nel tessuto adiposo sottocutaneo del topo [21, 65]. Pertanto, l'opinione emergente è che, come in molte altre condizioni infiammatorie, durante l'obesità patologica i sistemi colinergici non-neuronali si attivino ed esercitino effetti benefici deposito-specifici su aspetti fisiopatologici distintivi dell'obesità patologica. Questi aspetti possono variare dalla riduzione dell'infiammazione del WAT e dell'insulino-resistenza, all'aumento del dispendio energetico mediato dal tessuto adiposo bruno. Il potenziamento selettivo di questi sistemi può fornire un ulteriore approccio terapeutico per contrastare l'obesità e le malattie associate. Tuttavia, l'ACh è una potente molecola pleiotropica i cui recettori sono probabilmente in tutti i tipi di cellule. Nei roditori, ma soprattutto nell'uomo, il tessuto adiposo spesso circonda e infiltra organi e tessuti, compresa la ghiandola mammaria; il pancreas, soprattutto in individui anziani; il cuore, a livello dello strato epicardico; il muscolo scheletrico; i vasi sanguigni principali e i fasci nervosi. Pertanto, se l'attivazione del sistema colinergico non-neuronale fosse confermata come risposta compensatoria diffusa nel tessuto adiposo durante l'obesità patologica, sarebbe possibile avanzare l'ipotesi

che l'ACh, secreta in eccesso dalle cellule immunitarie infiltranti i depositi di tessuto adiposo obeso, possa interagire anche con altri tipi cellulari, interrompere i meccanismi omeostatici locali e contribuire positivamente alle comorbidità correlate all'obesità come il cancro al seno, il diabete, le malattie cardiovascolari e le neuropatie periferiche.

## ***5.2 Prospettive future***

Collettivamente, i risultati mostrano che in condizioni di obesità, il tessuto adiposo viscerale del topo e dell'uomo contengono entrambi un numero significativo di cellule infiltranti, principalmente macrofagi, in grado di sintetizzare e secernere ACh, che a sua volta guida il metabolismo degli adipociti verso un fenotipo meno infiammatorio e più insulino-sensibile.

Promuovere l'effetto antinfiammatorio del sistema colinergico non-neuronale potrebbe rappresentare un nuovo ed efficace approccio terapeutico all'obesità e alle malattie associate.

Altrettanto interessante sarebbe valutare quali recettori nicotinici e/o muscarinici dell'ACh mediano gli effetti specifici dell'ACh sugli adipociti e di conseguenza andare ad identificare agonisti recettore-specifici che esercitano

effetti benefici sugli adipociti bianchi stressati e ipertrofici e/o sul tessuto adiposo infiammato.

Infine, sarebbe utile eseguire uno screening delle molecole o farmaci in grado di modulare, inibendo in modo selettivo l'espressione e/o l'attività di BuChE e/o AChE, l'espressione di ACh in adipociti umani e di roditori, con la potenzialità di creare nuovi strumenti terapeutici per contrastare la disfunzione metabolica (intolleranza al glucosio e insulino-resistenza) e infiammazione che caratterizza il tessuto adiposo dei soggetti con obesità patologica.

## Capitolo sesto

### BIBLIOGRAFIA

- [1] Cai D. Neuroinflammation and neurodegeneration in overnutrition-induced diseases. *Trends Endocrinol Metab* 2013;24:40-7.  
<https://doi.org/10.1016/j.tem.2012.11.003>.
- [2] Quail DF, Dannenberg AJ. The obese adipose tissue microenvironment in cancer development and progression. *Nat Rev Endocrinol* 2019;15:139-154.  
<https://doi.org/10.1038/s41574-018-0126-x>.
- [3] Klein S, Gastaldelli A, Yki-Järvinen H, Scherer PE. Why does obesity cause diabetes? *Cell Metab* 2022;34:11-20.  
<https://doi.org/10.1016/j.cmet.2021.12.012>.
- [4] Després JP. Is visceral obesity the cause of the metabolic syndrome? *Ann Med* 2006;38:52-63. <https://doi.org/10.1080/07853890500383895>.
- [5] Karpe F, Pinnick KE. Biology of upper-body and lower-body adipose tissue--link to whole-body phenotypes. *Nat Rev Endocrinol* 2015;11:90-100.  
<https://doi.org/10.1038/nrendo.2014.185>.
- [6] Xu H, Barnes GT, Yang Q, Tan G, Yang D, Chou CJ et al. Chronic inflammation in fat plays a crucial role in the development of obesity-related

insulin resistance. *J Clin Invest* 2003;112:1821-30.

<https://doi.org/10.1172/JCI19451>.

[7] Weisberg SP, McCann D, Desai M, Rosenbaum M, Leibel RL, Ferrante AW Jr. Obesity is associated with macrophage accumulation in adipose tissue. *J Clin Invest*. 2003;112:1796-808. <https://doi.org/10.1172/JCI19246>.

[8] Giordano A, Frontini A, Cinti S. Convertible visceral fat as a therapeutic target to curb obesity. *Nat Rev Drug Discovery* 2016;15:405-24.

<https://doi.org/10.1038/nrd.2016.31>.

[9] McLaughlin T, Ackerman SE, Shen L, Engleman E. Role of innate and adaptive immunity in obesity-associated metabolic disease. *J Clin Invest* 2017;127:5-13. <https://doi.org/10.1172/JCI88876>.

[10] Saltiel AR, Olefsky JM. Inflammatory mechanisms linking obesity and metabolic disease. *J Clin Invest* 2017;127:1-4.

<https://doi.org/10.1172/JCI92035>.

[11] Chakarov S, Blériot C, Ginhoux F. Role of adipose tissue macrophages in obesity-related disorders. *J Exp Med* 2022;219:e20211948.

<https://doi.org/10.1084/jem.20211948>.

- [12] Marcelin G, Gautier EL, Clément K. Adipose Tissue Fibrosis in Obesity: Etiology and Challenges. *Annu Rev Physiol* 2022;84:135-155.  
<https://doi.org/10.1146/annurev-physiol-060721-092930>.
- [13] Yang TT, Chang CK, Tsao CW, Hsu YM, Hsu CT, Cheng JT. Activation of muscarinic M-3 receptor may decrease glucose uptake and lipolysis in adipose tissue of rats. *Neurosci Lett* 2009;451:57-9.  
<https://doi.org/10.1016/j.neulet.2008.12.029>.
- [14] Liu RH, Mizuta M, Matsukura S. The expression and functional role of nicotinic acetylcholine receptors in rat adipocytes. *J Pharmacol Exp Ther* 2004;310:52-8. <https://doi.org/10.1124/jpet.103.065037>.
- [15] Canello R, Zulian A, Maestrini S, Mencarelli M, Della Barba A, Invitti C, et al. The nicotinic acetylcholine receptor  $\alpha 7$  in subcutaneous mature adipocytes: downregulation in human obesity and modulation by diet-induced weight loss. *Int J Obes* 2012;36:1552-7. <https://doi.org/10.1038/ijo.2011.275>.
- [16] Gochberg-Sarver A, Kedmi M, Gana-Weisz M, Bar-Shira A, Orr-Urtreger A.  $Tnf\alpha$ ,  $Cox2$  and  $AdipoQ$  adipokine gene expression levels are modulated in murine adipose tissues by both nicotine and nACh receptors containing the  $\beta 2$  subunit. *Mol Genet Metab* 2012;107:561-70.  
<https://doi.org/10.1016/j.ymgme.2012.08.012>.

[17] Jiao ZY, Wu J, Liu C, Wen B, Zhao WZ, Du XL. Nicotinic  $\alpha 7$  receptor inhibits the acylation stimulating protein-induced production of monocyte chemoattractant protein-1 and keratinocyte-derived chemokine in adipocytes by modulating the p38 kinase and nuclear factor- $\kappa$ B signaling pathways. *Mol Med Rep* 2016;14:2959-66. <https://doi.org/10.3892/mmr.2016.5630>.

[18] Wu J, Jiao ZY, Li RZ, Lu HL, Zhang HH, Cianflone K. Cholinergic activation suppresses palmitate-induced macrophage activation and improves acylation stimulating protein resistance in co-cultured adipocytes. *Exp Biol Med* 2017;242:961-73. <https://doi.org/10.1177/1535370217700522>.

[19] Scabia G, Canello R, Dallanoce C, Berger S, Matera C, Dattilo A, et al. ICH3, a selective  $\alpha 7$  nicotinic acetylcholine receptor agonist, modulates adipocyte inflammation associated with obesity. *J Endocrinol Invest* 2020;43:983-93. <https://doi.org/10.1007/s40618-020-01182-z>.

[20] Wang X, Yang Z, Xue B, Shi H. Activation of the cholinergic antiinflammatory pathway ameliorates obesity-induced inflammation and insulin resistance. *Endocrinology* 2011;152:836-46. <https://doi.org/10.1210/en.2010-0855>.

[21] Jun H, Yu H, Gong J, Jiang J, Qiao X, Perkey E, et al. An immune-beige adipocyte communication via nicotinic acetylcholine receptor signaling. *Nat Med* 2018;24:814-22. <https://doi.org/10.1038/s41591-018-0032-8>.

[22] Massoulié J. The origin of the molecular diversity and functional anchoring of cholinesterases. *Neurosignals* 2002;11:130-43. <https://doi.org/10.1159/000065054>.

[23] Wallace TC, Blusztajn JK, Caudill MA, Klatt KC, Natker E, Zeisel SH, et al. Choline: the underconsumed and underappreciated essential nutrient. *Nutr Today* 2018;53:240-53. <https://doi.org/10.1097/NT.0000000000000302>.

[24] Giordano A, Song CK, Bowers RR, Ehlen JC, Frontini A, Cinti S, et al. White adipose tissue lacks significant vagal innervation and immunohistochemical evidence of parasympathetic innervation. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 2006;291:R1243-55. <https://doi.org/10.1152/ajpregu.00679.2005>.

[25] Kawashima K, Fujii T. Basic and clinical aspects of non-neuronal acetylcholine: overview of non-neuronal cholinergic systems and their biological significance. *J Pharmacol Sci* 2008;106:167- 73. <https://doi.org/10.1254/jphs.fm0070073>.

[26] Beckmann J, Lips KS. The non-neuronal cholinergic system in health and disease. *Pharmacology* 2013;92:286-302.

<https://doi.org/10.1159/000355835>.

[27] Grando SA, Kawashima K, Kirkpatrick CJ, Kummer W, Wessler I. Recent progress in revealing the biological and medical significance of the non-neuronal cholinergic system. *Int Immunopharmacol* 2015;29:1-7.

<https://doi.org/10.1016/j.intimp.2015.08.023>.

[28] Fujii T, Mashimo M, Moriwaki Y, Misawa H, Ono S, Horiguchi K, et al. Physiological functions of the cholinergic system in immune cells. *J Pharmacol Sci* 2017;134:1-21. <https://doi.org/10.1016/j.jphs.2017.05.002>.

[29] Kelly MJ, Breathnach C, Tracey KJ, Donnelly SC. Manipulation of the inflammatory reflex as a therapeutic strategy. *Cell Rep Med* 2022;3:100696. <https://doi.org/10.1016/j.xcrm.2022.100696>.

[30] Perugini J, Di Mercurio E, Tossetta G, Severi I, Monaco F, Reguzzoni M, et al. Biological effects of ciliary neurotrophic factor on hMADS adipocytes. *Front Endocrinol* 2019;10:768.

<https://doi.org/10.3389/fendo.2019.00768>.

[31] Matakchione G, Perugini J, Di Mercurio E, Sabbatinelli J, Prattichizzo F, Senzacqua M, et al. Senescent macrophages in the human adipose tissue as a

source of inflammaging. *Geroscience* 2022;44:1941-60.

<https://doi.org/10.1007/s11357-022-00536-0>.

[32] Ruocco C, Ragni M, Rossi F, Carullo P, Ghini V, Piscitelli F, et al. Manipulation of dietary amino acids prevents and reverses obesity in mice through multiple mechanisms that modulate energy homeostasis. *Diabetes* 2020;69:2324-39. <https://doi.org/10.2337/db20-0489>.

[33] Nance SA, Muir L, Lumeng C. Adipose tissue macrophages: Regulators of adipose tissue immunometabolism during obesity. *Mol Metab* 2022;66:101642. <https://doi.org/10.1016/j.molmet.2022.101642>.

[34] Hanna-Mitchell AT, Beckel JM, Barbadora S, Kanai AJ, de Groat WC, Birder LA. Non-neuronal acetylcholine and urinary bladder urothelium. *Life Sci* 2007;80:2298-302. <https://doi.org/10.1016/j.lfs.2007.02.010>.

[35] Schirmer SU, Eckhardt I, Lau H, Klein J, DeGraaf YC, Lips KS, et al. The cholinergic system in rat testis is of non-neuronal origin. *Reproduction* 2011;142:157-66. <https://doi.org/10.1530/REP10-0302>.

[36] Beckmann J, Schubert J, Morhenn HG, Grau V, Schnettler R, Lips KS. Expression of choline and acetylcholine transporters in synovial tissue and cartilage of patients with rheumatoid arthritis and osteoarthritis. *Cell Tissue Res* 2015;359:465-77. <https://doi.org/10.1007/s00441-014-2036-0>.

[37] Pochini L, Scalise M, Galluccio M, Pani G, Siminovitch KA, Indiveri C. The human OCTN1 (SLC22A4) reconstituted in liposomes catalyzes acetylcholine transport which is defective in the mutant L503F associated to the Crohn's disease. *Biochim Biophys Acta* 2012;1818:559-65.

<https://doi.org/10.1016/j.bbamem.2011.12.014>.

[38] Uchida Y, Inazu M, Takeda H, Yamada T, Tajima H, Matsumiya T. Expression and functional characterization of choline transporter in human keratinocytes. *J Pharmacol Sci* 2009;109:102-9.

<https://doi.org/10.1254/jphs.08291FP>.

[39] Severi I, Abbatelli S, Perugini J, Di Mercurio E, Senzacqua M, Giordano A. Butyrylcholinesterase distribution in the mouse gastrointestinal tract: An immunohistochemical study. *J Anat* 2023;242:245-56.

<https://doi.org/10.1111/joa.13754>.

[40] McKnight AJ, Macfarlane AJ, Dri P, Turley L, Willis AC, Gordon S. Molecular cloning of F4/80, a murine macrophage-restricted cell surface glycoprotein with homology to the G-proteinlinked transmembrane 7 hormone receptor family. *J Biol Chem* 1996;271:486-9.

<https://doi.org/10.1074/jbc.271.1.486>.

[41] Bowles AC, Tucker A, Bunnell BA. Isolation and Flow Cytometric Analysis of the Stromal Vascular Fraction Isolated from Mouse Adipose Tissue. *Methods Mol Biol* 2018;1773:1-9. [https://doi.org/10.1007/978-1-4939-7799-4\\_1](https://doi.org/10.1007/978-1-4939-7799-4_1).

[42] Panee J. Monocyte chemoattractant Protein 1 (MCP-1) in obesity and diabetes. *Cytokine* 2012; 60:1-12. <https://doi.org/10.1016/j.cyto.2012.06.018>.

[43] Sun W, Dong H, Balaz M, Slyper M, Drokhlyansky E, Colletuori G, et al. snRNA-seq reveals a subpopulation of adipocytes that regulates thermogenesis. *Nature* 2020;587:98-102. <https://doi.org/10.1038/s41586-020-2856-x>.

[44] Emont MP, Jacobs C, Essene AL, Pant D, Tenen D, Colletuori G, et al. A single-cell atlas of human and mouse white adipose tissue. *Nature* 2022;603:926-33. <https://doi.org/10.1038/s41586-022-04518-2>.

[45] Giordano A, Cinti F, Canese R, Carpinelli G, Colletuori G, Di Vincenzo A, et al. The adipose organ is a unitary structure in mice and humans. *Biomedicines* 2022;10:2275. <https://doi.org/10.3390/biomedicines10092275>.

[46] Cinti S. *Obesity, Type 2 Diabetes and the Adipose Organ*. 1 st ed. Springer, 2018.

[47] Giordano A, Murano I, Mondini E, Perugini J, Smorlesi A, Severi I, et al. Obese adipocytes show ultrastructural features of stressed cells and die of pyroptosis. *J Lipid Res* 2013;54:2423-36.

<https://doi.org/10.1194/jlr.M038638>.

[48] Strissel KJ, Stancheva Z, Miyoshi H, Perfield JW, DeFuria J, Jick Z, et al. Adipocyte death, adipose tissue remodeling, and obesity complications. *Diabetes* 2007 Dec;56(12):2910-8. <https://doi.org/10.2337/db07-0767>.

[49] Hoogduijn MJ, Cheng A, Genever PG. Functional nicotinic and muscarinic receptors on mesenchymal stem cells. *Stem Cells Dev*. 2009;18:103-12. <https://doi.org/10.1089/scd.2008.0032>.

[50] Piovesana R, Melfi S, Fiore M, Magnaghi V, Tata AM. M2 muscarinic receptor activation inhibits cell proliferation and migration of rat adipose-mesenchymal stem cells. *J Cell Physiol* 2018;233:5348-60.

<https://doi.org/10.1002/jcp.26350>.

[51] Fujii YX, Tashiro A, Arimoto K, Fujigaya H, Moriwaki Y, Misawa H, et al. Diminished antigenspecific IgG1 and interleukin-6 production and acetylcholinesterase expression in combined M1 and M5 muscarinic acetylcholine receptor knockout mice. *J Neuroimmunol* 2007;188:80-5.

<https://doi.org/10.1016/j.jneuroim.2007.05.017>.

[52] Rosas-Ballina M, Olofsson PS, Ochani M, Valdés-ferrer SI, Levine YA, Reardon C, et al. Acetylcholine-Synthesizing T cells relay neural signals in a vagus nerve circuit. *Science* 334:98-102. 10.1126/science.1209985.

<https://doi.org/10.1126/science.1209985>.

[53] Fujii YX, Fujigaya H, Moriwaki Y, Misawa H, Kasahara T, Grando SA, et al. Enhanced serum antigen-specific IgG1 and proinflammatory cytokine production in nicotinic acetylcholine receptor alpha7 subunit gene knockout mice. *J Neuroimmunol* 2007;189:69-74.

<https://doi.org/10.1016/j.jneuroim.2007.07.003>.

[54] Furchgott RF, Zawadzki JV. The obligatory role of endothelial cells in the relaxation of arterial smooth muscle by acetylcholine. *Nature*.

1980;288:373-6. <https://doi.org/10.1038/288373a0>.

[55] Heeschen C, Weis M, Aicher A, Dimmeler S, Cooke JP. A novel angiogenic pathway mediated by non-neuronal nicotinic acetylcholine receptors. *J Clin Invest* 2002;110:527-36. <https://doi.org/10.1172/JCI14676>.

[56] Pieper MP, Chaudhary NI, Park JE. Acetylcholine-induced proliferation of fibroblasts and myofibroblasts in vitro is inhibited by tiotropium bromide.

*Life Sci* 2007;80:2270-3. <https://doi.org/10.1016/j.lfs.2007.02.034>.

[57] Maniyadath B, Zhang Q, Gupta RK, Mandrup S. Adipose tissue at single-cell resolution. *Cell Metab.* 2023;35:386-413.

<https://doi.org/10.1016/j.cmet.2023.02.002>.

[58] Grosman C, Auerbach A. Asymmetric and independent contribution of the second transmembrane segment 12' residues to diliganded gating of acetylcholine receptor channels: a singlechannel study with choline as the agonist. *J Gen Physiol* 2000;115:637-51.

<https://doi.org/10.1085/jgp.115.5.637>.

[59] Purohit Y, Grosman C. Block of muscle nicotinic receptors by choline suggests that the activation and desensitization gates act as distinct molecular entities. *J Gen Physiol* 2006;127:703- 17.

<https://doi.org/10.1085/jgp.200509437>.

[60] Fischer LM, daCosta KA, Kwock L, Stewart PW, Lu TS, Stabler SP, et al. Sex and menopausal status influence human dietary requirements for the nutrient choline. *Am J Clin Nutr* 2007;85:1275- 85.

<https://doi.org/10.1093/ajcn/85.5.1275>.

[61] da Costa KA, Badea M, Fischer LM, Zeisel SH. Elevated serum creatine phosphokinase in choline-deficient humans: mechanistic studies in C2C12

mouse myoblasts. *Am J Clin Nutr* 2004;80:163-70.

<https://doi.org/10.1093/ajcn/80.1.163>.

[62] Wessler IK, Kirkpatrick CJ. The Non-neuronal cholinergic system: an emerging drug target in the airways. *Pulm Pharmacol Ther* 2001;14:423-34.

<https://doi.org/10.1006/pupt.2001.0313>.

[63] Hecker A, Mikulski Z, Lips KS, Pfeil U, Zakrzewicz A, Wilker S, et al.

Pivotal Advance: Upregulation of acetylcholine synthesis and paracrine cholinergic signaling in intravascular transplant leukocytes during rejection of rat renal allografts. *J Leukoc Biol* 2009;86:13-22.

<https://doi.org/10.1189/jlb.1107722>.

[64] Reardon C, Duncan GS, Brüstle A, Brenner D, Tusche MW, Olofsson

PS, et al. Lymphocytederived ACh regulates local innate but not adaptive immunity. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2013;110:1410-5.

<https://doi.org/10.1073/pnas.1221655110>.

[65] Knights AJ, Liu S, Ma Y, Nudell VS, Perkey E, Sorensen MJ, et al.

Acetylcholine-synthesizing macrophages in subcutaneous fat are regulated by  $\beta$ 2-adrenergic signaling. *EMBO J* 2021;40:e106061.

<https://doi.org/10.15252/emj.202010606>.