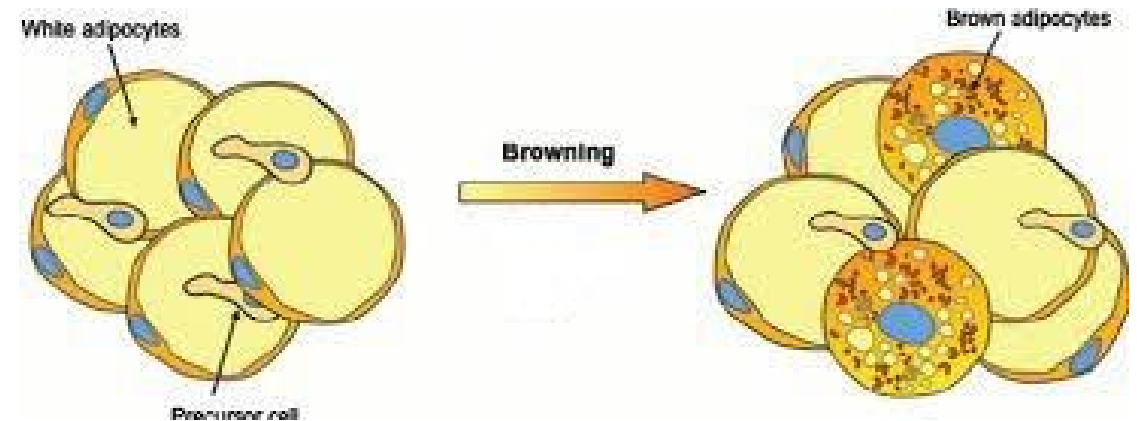




**MODIFICAZIONE FENOTIPICA DA TESSUTO ADIPOSO BIANCO A BRUNO NEL DEPOSITO DI GRASSO OMENTALE DI PAZIENTI AFFETTI DA FEOCROMOCITOMA.  
PHENOTYPIC SWITCH FROM WHITE TO BROWN ADIPOSE TISSUE IN THE OMENTAL FAT OF PATIENTS AFFECTED BY PHEOCHROMOCYTOMA.**



Laureando: Marco Di Giuseppe

Relatore: Prof. Andrea Frontini

Sessione Straordinaria A.A. 2020/21 –Febbraio 2022

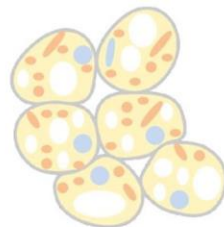
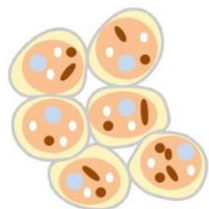
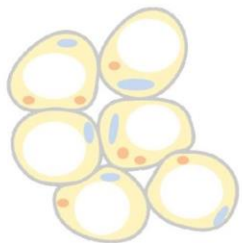
In quasi tutti i mammiferi, il tessuto adiposo bianco (WAT) e quello bruno (BAT) si trovano insieme a formare un organo a depositi multipli con sede viscerale e sottocutanea. Studi condotti sul modello murino hanno mostrato che, in condizioni sperimentali come l'esposizione al freddo o il trattamento con sostanze agoniste dei recettori adrenergici, si assiste ad una trasformazione di fenotipo da WAT a BAT in un fenomeno detto «browning».

Attraverso il confronto del grasso omentale (WAT), prelevato da pazienti affetti da feocromocitoma (condizione caratterizzata da ipersecrezione di catecolamine e quindi assimilabile ad una condizione sperimentale di forte stimolazione adrenergica) e da gruppi di controllo, si è cercato di comprendere se il fenomeno del «browning» potesse essere osservato anche nell'uomo.

In metà dei campioni prelevati dai pazienti affetti da feocromocitoma è stata rilevata la presenza di cellule multiloculari immunoreattive alla proteina disaccoppiante 1 (UCP1-ir utilizzato come marker del BAT). L'organizzazione del tessuto ha inoltre evidenziato un forte rimodellamento con un aspetto molto simile al BAT presente in sede sopraclavicolare (fittamente capillarizzato e innervato da fibre noradrenergiche TH-ir). Un buon numero di adipociti UCP1-ir mostravano una morfologia pauciloculare, considerabile come marker citologico di modifica fenotipica da bianco a bruno. Tramite microscopia elettronica, è stato inoltre osservato l'aumento della densità di mitocondri ed è stata descritta una morfologia di questi organuli paragonabile a quella trovata negli adipociti bruni classici. L'analisi di geni tipicamente «brown» (in particolare il PRDM16) ha evidenziato una up-regolazione di questi in tutti i depositi di grasso omentale dei pazienti affetti da feocromocitoma, anche in quelli dove non si era osservato un rimodellamento morfologico eclatante. La microscopia elettronica e l'immunoistochimica per Ki67 non hanno evidenziato un significativo contributo di eventi proliferativi nel fenomeno descritto.

In virtù di questi dati, è concreta la possibilità che nell'uomo adulto, sotto stimolazione adrenergica, il WAT subisca un processo di trasformazione diretta in BAT. Questa evidenza apre la prospettiva di identificare molecole target per lo sviluppo di farmaci finalizzati al rimodellamento del tessuto adiposo a scopi terapeutici.

# CARATTERISTICHE E DISTRIBUZIONE DEI TESSUTI ADIPOSI



## Distribution and Development of Brown Adipocytes in the Murine and Human Adipose Organ

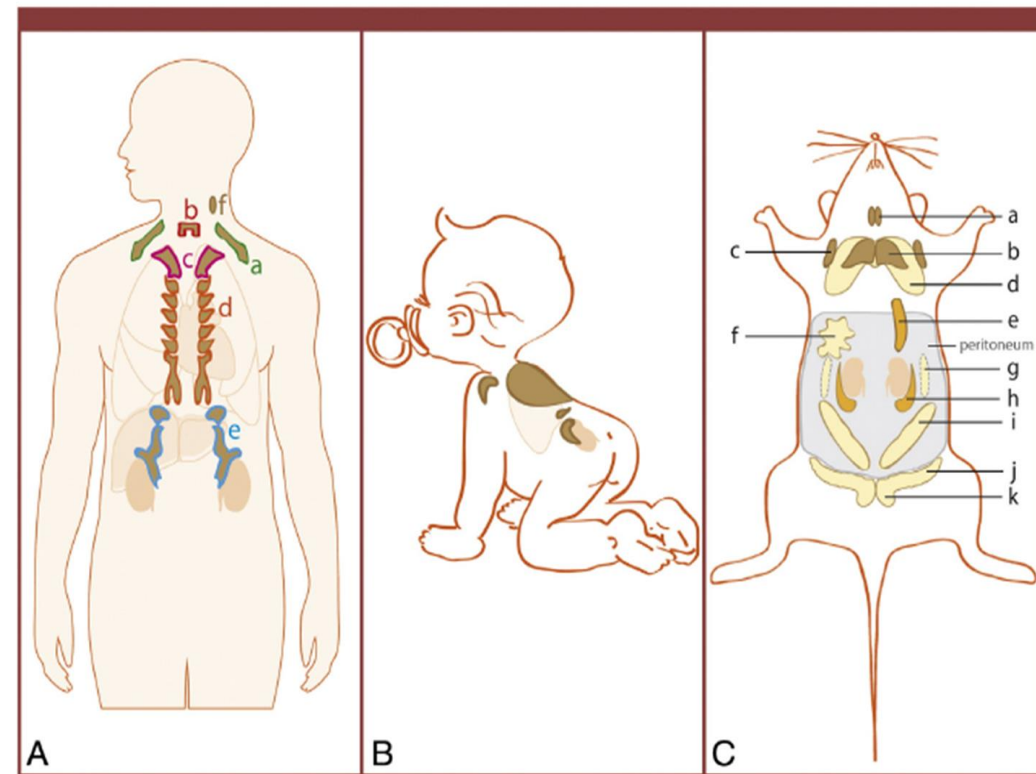
Andrea Frontini<sup>1</sup> and Saverio Cinti<sup>1,\*</sup>

<sup>1</sup>Department of Molecular Pathology and Innovative Therapies, University of Ancona (Politecnica delle Marche), IT-60020 Ancona, Italy

\*Correspondence: s.cinti@univpm.it

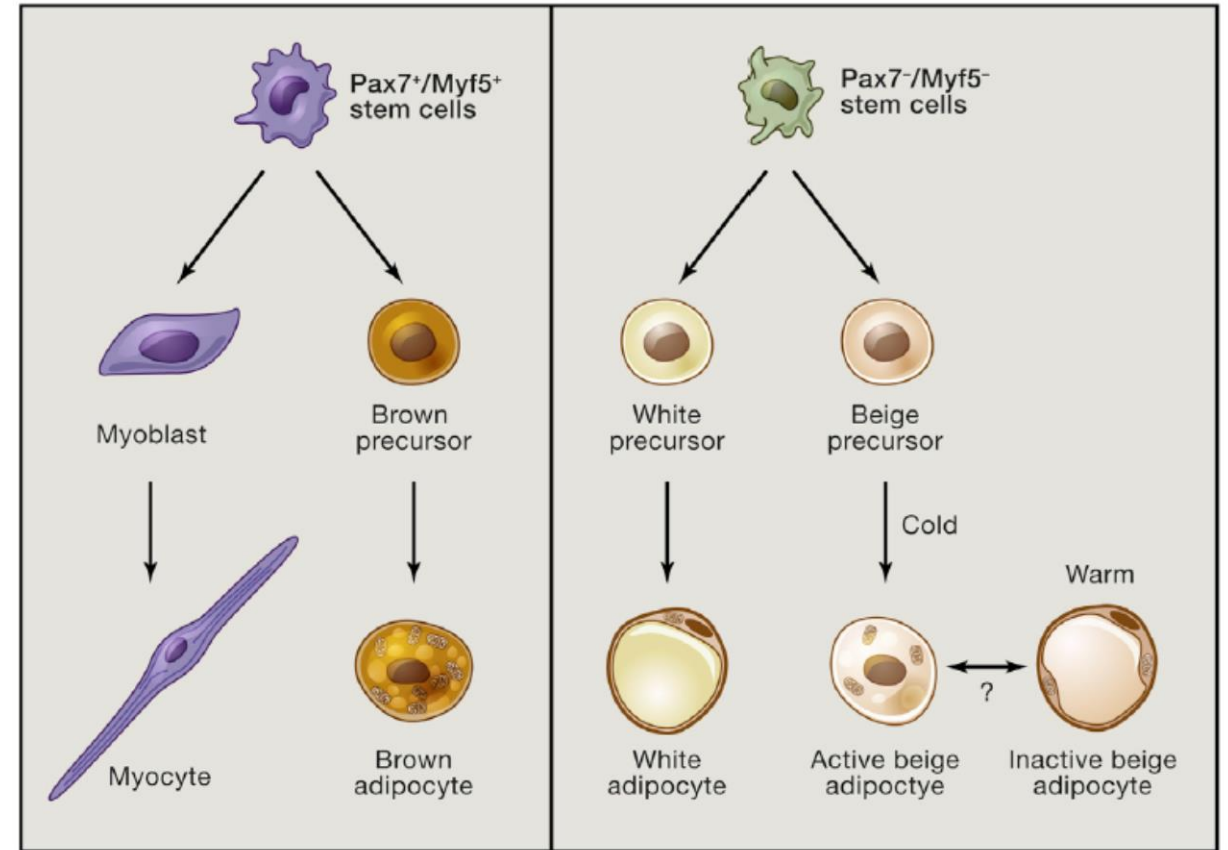
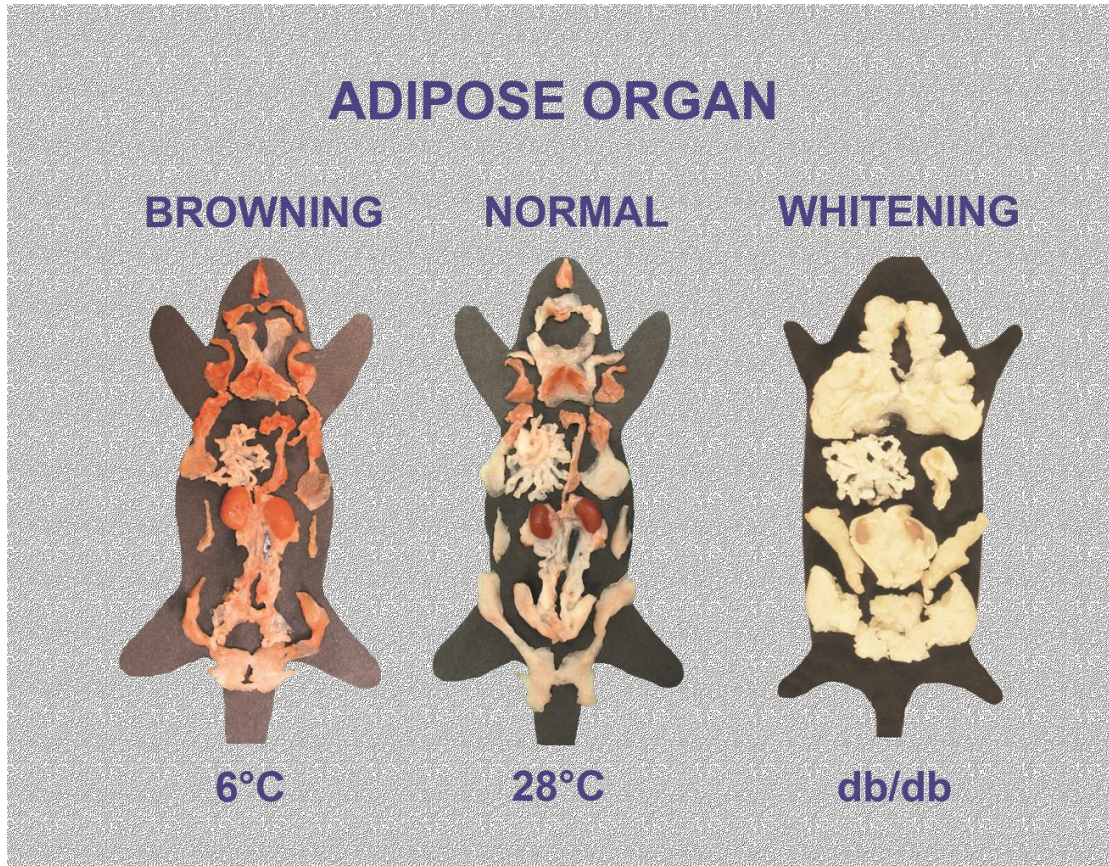
DOI 10.1016/j.cmet.2010.03.004

	WHITE ADIPOSE TISSUE	BROWN ADIPOSE TISSUE	BEIGE ADIPOSE TISSUE
<b>Localization</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Subcutaneous</li> <li>• Intra-abdominal</li> <li>• Epicardial</li> <li>• Gonadal</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Interscapular</li> <li>• Paravertebral</li> <li>• Perirenal</li> <li>• Cervical</li> <li>• Supraclavicular</li> </ul>	Emerges in white adipose tissue depots with appropriate stimuli
<b>Morphology</b>	Spherical	Elliptical and smaller than white	Spherical
<b>Cell composition</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Single lipid droplet</li> <li>• Few mitochondria</li> <li>• Flattened peripheral nucleus</li> <li>• Little endoplasmic reticulum</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Multiple small lipid droplets</li> <li>• Large number of mitochondria</li> <li>• Oval central nucleus</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Unilocular morphology but small lipid droplets after stimulation</li> <li>• Mitochondria appear after stimulation</li> </ul>
<b>Function</b>	Storing energy	Expending energy and heat production (non-shivering thermogenesis)	Thermogenic potential
<b>Uncoupling protein</b>	Undetectable	Positive	Positive after stimulation





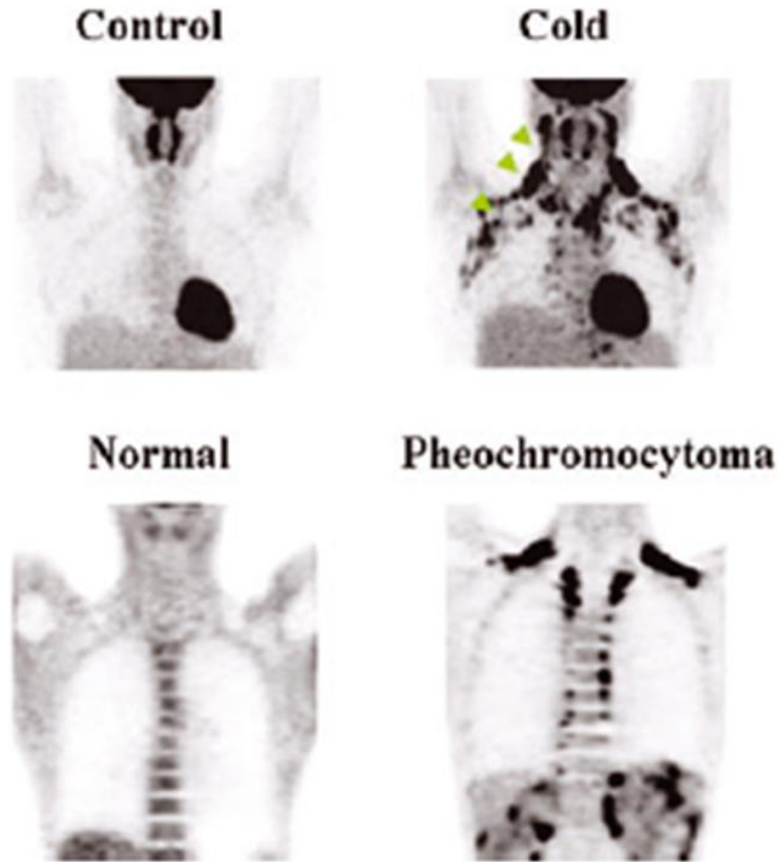
# PLASTICITÀ DEL TESSUTO ADIPOSO



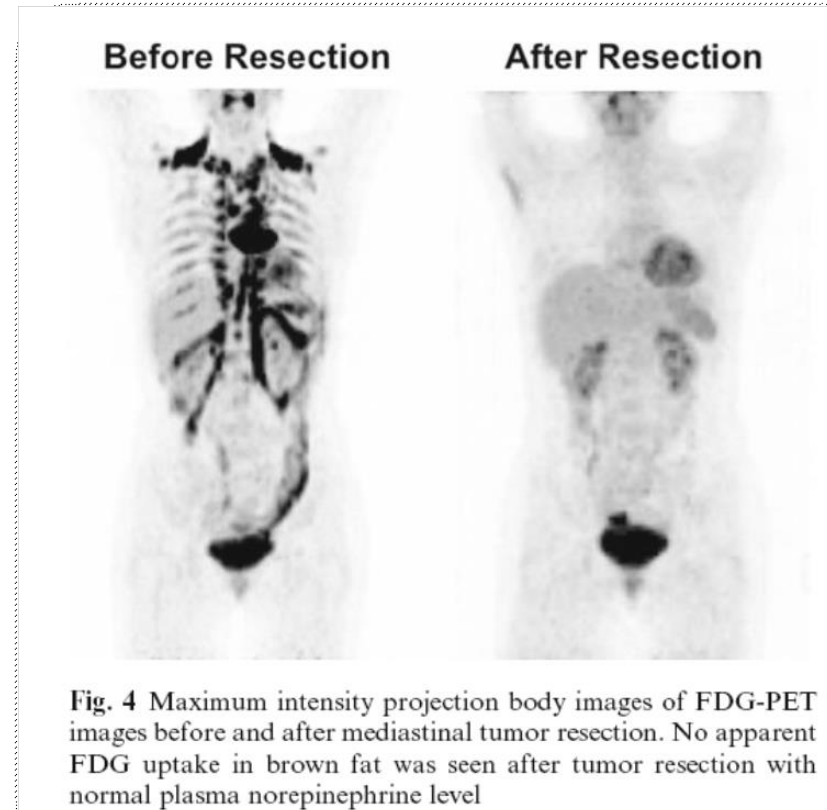
- ❑ Determinazione fenotipica influenzata da vari geni, fra cui l'espressione di PRDM16 risulta essere uno dei regolatori principali.



# DISTRIBUZIONE DEL TESSUTO ADIPOSO BRUNO NELL'UOMO IN VARIE CONDIZIONI



**Figure 2.** BAT activities in humans Top panels, BAT activities measured by FDG-PET in a normal subject and a subject exposed to cold (from Ref. 48). Bottom panels, BAT activities in a normal subject and a pheochromocytoma patient with elevated circulating level of catecholamines (with permission from Ref. 57).



**Fig. 4** Maximum intensity projection body images of FDG-PET images before and after mediastinal tumor resection. No apparent FDG uptake in brown fat was seen after tumor resection with normal plasma norepinephrine level

## SOGGETTI

### ☐ Dati clinici del gruppo del gruppo di controllo

Patient ID	Age/Gender	BMI (kg/m <sup>2</sup> )	Reason for surgery
CTRL-1	65/M	29	Cholecystectomy
CTRL-2	34/M	24	Cholecystectomy
CTRL-3	45/M	28	Cholecystectomy
CTRL-4	53/F	18	Cholecystectomy
CTRL-5	52/F	25	Cholecystectomy
CTRL-6	55/M	25	Cholecystectomy
CTRL-7	36/M	26	Cholecystectomy
CTRL-8	59/M	29	Cholecystectomy
CTRL-9	58/M	26	Cholecystectomy
CTRL-10	41/M	21	Cholecystectomy
CTRL-11	40/M	22	Cholecystectomy
CTRL-12	38/F	29	Cholecystectomy
CTRL-13	64/F	24	Cholecystectomy
CTRL-14	32/F	23	Cholecystectomy
CTRL-15	51/F	25	Cholecystectomy
CTRL-16	45/F	28	Cholecystectomy
CTRL-17	60/F	28	Cholecystectomy
CTRL-18	47/M	21	Cholecystectomy
CTRL-19	52/F	26	Cholecystectomy
CTRL-20	50/F	27	Cholecystectomy

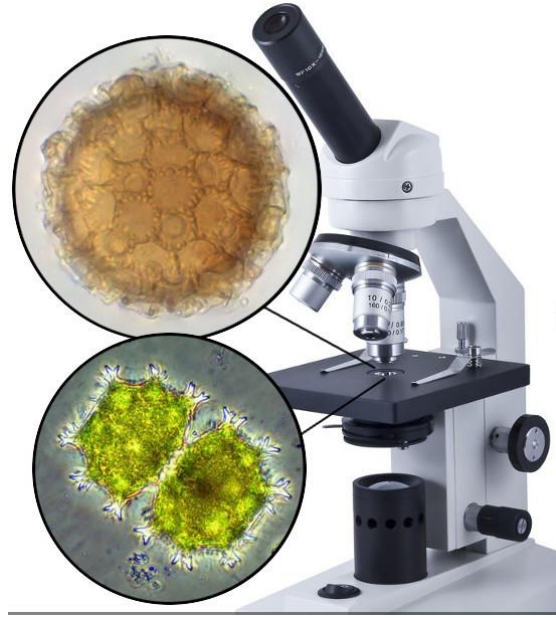
- 10 maschi e 10 femmine;
- Età compresa fra 32 e 65 (media: 46);
- BMI tra 18 e 29 (media: 25.2);

### ☐ Dati clinici del gruppo del gruppo dei pazienti affetti da feocromocitoma

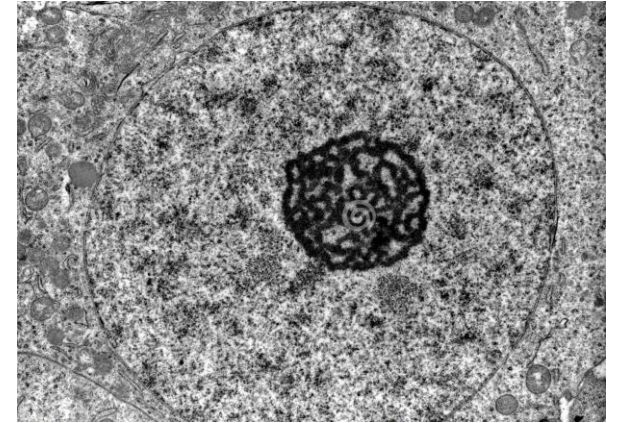
Patient ID	Age/Gender	BMI (kg/m <sup>2</sup> )	Pathology/Reason for surgery	position/size diameter
Pheo-1	33/F	21.5	Pheochromocytoma/resection	Sx/5 cm
Pheo-2	64/F	25	Pheochromocytoma/resection	Sx/4 cm
Pheo-3	70/M	30.5	Pheochromocytoma/resection	Dx/5.5 cm
Pheo-4	38/F	26.7	Pheochromocytoma/resection	Dx/3 cm
Pheo-5	50/M	23.7	Pheochromocytoma/resection	Dx/3.5x4x2 cm
Pheo-6	58/M	23	Pheochromocytoma/resection	Dx/6.5x6x3 cm
Pheo-7	38/F	26	Pheochromocytoma/resection	Sx/4 cm
Pheo-8	29/F	19.5	Pheochromocytoma/resection	Dx/3x2 cm
Pheo-9	45/F	19	Pheochromocytoma/resection	Dx/4cm
Pheo-10	64/M	28	Pheochromocytoma/resection	Sx/5 cm
Pheo-11	50/M	25	Pheochromocytoma/resection	Sx/3cm
Pheo-12	52/M	27	Pheochromocytoma/resection	Dx/3x2 cm

- 6 maschi e 6 femmine;
- Età compresa fra 29 e 70 (media: 49);
- BMI tra 19 e 30.5 (media: 24.5);

## ALLESTIMENTO PREPARATI ISTOLOGICI E MICROSCOPIA

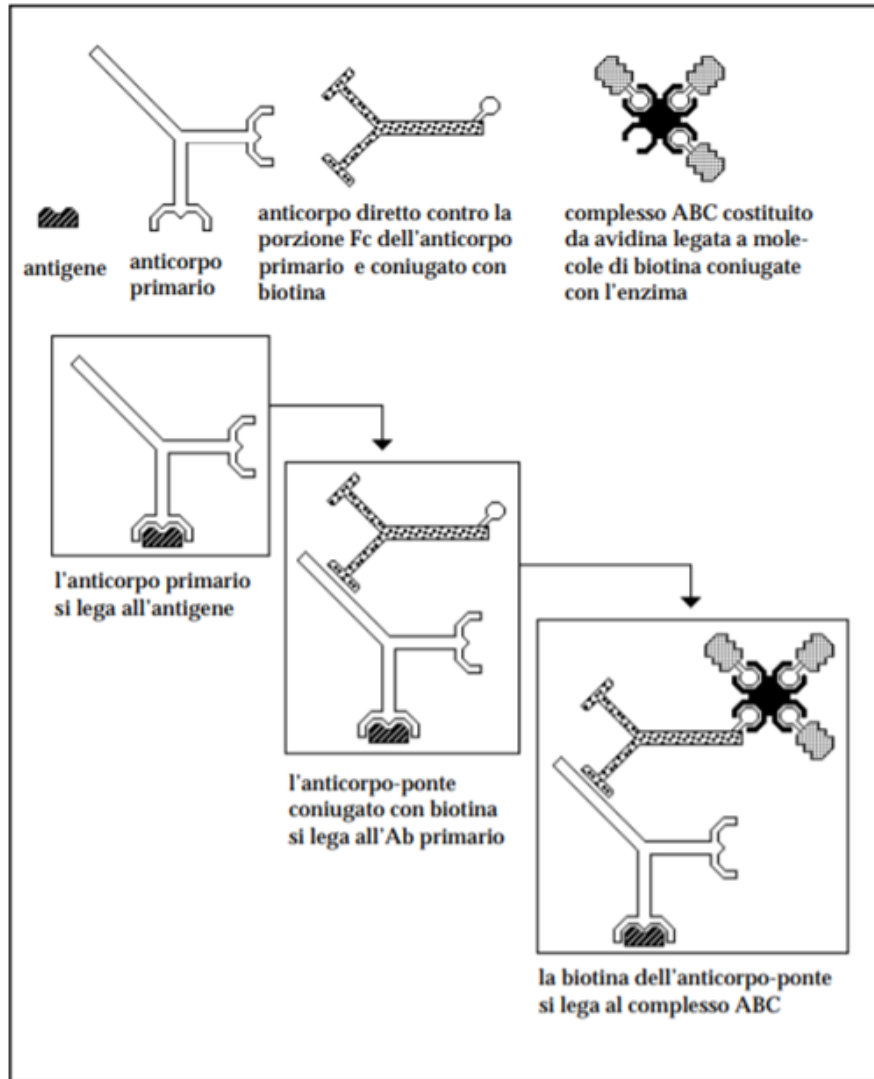


- Prelievo chirurgico di grasso omentale dai pazienti;
- Fissazione a 4°C in paraformaldeide 4% in buffer fosfato 0.1M;
- Disidratazione;
- Inclusione in paraffina;
- Taglio e colorazione con ematossilina-eosina;
- Osservazione al microscopio ottico;



- Prelievo chirurgico di grasso omentale dai pazienti;
- Fissazione in 2% glutaraldeide-2% paraformaldeide in buffer fosfato 0.1M; post-fissazione in 1% tetrossido di osmio.
- Inclusione nella miscela Epon-Araldite;
- Colorazione con blu di toluidina;
- Taglio all'ultramicrotomo MT-X e colorazione con citrato di piombo;
- Osservazione al microscopio elettronico a trasmissione;

## TECNICHE IMMUNOISTOCHIMICHE (IHC)



Immunoistochimica eseguita con Metodo ABC (complesso avidina-biotina).

➤ Anticorpi primari:

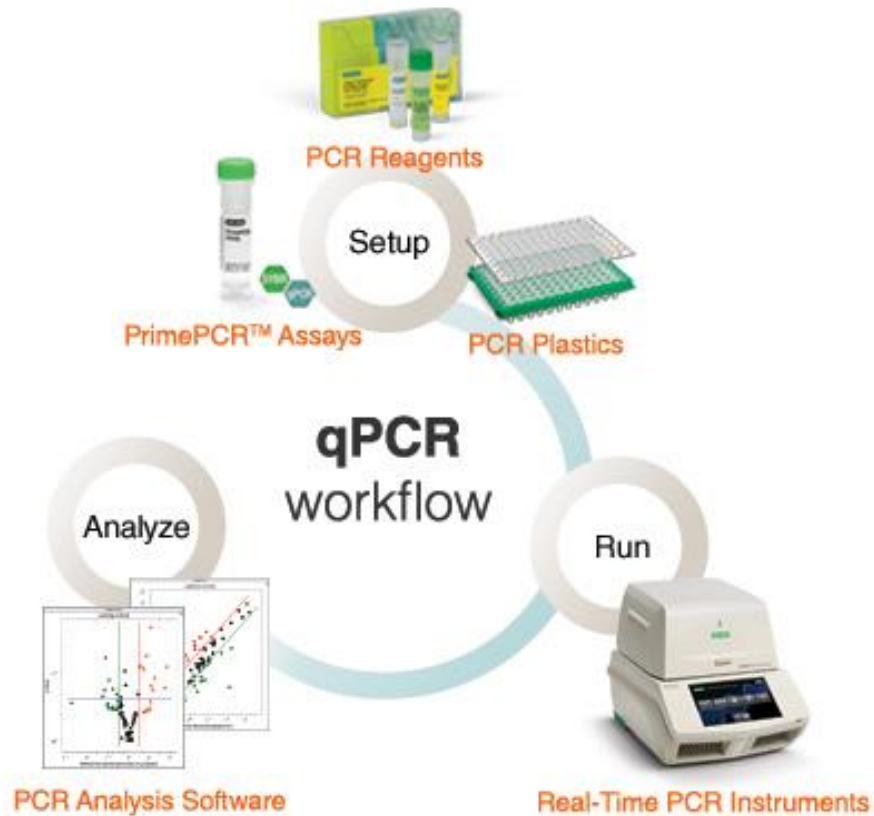
- Anti-UCP1;
- Anti-TH;
- Anti-Ki67;
- Anti-PRDM16.

➤ Anticorpi secondari: IgG coniugate con biotina.

➤ Analisi morfometrica delle aree immunoreattive e dei preadipociti.

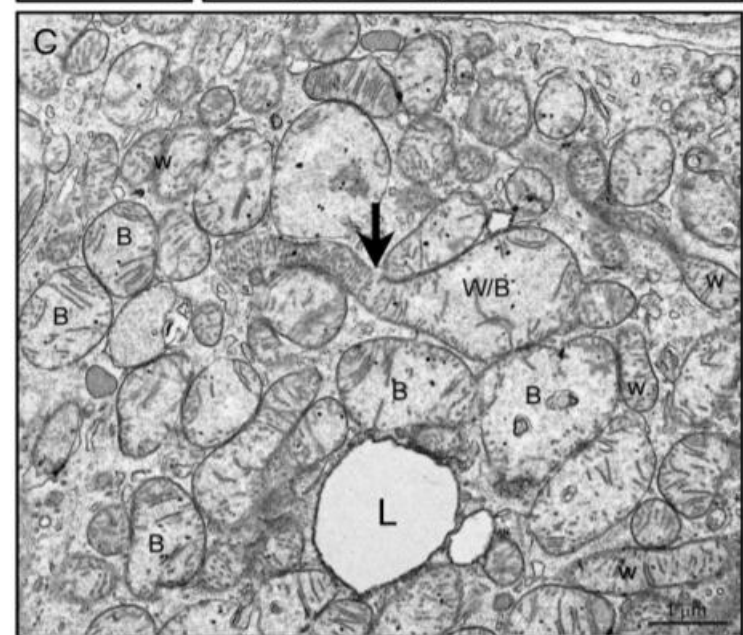
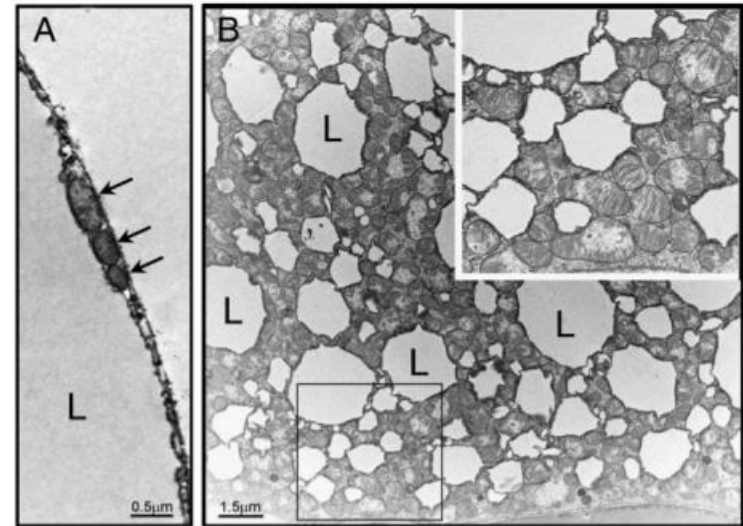
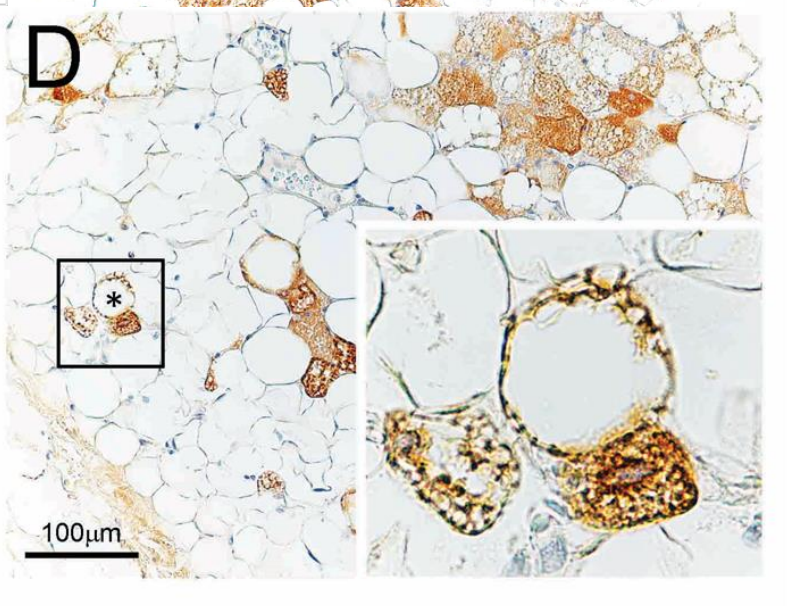
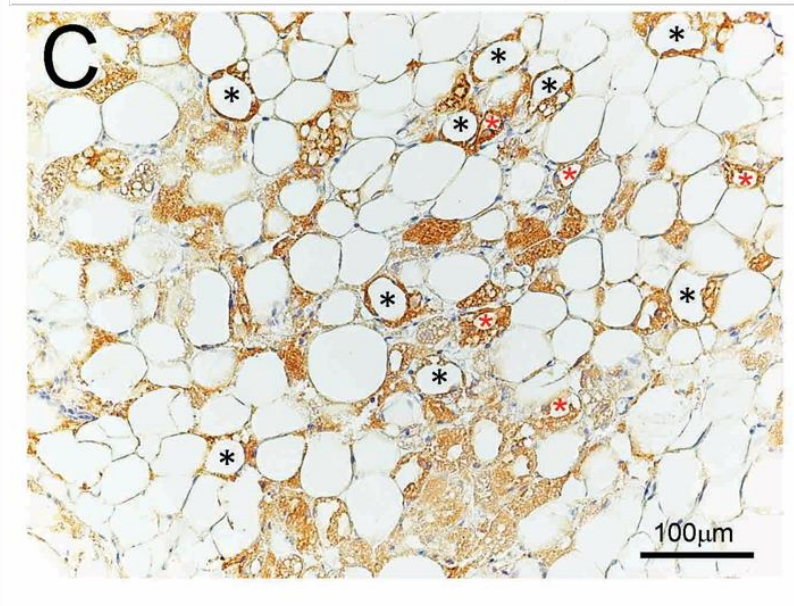
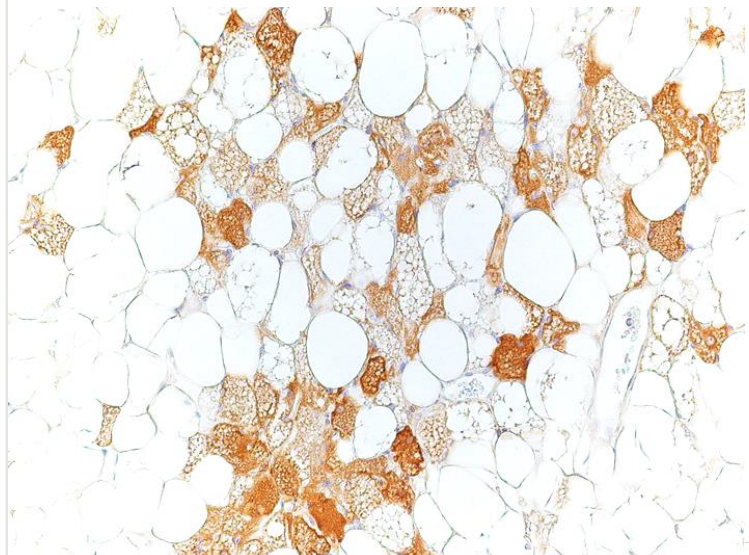
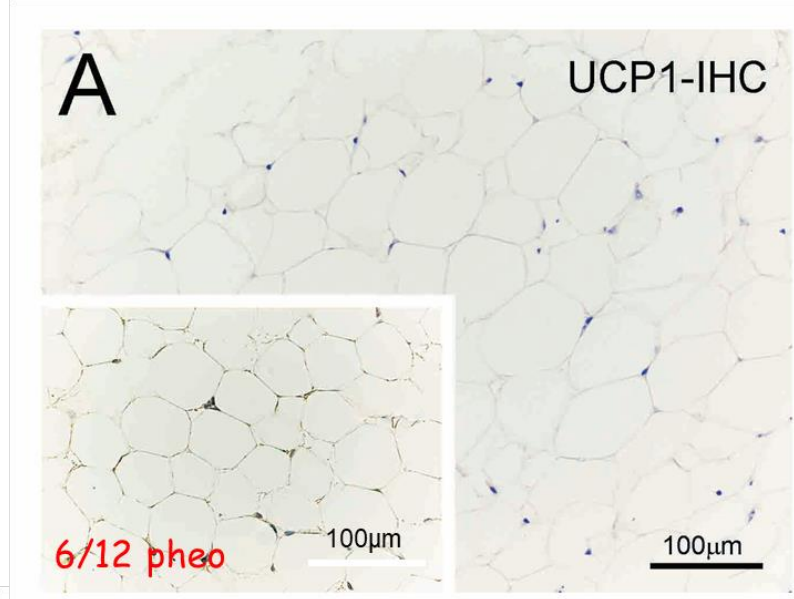


## REAL TIME PCR (qPCR)



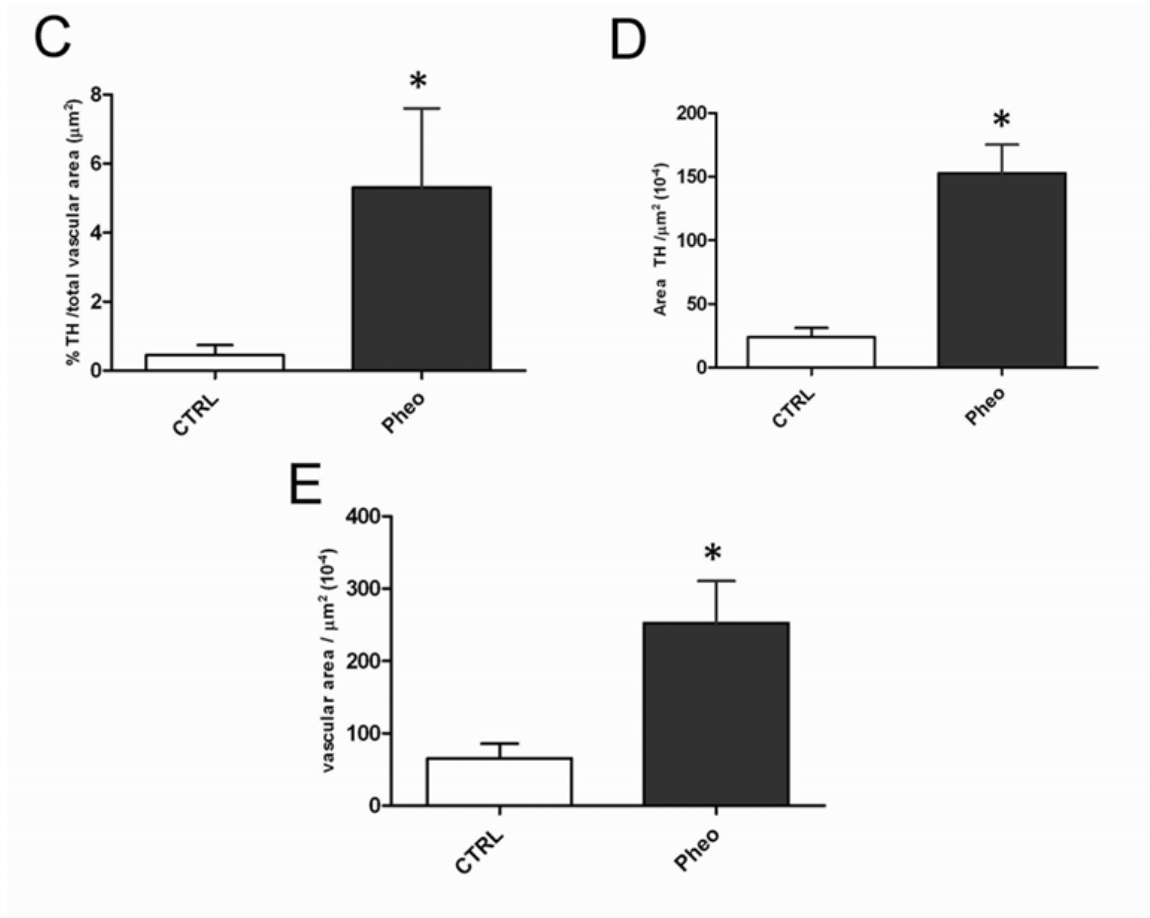
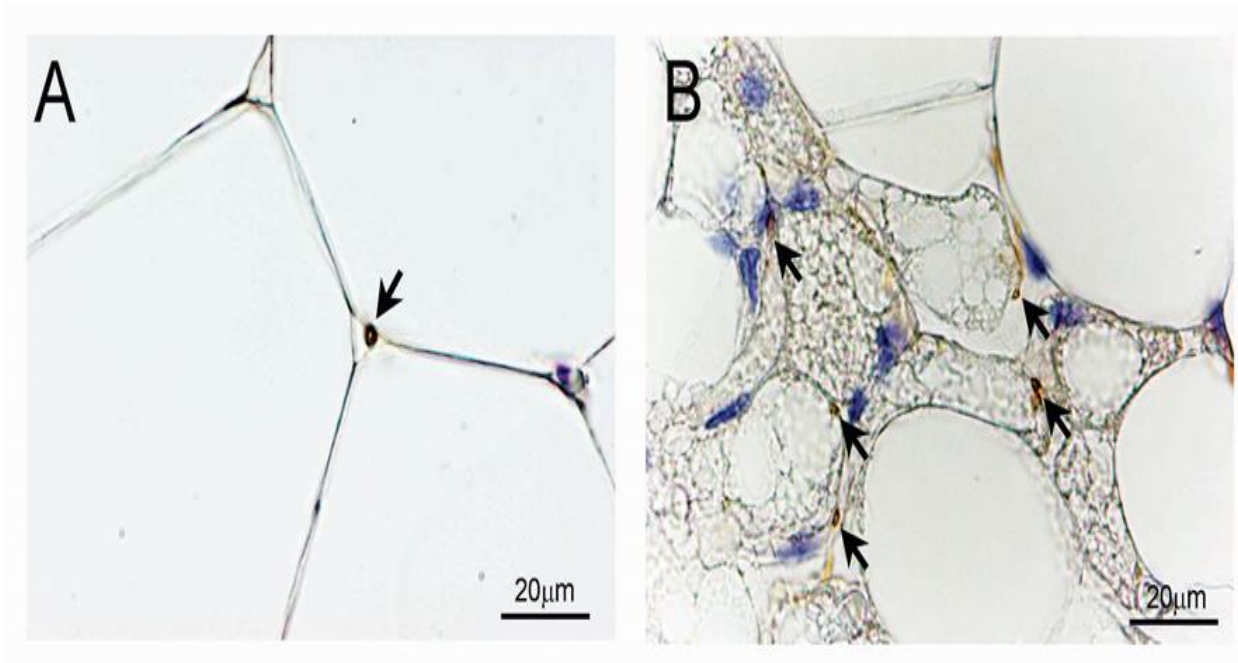
- Tecnica eseguita su campioni di grasso omentale di 4 pazienti affetti da feocromocitoma e 4 controlli.
- Campioni lavati in Dulbecco's PBS, congelati e conservati a  $-80^{\circ}\text{C}$ .
- Estrazione con TRIZOL reagent, purificazione e digestione con DNasi, prive di RNasi.
- Per determinare i livelli di RNA, l'RNA è stato retrotrascritto con High-Capacity cDNA RT Kit contenente RNase Inhibitor; la qPCR è stata replicata 3 volte, usando TaqMan Gene Expression Assays.
- Protocollo di cicli termici:
  - 1) Incubazione a  $95^{\circ}\text{C}$  per 10 minuti;
  - 2) 40 cicli a  $95^{\circ}\text{C}$  per 15s e a  $60^{\circ}\text{C}$  per 20s.
- I livelli di espressione di mRNA sono stati determinati mediante una curva standard di calibrazione, usando i livelli di TATA box-Binding Protein (TBP) come controllo endogeno.

# BROWNING (UCP1-ir) E CAMBIAMENTO MORFOLOGICO DEI MITOCONDRI



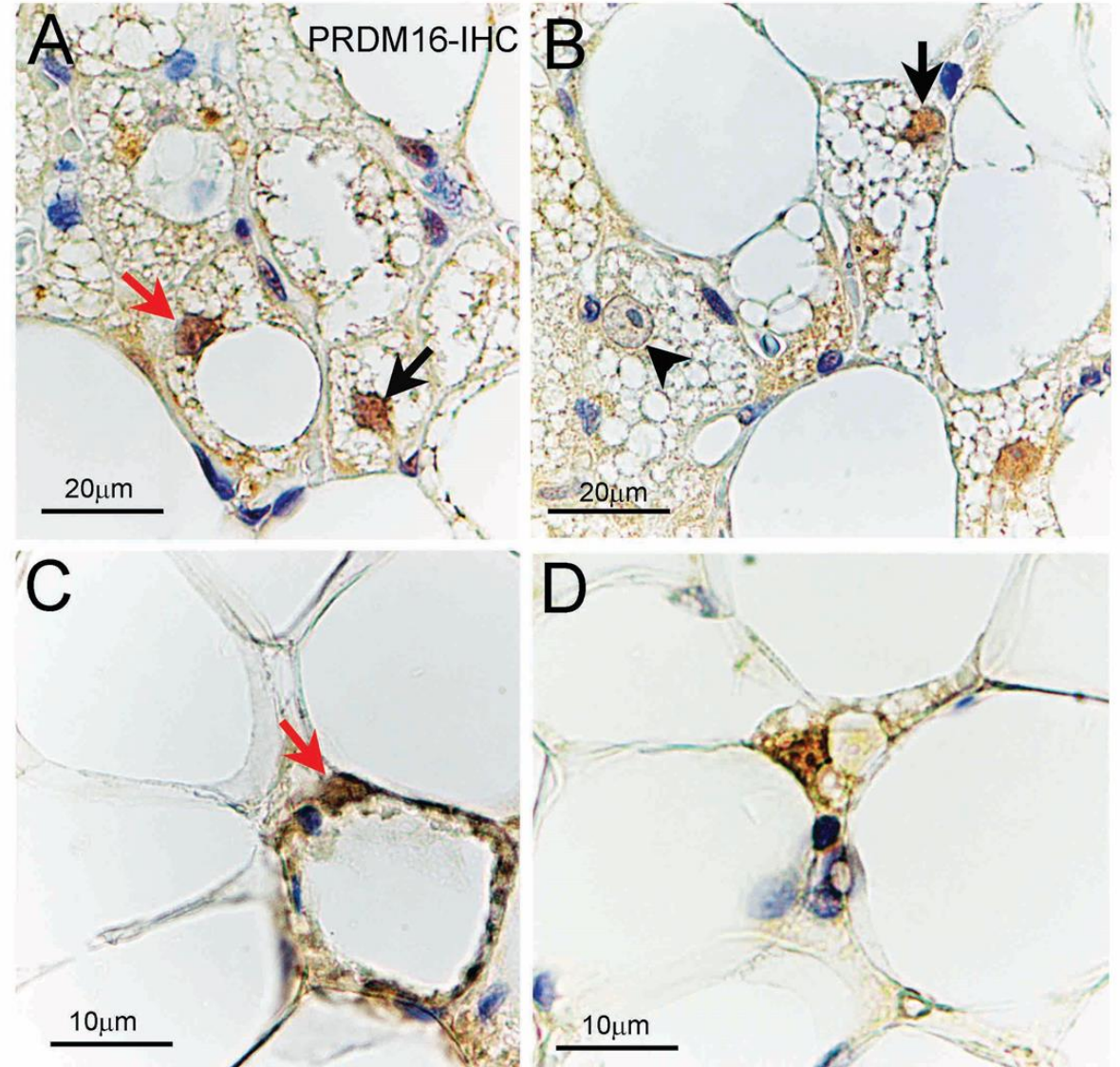
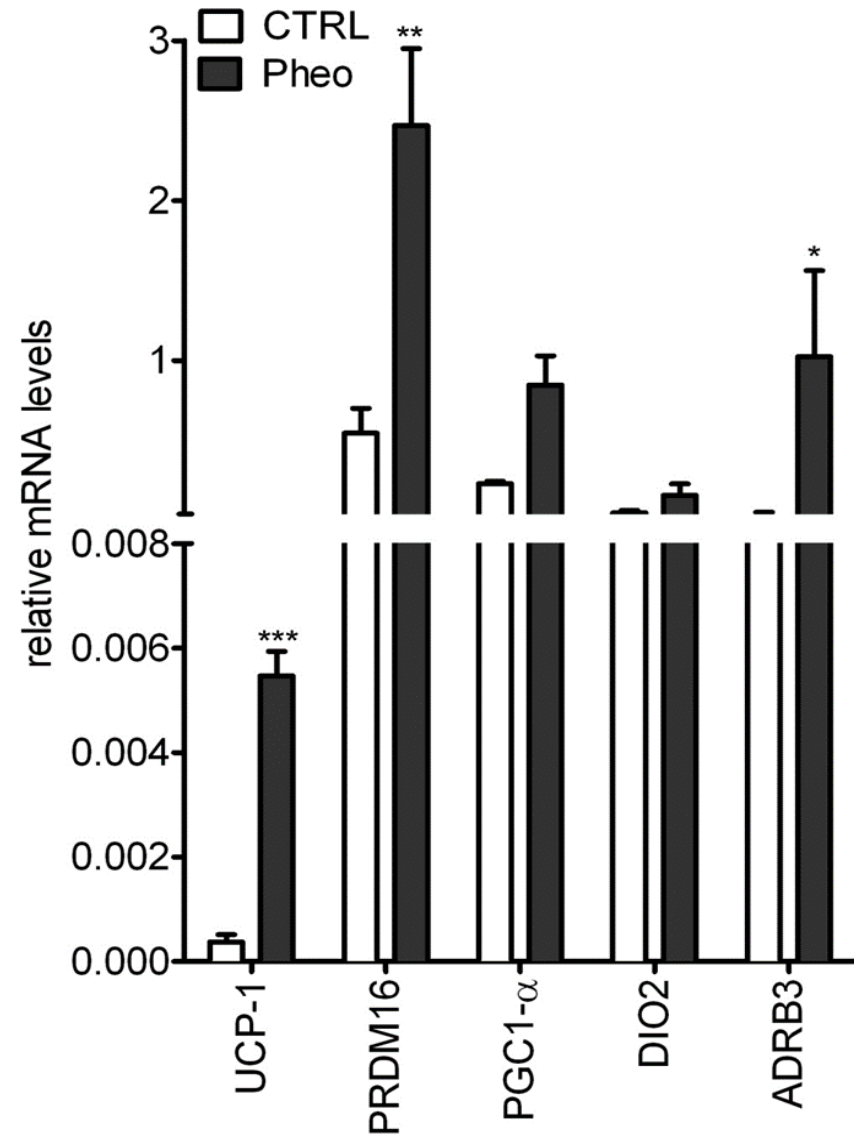


# ANALISI DELL'INNERVAZIONE E DELLA CAPILLARIZZAZIONE NEI DEPOSITI DI GRASSO OMENTALE DEI DUE GRUPPI



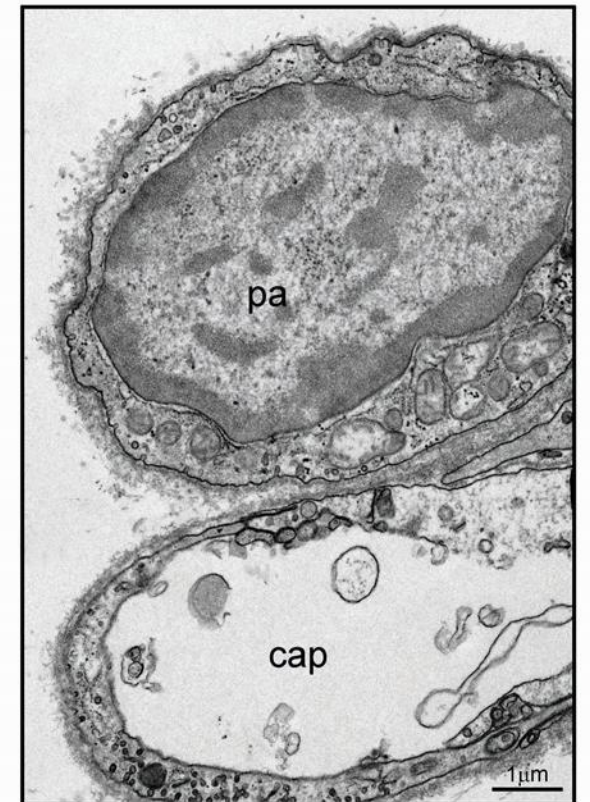
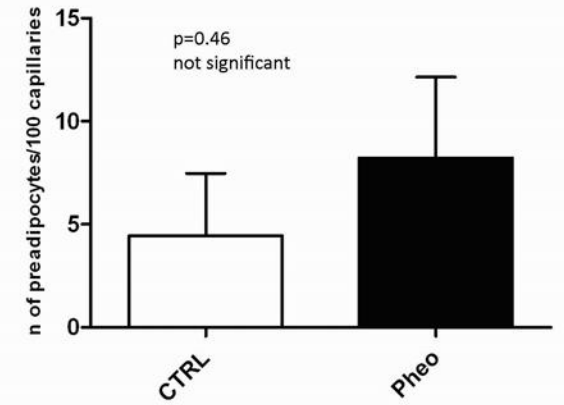
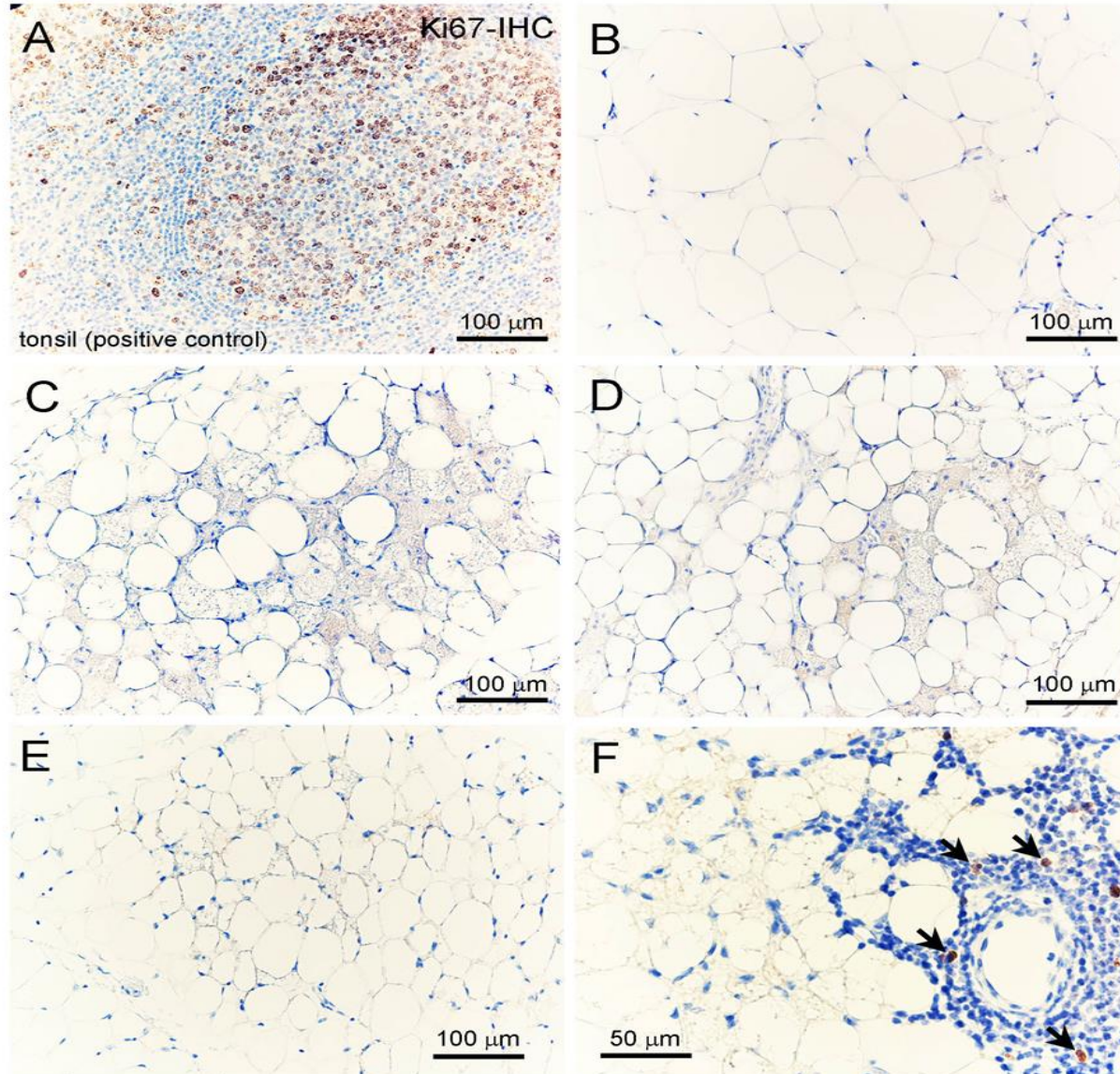


# ESPRESSIONE DI «BROWN GENES» NEI DEPOSITI DI GRASSO OMENTALE DEI DUE GRUPPI





# VALUTAZIONE DI EVENTI DI PROLIFERAZIONE



- I dati ottenuti suggeriscono che nell'uomo adulto, il tessuto adiposo bianco omentale soggetto a stimolazione adrenergica mostra una spiccata plasticità WAT-BAT.
- In queste condizioni, gli adipociti bianchi sembrano andare verso un processo di trasformazione diretta in adipociti bruni; l'intero tessuto mostra un riarrangiamento verso un fenotipo classico da BAT in assenza di segni visibili di proliferazione cellulare.
- Alcune delle molecole descritte come essenziali nella trasformazione del WAT in BAT nel modello animale, sono risultate essere coinvolte anche nel tessuto umano.
- Queste molecole potrebbero aiutare ad individuare target molecolari per lo sviluppo di farmaci finalizzati al trattamento dell'obesità e del diabete di tipo 2 (il BAT aumenta la sensibilità insulinica e l'uptake di glucosio).



# Bibliografia

- Andrea Frontini, Alessandra Vitali, Jessica Perugini, Incoronata Murano, Chiara Romiti, Daniel Ricquier, Mario Guerrieri, Saverio Cinti (2013). White-to-brown transdifferentiation of omental adipocytes in patients affected by pheochromocytoma. *Biochim Biophys Acta* 1831(5):950-9. doi: 10.1016/j.bbali.2013.02.005.
- A. Frontini, S. Cinti, Distribution and development of brown adipocytes in the murine and human adipose organ, *Cell Metab.* 7 (2010) 253–256.
- P. Seale, H.M. Conroe, J. Estall, S. Kajimura, A. Frontini, J. Ishibashi, P. Cohen, S. Cinti, B.M. Spiegelman, Prdm16 determines the thermogenic program of subcutaneous white adipose tissue in mice, *J. Clin. Invest.* 121 (2011) 96–105.
- J.Wu, P. Boström, L.M. Sparks, L. Ye, J.H. Choi, A.H. Giang, M. Khandekar, K.A. Virtanen, P. Nuutila, G. Schaart, K. Huang, H. Tu, W.D. van Marken Lichtenbelt, J. Hoeks, S. Enerbäck, P. Schrauwen, B.M. Spiegelman, Beige adipocytes are a distinct type of thermogenic fat cell in mouse and human, *Cell* 150 (2012) 366–376.
- I. Kuji, E. Imabayashi, A. Minagawa, H. Matsuda, T. Miyauchi, Brown adipose tissue demonstrating intense FDG uptake in a patient with mediastinal pheochromocytoma, *Ann. Nucl. Med.* 22 (2008) 231–235.
- L.Y. Yamaga, A.F. Thom, J. Wagner, R.H. Baroni, J.T. Hidal, M.G. Funari, The effect of catecholamines on the glucose uptake in brown adipose tissue demonstrated by (18)F-FDG PET/CT in a patient with adrenal pheochromocytoma, *Eur. J. Nucl. Med. Mol. Imaging* 35 (2008) 446–447.
- P. Boström, J. Wu, M.P. Jedrychowski, A. Korde, L. Ye, J.C. Lo, K.A. Rasbach, E.A. Boström, J.H. Choi, J.Z. Long, S. Kajimura, M.C. Zingaretti, B.F. Vind, H. Tu, S. Cinti, K. Højlund, S.P. Gygi, B.M. Spiegelman, A PGC1- $\alpha$ -dependent myokine that drives brown-fat-like development of white fat and thermogenesis, *Nature* 481 (2012) 463–468.
- M. Bordicchia, D. Liu, E.Z. Amri, G. Ailhaud, P. Dessì-Fulgheri, C. Zhang, N. Takahashi, R. Sarzani, S. Collins, Cardiac natriuretic peptides act via p38 MAPK to induce the brown fat thermogenic program in mouse and human adipocytes, *J. Clin. Invest.* 122 (2012) 1022–1036.
- A.J. Whittle, S. Carobbio, L. Martins, M. Slawik, E. Hondares, M.J. Vázquez, D. Morgan, R.I. Csikasz, R. Gallego, S. Rodriguez-Cuenca, M. Dale, S. Virtue, F. Villarroya, B. Cannon, K. Rahmouni, M. López, A. Vidal-Puig, BMP8B increases brown adipose tissue thermogenesis through both central and peripheral actions, *Cell* 149 (2012) 871–885.
- Alcune delle immagini prese da: [https://www.researchgate.net/figure/Stimulation-of-brown-adipose-tissue-BAT-thermogenesis-Cold-exposure-exercise-and\\_fig1\\_230695995](https://www.researchgate.net/figure/Stimulation-of-brown-adipose-tissue-BAT-thermogenesis-Cold-exposure-exercise-and_fig1_230695995) ; <https://www.researchgate.net/publication/255908123> Tecniche di immunoistochimica - 128 Caleido-IMPX-Muzi-MB ; <https://www.bio-rad.com/it-it/applications-technologies/what-real-time-pcr-qpcr?ID=LUSO4W8UU> ; <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fphys.2018.01954/full> ; <https://www.directindustry.it/prod/thermo-fisher-scientific-materials-structural/product-123345-1401217.html> ; <https://www.ottica-roma.net/differenze-tra-microscopi-biologici-e-stereoscopici/> ; <https://it.dreamstime.com/nucleo-delle-cellule-tem-image117239954> .