



UNIVERSITÀ POLITECNICA DELLE MARCHE
FACOLTÀ DI MEDICINA E CHIRURGIA

Corso di Laurea in Medicina e Chirurgia

**ANATOMIA DEI DEPOSITI ADIPOSI
DI SOGGETTI OBESI**

Relatore: Chiar.mo

Prof. Antonio Giordano

Tesi di Laurea di:

Beatrice Donati

A.A. 2019/2020

A mia Madre, per avermi insegnato a volare alto...

a mio Padre, per aver assecondato il mio volo.

*T*utto passa, caro ragazzo.

Ciò che non passerà mai è tuo padre e tua madre.
Quando li amerai e quando li odierai, non passeranno.
Quando li loderai e quando li maledirai, saranno lì.
Due scogli viventi, due salvagenti.
Sbagliati, assurdi, con tanti difetti.
Forse divisi fra loro, lontani,
in qualche modo legati da un filo d'acciaio.
Pronti, scattanti, soldati in guardia.
Persiane socchiuse, porte sempre aperte.
Testimoni della tua felicità e della tua infinita tristezza.
Medaglieri nelle tue vittorie e fazzoletti nelle tue sconfitte.
Spesso impotenti, ma mai arresi.
Non c'è moda che detti regole
Non c'è usura che li logori
Non c'è mezzo che li porti via.
Non passeranno, cara ragazza mia.
E se anche fossero dall'altra parte della terra o del cielo
ne sentiresti il profumo:
il Profumo d'Amore.

Indice

INTRODUZIONE	4
1. L'OBESITA'	4
1.1. Definizione	4
1.2. Epidemiologia.....	4
1.3. Diagnosi	6
1.4. Complicanze	6
1.4.1. Sindrome metabolica	7
1.4.2. Diabete mellito di tipo 2.....	7
1.4.3. Malattie cardiovascolari	9
1.4.4. Tumori correlati all'obesità	9
2. ANATOMIA DELL'ORGANO ADIPOSO	9
2.1. Istologia	10
2.1.1. Tessuto adiposo bianco (WAT).....	10
2.1.2. Tessuto adiposo bruno (BAT)	12
2.2. Anatomia macroscopica	13
3. FISIOLOGIA (LA PLASTICITÀ DELL'ORGANO ADIPOSO)	16
3.1. Termogenesi	17
3.2. Funzione energetico-metabolica.....	18
4. L'ORGANO ADIPOSO NEGLI ESSERI UMANI	19
4.1. Anatomia dell'organo nell'uomo	19
4.2. Plasticità dell'organo adiposo negli esseri umani.....	20
5. L'ORGANO ADIPOSO OBESO	21
5.1. Rimodellamento della matrice extracellulare	22
5.2. Morte degli adipociti obesi per piroptosi e formazione delle Crown Like Structures (CLS).....	22
5.3. La maggior patogenicità del grasso viscerale	25

5.4. La sequenza di eventi che portano a infiammazione, insulino-resistenza e diabete	26
MATERIALI E METODI	28
1. PAZIENTI E CONDIZIONI SPERIMENTALI	28
2. MICROSCOPIA OTTICA	28
2.1. Colorazione con Ematossilina-Eosina	29
2.2. Immunoistochimica (IHC)	30
2.3. Colorazione “Sirius Red”	31
3. ANALISI MORFOMETRICA	32
4. MICROSCOPIA ELETTRONICA A TRASMISSIONE (TEM).....	34
5. ANALISI STATISTICA	35
RISULTATI.....	36
1. IL TESSUTO ADIPOSO OBESO IPERTROFICO HA UN’AMPIA QUANTITÀ DI ADIPOCITI NON VITALI	36
2. CORRISPONDENZA TRA AREE PERILIPINA-NEGATIVE E AREE FIBROTICHE	40
3. ASPETTI ULTRAISTRUTTURALI DELLE CELLULE ADIPOSE AL TEM	44
4. QUADRO INFIAMMATORIO DEI TESSUTI ADIPOSI OBESI	46
DISCUSSIONE.....	51
CONCLUSIONE	59
BIBLIOGRAFIA	60

INTRODUZIONE

1. L'OBESITA'

1.1. Definizione

L'obesità è una patologia caratterizzata da un accumulo eccessivo di grasso corporeo, che comporta numerosi rischi per la salute dell'individuo.

La causa che determina l'aumento di peso viene attribuita principalmente a un'assunzione di calorie in quantità eccessive rispetto a quelle che vengono consumate. Tuttavia, in un numero limitato di casi è da ricondurre a fattori genetici, a motivi di salute o a malattie psichiatriche.

L'obesità, inoltre, è uno dei principali fattori di rischio per lo sviluppo di molte patologie croniche quali malattie cardiovascolari, ipertensione, diabete e alcune forme neoplastiche, così come anche un aumento del rischio di riduzione dell'aspettativa di vita.

1.2. Epidemiologia

L'obesità rappresenta un problema di rilevanza mondiale nella società odierna, configurandosi, secondo l'Organizzazione Mondiale della Sanità, come una vera e propria epidemia. Le più recenti evidenze scientifiche indicano che la diffusione del sovrappeso e dell'obesità stia aumentando drammaticamente in tutto il mondo e stia riguardando livelli allarmanti di adolescenti e bambini. Un bambino obeso nell'80/85% dei casi sarà un adulto obeso.

Secondo le più recenti stime dell'Organizzazione per la Cooperazione e lo Sviluppo Economico (OCSE - 2014) il 64,3% della popolazione adulta degli Stati Uniti ha un problema di eccesso di peso, e tra questi quasi la metà è in stato di obesità. In Europa l'epidemia dell'obesità si è diffusa negli ultimi decenni anche coinvolgendo la maggioranza della popolazione adulta europea (51,6% media EU-28 nel 2014), con notevole diffusione nei paesi dell'Europa dell'Est (*Figura 1*).

In Italia l'obesità rappresenta un fenomeno in preoccupante aumento e, secondo le stime riferite al 2014, il 35% circa degli adulti è in sovrappeso e il 10% circa è obeso. In Italia si registra il record europeo di obesità infantile, il 36% dei bambini è in sovrappeso e il 10-15% è obeso, un dato particolarmente allarmante.

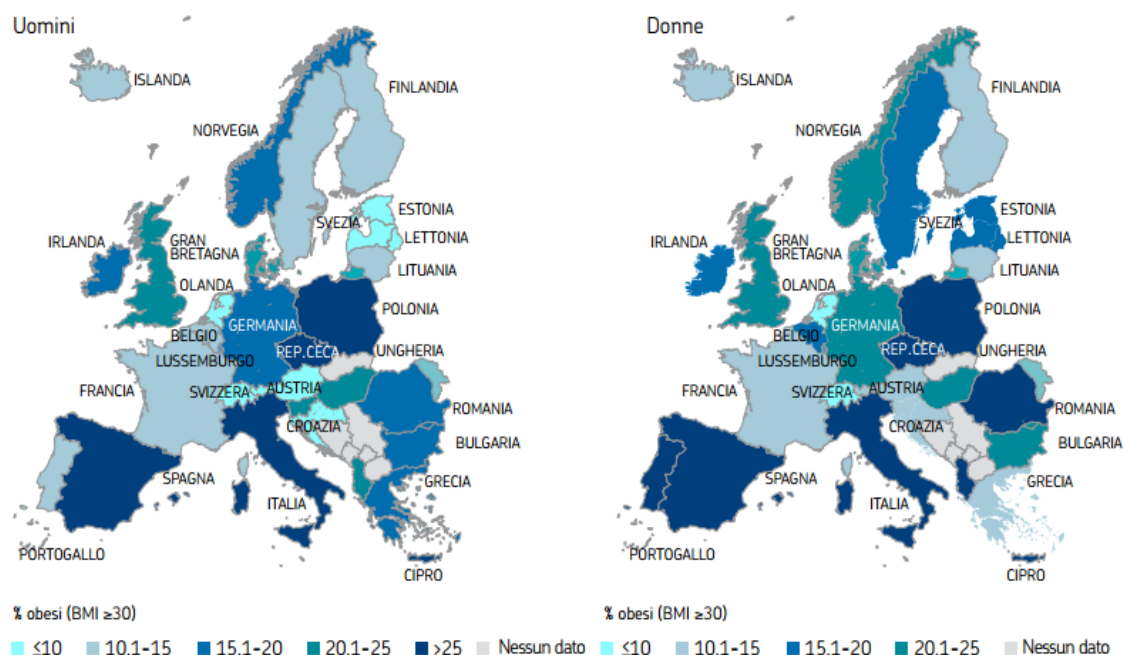


Figura 1: *Obesità in Europa, negli uomini (sinistra) e nelle donne (destra), 2008 (Berghöfer A. et al., 2008).*

Lo status di obeso rappresenta un problema per la salute pubblica per l'aumento del rischio di mortalità da disturbi e patologie ad essa associati e per la notevole spesa economica che comporta per l'individuo e per la società. L'importanza di agire in un'ottica di prevenzione, attuando modifiche nello stile di vita dell'individuo, sta diventando sempre più urgente.

1.3. Diagnosi

L'Organizzazione Mondiale della Sanità definisce l'obesità attraverso l'indice di massa corporea (IMC o BMI, dall'inglese "Body Mass Index"), un dato biometrico che mette a confronto peso e altezza: sono considerati obesi i soggetti con IMC maggiore o uguale a 30 kg/m², mentre gli individui con IMC compreso fra 25 e 29.9 kg/m² sono ritenuti in sovrappeso (*Tabella 1*) (**World Health Organization, 2000**). L'indice di massa corporea si calcola dividendo il peso del soggetto (espresso in chilogrammi) per il quadrato della sua altezza (espressa in metri).

IMC/BMI	Classificazione
< 18.5	sottopeso
18.5–24.9	peso normale
25.0–29.9	sovrappeso
30.0–34.9	obesità di classe I
35.0–39.9	obesità di classe II
≥ 40.0	obesità di classe III

Tabella1: valori di BMI e rispettive classi della popolazione.

1.4. Complicanze

Negli ultimi anni l'obesità ha raggiunto proporzioni epidemiche e la si sta riconoscendo come una delle maggiori problematiche nel campo della salute pubblica poiché essa risulta essere associata ad un aumentato rischio di nocività, disabilità e mortalità.

Le complicanze relative all'obesità sono tante e comprendono: la sindrome metabolica, il diabete mellito di tipo 2, malattie cardiovascolari (principalmente infarto e ictus), disturbi epatici (steatoepatite non alcolica che può evolvere in cirrosi), malattia della cistifellea (colelitiasi), reflusso gastroesofageo, apnea ostruttiva del sonno (OSAS), disturbi del sistema riproduttivo (compresi infertilità, basso livello sierico di testosterone negli uomini e sindrome dell'ovaio policistico nelle donne), molti tumori (in particolare tumori del colon e della mammella), artrosi, disturbi tendinei e fasciali, disturbi della pelle (come le infezioni intertriginose) nonché problemi sociali, economici e psicologici (**Haslam DW et al. 2005; Bray GA, 2004**).

Si configura, pertanto, come un vero problema di salute pubblica.

1.4.1. Sindrome metabolica

Si definisce “sindrome metabolica” la compresenza, in un individuo di almeno tre dei seguenti fattori (**Hurst J.W., 2009; Harrison T.V., 2014**):

- obesità addominale (circonferenza vita: uomini >102 cm, donne >88 cm);
- ipertrigliceridemia (>150 mg/dl), oppure trattamento farmacologico in atto per ipertrigliceridemia;
- basso colesterolo HDL (uomini <40 mg/dl, donne <50 mg/dl), o terapia farmacologica specifica;
- ipertensione arteriosa (>130 mmHg di sistolica e >85 mmHg di diastolica) oppure trattamento farmacologico in atto;
- iperglicemia (a digiuno >100 mg/dl) o terapia farmacologica specifica, o precedente diagnosi di diabete mellito di tipo 2.

1.4.2. Diabete mellito di tipo 2

Il **diabete** è una condizione patologica in cui si ha un'elevata concentrazione di glucosio nel sangue, causata generalmente da una mancata produzione di

insulina da parte delle cellule beta del pancreas o da un malfunzionamento dei recettori insulinici.

I sintomi caratteristici comprendono poliuria (abbondante produzione di urina), polidipsia (abbondante ingestione di acqua) e polifagia (fame eccessiva).

Le due forme principali di diabete sono il Diabete mellito di tipo 1 (o diabete insulino-dipendente) e il Diabete mellito di tipo 2 (o diabete insulino-indipendente).

In particolare, il **diabete mellito di tipo 1** è una vera e propria malattia autoimmune (*McDevitt H.O. et al., 2008*).

È causato da una carenza assoluta di insulina nell'organismo (*Rotella C.M., et al., 1999*) ormone fisiologicamente prodotto dalle cellule beta del pancreas che, stimolando l'assunzione del glucosio nelle cellule muscolari e adipose, ne diminuisce la concentrazione nel sangue. In questa patologia, a carattere autoimmune, gli autoanticorpi distruggendo le cellule beta del pancreas (*Foulis A.K. et al., 1991*) determinano una mancata produzione di insulina e di conseguenza elevati livelli di glicemia. Questa manifestazione è tipica nei soggetti al di sotto dei 20 anni.

Di tutte le complicanze il **diabete mellito di tipo 2** è quello maggiormente correlato all'obesità: è presente in circa il 90% dei soggetti obesi ed è tipico dell'età adulta, infatti interessa individui di età compresa tra 40 e 65 anni.

Il diabete di tipo 2 è definito anche diabete insulino-indipendente (NIDDM), poiché non è provocato da un'insufficienza assoluta nella produzione di insulina, come nel diabete mellito di tipo 1, ma da un deficit e da un'insufficienza numerica dei recettori insulinici: l'insulina viene fisiologicamente prodotta dal pancreas ma una prolungata e abitudinaria iperalimentazione porta ad un'insufficiente produzione di insulina e ad un malfunzionamento o un'insufficienza numerica dei recettori che ne impediscono la loro azione di entrata di glucosio nelle cellule (condizione definita insulino-resistenza) (*Gardner et al., 2011*).

In un primo momento il pancreas compensa producendo maggior insulina (stadio di perinsulinemia) e di conseguenza i recettori insulinici diminuiscono la loro sensibilità a questo ormone ed anche la loro espressione sulla superficie delle cellule, successivamente, il pancreas non riesce più a compensare e si ha l'instaurarsi del diabete (glicemia a digiuno ≥ 126 mg/dl) (*Groop L., 2000*).

Insorge solitamente in soggetti obesi o in sovrappeso dove lo stato infiammatorio cronico del tessuto adiposo obeso produce continue citochine infiammatorie che, a lungo andare, oltre a provocare vari danni all'organismo per la tossicità che queste assumono, vanno ad interferire con la funzionalità dei recettori insulinici comportando una mancata azione dell'ormone.

1.4.3. Malattie cardiovascolari

Un alto tasso di mortalità nei soggetti in sovrappeso è causato dalle malattie cardiovascolari quali la sindrome coronarica, l'ictus e la vasculopatia periferica. Infatti, l'ipertensione e l'aumento di colesterolo in circolo sono importanti fattori di rischio associati all'obesità. Una perdita di peso di 10 kg può determinare un calo del 15% dei livelli di colesterolo LDL (*Dattilo et al., 1992*).

1.4.4. Tumori correlati all'obesità

Un altro effetto del sovrappeso, inoltre, è l'insorgenza di alcuni tipi di neoplasie gastrointestinali e ormono-dipendenti. Aumenta, in particolare, l'incidenza di cancro al seno, all'endometrio, alle ovaie e all'utero nelle donne obese e alla prostata e al retto negli uomini. L'associazione più netta è con il cancro al colon, per il quale il rischio è aumentato di quasi tre volte in entrambi i sessi (*Kaaks R et al., 2000*).

2. ANATOMIA DELL'ORGANO ADIPOSO

Il tessuto adiposo, classicamente considerato un tessuto connettivo, non organizzato in un organo anatomicamente definito, risulta, invece, avere un'anatomia ben definita, una specifica vascolarizzazione e innervazione e un'alta

plasticità fisiologica tale da poter meritare la denominazione di “organo adiposo” (**Cinti S., 1999**).

L'organo è costituito da diversi depositi adiposi situati in due compartimenti principali del corpo: alcuni si localizzano sotto la pelle (depositi sottocutanei) e altri sono nel tronco (depositi viscerali). Pertanto, i tessuti adiposi possono essere considerati come un unico organo multi-deposito (**Cinti S., 2001; Cinti S., 2005**).

Si compone, inoltre, di due tessuti: il tessuto adiposo bianco (white adipose tissue, WAT) e il tessuto adiposo bruno (brown adipose tissue, BAT), denominati così per il colore che presentano alla dissezione anatomica. I tessuti adiposi sono composti da cellule ricche di lipidi, per questo definite “adipo-citi”.

Esistono due tipi principali di adipociti che differiscono per caratteristiche morfologiche e funzionali e vengono quindi distinti in adipociti bianchi, o “uniloculari” (con un unico vacuolo lipidico), che compongono il tessuto adiposo bianco e in adipociti bruni, o “multiloculari” (con molteplici vacuoli lipidici), che costituiscono il tessuto adiposo bruno.

2.1. Istologia

2.1.1. Tessuto adiposo bianco (WAT)

Il tessuto adiposo bianco (o WAT) viene chiamato così in quanto appare di colore biancastro o giallo alla dissezione e al microscopio ottico. Il tessuto è composto principalmente da adipociti bianchi ma anche da altri tipi cellulari tra cui cellule vascolari (endoteliali, pericitiche, muscolari e avventizie), cellule nervose (cellule di schwann, cellule perineurali e neuroni) e nell'interstizio, inoltre, sono sempre presenti cellule immunitarie.

La cellula adiposa bianca è di forma sferica e di notevoli dimensioni (70/80 μm). E' delimitata da una lamina esterna (membrana basale) costituita da collagene IV, un nucleo schiacciato alla periferia e un sottile anello di citoplasma, povero di organuli, che circonda una singola goccia lipidica, ricca di trigliceridi, che costituisce circa il 90% del volume della cellula (*Figura 2*).

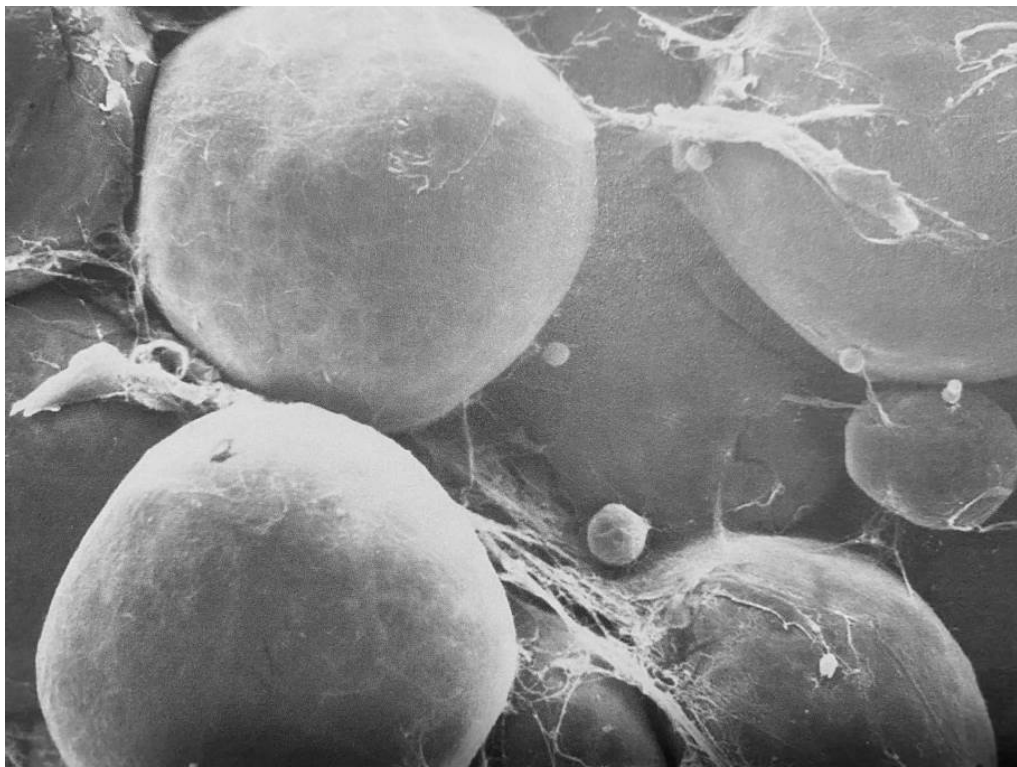


Figura 2: *Cellule adipose bianche, SEM (microscopia elettronica a scansione) (Cinti S., Springer 2018)*

Questa determinata morfologia consente agli adipociti di adempiere nel modo più adeguato alla loro principale funzione che è quella di rifornire l'organismo dell'energia atta ad affrontare le continue richieste energetiche, indipendentemente dalla frequenza dei pasti. La forma sferica rappresenta il miglior modo di accumulare volume nel minimo spazio e consente anche di esportare una notevole massa di molecole energetiche, senza modificare troppo l'anatomia del tessuto.

Le cellule adipose sono anche cellule endocrine in grado di secernere molti fattori paracrini ed endocrini, tra cui uno dei più importanti è la leptina. La leptina ha un importante ruolo nel controllo dell'accumulo energetico nell'organismo perché riflette la quantità di grasso bianco e induce alla ricerca e assunzione di cibo

quando i suoi livelli sono bassi (**Zhang Y., 1994; Cinti S., 1997; De Matteis R., 1998**).

Il meccanismo di controllo della secrezione leptinica appare principalmente legato alla quantità di tessuto adiposo bianco presente nell'organismo, pertanto nei soggetti obesi la leptinemia è generalmente assai elevata e si ipotizza che in essi si instauri una sorta di leptino-resistenza (**Maffei et al. 1995**).

2.1.2. Tessuto adiposo bruno (BAT)

Il tessuto adiposo bruno (o BAT) appare di colore “bruno” a causa dell’alta densità di mitocondri, della rete vascolare e dell’elevata innervazione.

Il “BAT” è costituito da cellule adipose di forma poligonale con un nucleo rotondeggiante, in posizione centrale, e un citoplasma con numerose piccole gocce lipidiche, per questo motivo definite anche “cellule multiloculari” (*Figura 3*).

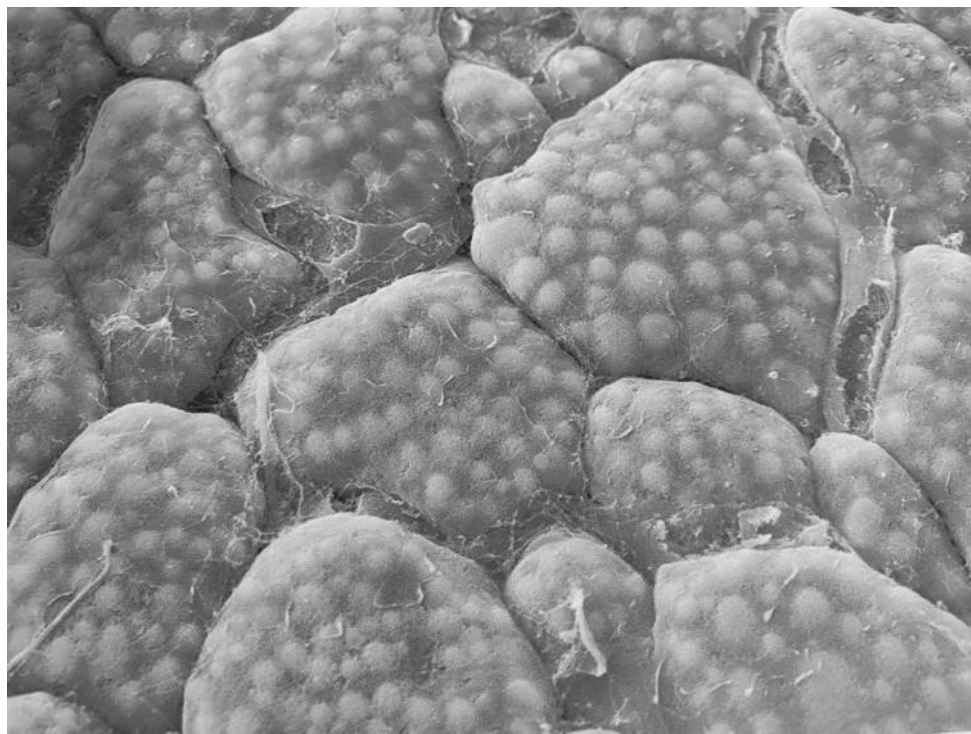


Figura 3: cellule adipose brune, SEM (microscopia elettronica a scansione) (**Cinti S., Springer 2018**).

Lo spazio intracitoplasmatico fra i vacuoli lipidici è occupato da numerosi mitocondri con lunghe creste trasversali.

Questa particolare morfologia mitocondriale è funzionale all'elevata attività dei mitocondri di questi adipociti: l'estensione della superficie della membrana interna consente al mitocondrio un'elevata attività funzionale dovuta alla presenza, nella membrana interna delle creste, di una proteina, la "uncoupling protein 1" (UCP1), espressa esclusivamente in queste cellule e che ha lo scopo di produrre calore disaccoppiando l'attività della catena respiratoria mitocondriale (**Cinti S. , 2017**).

Questa proteina è espressa unicamente dagli adipociti bruni ed è responsabile del meccanismo molecolare di produzione di calore (termogenesi).

2.2. Anatomia macroscopica

La dissezione anatomica dimostra come il tessuto adiposo abbia le caratteristiche anatomiche di un vero e proprio organo: dissecabile interamente come un'unica struttura con continuità tra le varie componenti e costituito da due tessuti che cooperano funzionalmente (**Cinti S., 1999**).

In tutto l'organo non esistono barriere anatomiche tra le regioni contenenti adipociti bianchi (tessuto adiposo bianco o WAT) e quelle contenenti adipociti bruni (tessuto adiposo bruno o BAT): sono macroscopicamente ben distinti ma coesistono nell'intera struttura (*Figura 4*).



Figura 4: Organo adiposo: disseccabile come un'unica struttura con continuità tra le varie componenti (a sinistra); WAT e BAT macroscopicamente ben distinti ma continui l'uno nell'altro, nell'intera struttura (a destra) (Cinti S., Springer 2018).

Se andiamo, infatti, ad osservarlo tramite il microscopio ottico è possibile notare che i depositi adiposi in realtà sono misti: i depositi apparentemente bianchi presentano comunque una percentuale di adipociti bruni, eccetto alcuni determinati depositi che mostrano una netta prevalenza di uno dei due citotipi (Vitali et al., 2012) (Figura 5).

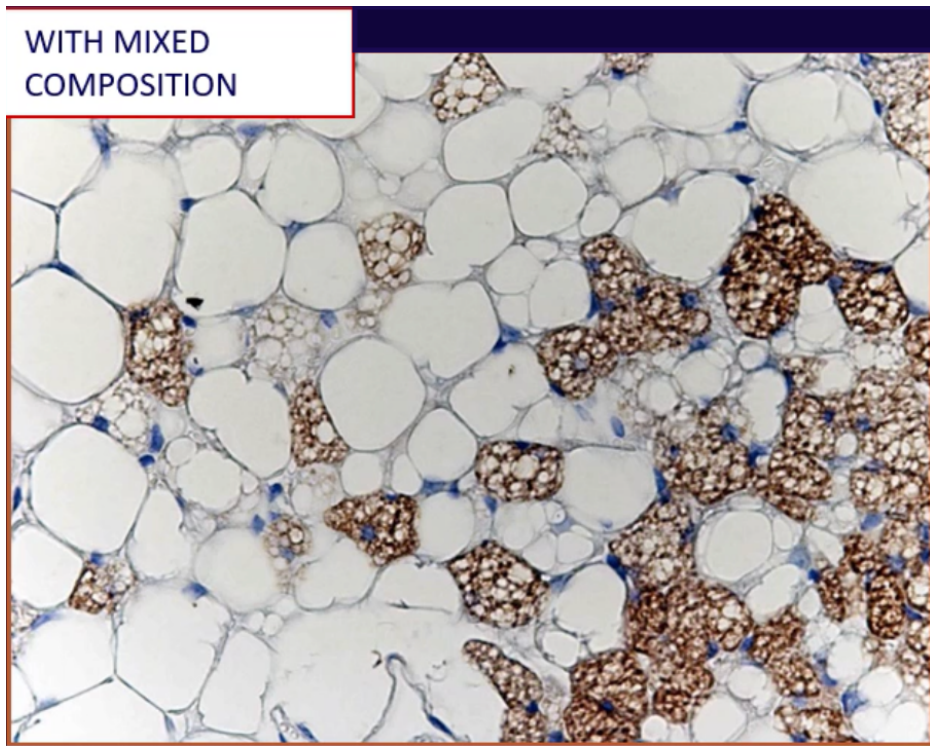


Figura 5: Area di tessuto adiposo misto, bianco e bruno, osservata al microscopio ottico (IHC per UCP1), in depositi che alla dissezione appaiono bianchi (**Cinti S., Springer 2018**).

L'organo adiposo, inoltre, si organizza in depositi sottocutanei e viscerali che presentano una chiara autonomia anatomica dal resto dell'organismo, ognuno provvisto di propri peduncoli vascolo-nervosi. Nei modelli murini possiamo distinguere i depositi "maggiori", come il sottocutaneo anteriore (interscapolare) e il sottocutaneo posteriore, e i depositi "minori", come quello mediastinico, mesenterico, omentale, perirenale, perivascolare, pelvico e retroperitoneale. Il deposito perivescicale è tipicamente più ricco di adipociti bianchi, il deposito sottocutaneo anteriore, specie nella regione interscapolare, tipicamente più bruno.

3. FISIOLOGIA (LA PLASTICITÀ DELL'ORGANO ADIPOSO)

Le funzioni principali di questo organo sono: la termogenesi (svolta dal BAT) e la funzione di riserva energetica (svolta dal WAT), in quanto consente l'immagazzinamento di molecole ad alto contenuto energetico necessarie per la sopravvivenza nell'intervallo di tempo tra un pasto e l'altro.

I due tessuti adiposi, BAT e WAT, quindi, svolgono funzioni diverse e per tale motivo ci si è posti la domanda sul perché fossero presenti nello stesso organo.

A seguito di numerosi studi, condotti prevalentemente dal gruppo del professor Cinti, l'ipotesi maggiormente accreditata per spiegare la contemporanea presenza dei due tessuti è che essi abbiano la proprietà di interconvertirsi tra loro, motivo per cui l'organo adiposo è noto per avere un'elevata plasticità. Infatti, in caso di necessità particolari, come una prolungata esposizione al freddo o un bilancio energetico positivo cronico, la componente bruna o bianca, non direttamente interessata nella risposta di adattamento, si converte nel fenotipo di cui l'organismo necessita di più in quel momento. Pertanto, per soddisfare queste esigenze vengono attivati meccanismi di rimodellamento plastico per cui durante l'esposizione al freddo cronico aumenta la componente del BAT (fenomeno definito "browning"), mentre durante il bilancio energetico positivo prolungato aumenta il WAT ("whitening") (**Smorlesi et al., 2012- Giordano et al. 2017**)

Quello appena descritto è un fenomeno di rimodellamento tissutale, in quanto avviene una "trans-differenziazione", ossia una diretta conversione degli adipociti bruni in adipociti bianchi e viceversa, a seconda delle esigenze dell'organismo (**Cinti S., 2009**). Questo fenomeno di trans-differenziazione, e quindi di cooperazione tra i due tessuti adiposi, implica agli adipociti maturi differenziati di riprogrammare il proprio genoma in modo reversibile e dunque di cambiare fenotipo e funzione in risposta a stimoli fisiologici.

A conferma del fenomeno della transdifferenziazione nell'organo adiposo, il gruppo del prof. Cinti, ha osservato che anche il tessuto adiposo sottocutaneo della ghiandola mammaria va incontro a fenomeno di trans-differenziazione reversibile durante la gravidanza, allattamento e post-allattamento. In particolare, gli adipociti mammari sarebbero la fonte per la formazione delle cellule epiteliali che costituiscono le strutture lobulo-alveolari responsabili della produzione del

latte durante la gravidanza e l'allattamento (**Morroni M et al., 2004**). Questa teoria sostiene che le cellule epiteliali di nuova costituzione derivino da una trasformazione diretta degli adipociti uniloculari (transdifferenziazione "adipo-epiteliale"). Il processo sarebbe reversibile e nel post allattamento, le cellule epiteliali si trasformerebbero nuovamente in adipociti, ricostituendo l'anatomia di partenza.

3.1. Termogenesi

La funzione principale del tessuto adiposo bruno è la produzione di calore, o termogenesi, grazie alla presenza della proteina UCP1 posta nella membrana interna delle creste mitocondriali degli adipociti multiloculari (**Cinti S., 2017**).

Tuttavia, nel caso in cui l'esposizione al freddo diventa cronica (giorni o mesi), la quantità di tessuto bruno presente non è più sufficiente alle esigenze termogenetiche, e per questo motivo interviene la trans-differenziazione del tessuto adiposo bianco in tessuto adiposo bruno (il cosiddetto "browning") (*Figura 6*).

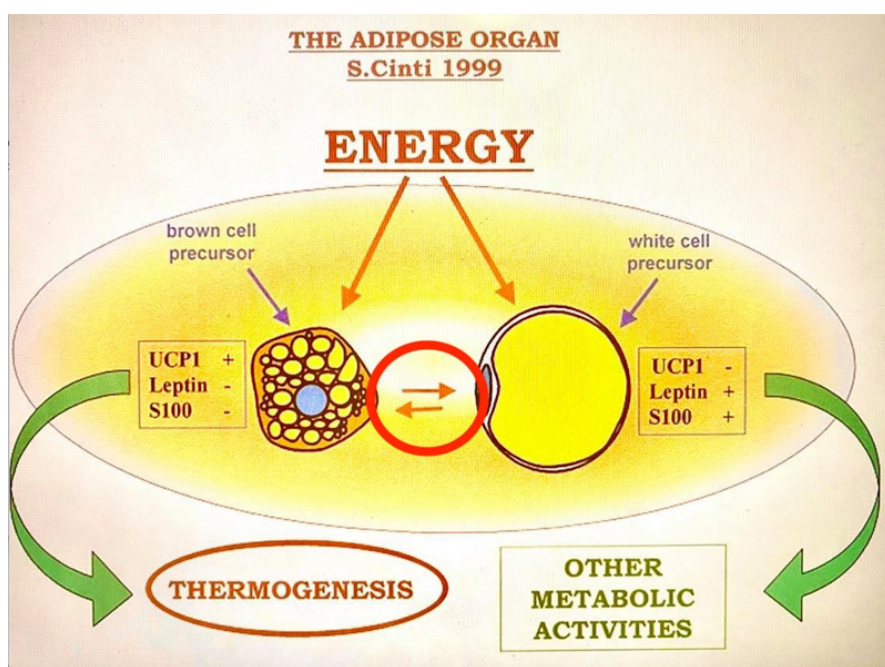


Figura 6: transdifferenziazione del tessuto adiposo bianco in bruno e viceversa, entrambi fenomeni reversibili (**Cinti S., 1999**).

Il tessuto adiposo bruno attivato modifica la sua morfologia: i vacuoli lipidici divengono più piccoli, i mitocondri assumono una forma sferica, e infine aumentano il numero e la densità delle creste mitocondriali (**Cinti S., Springer 2018**) (*Figura 7 a, b*).

Il meccanismo alla base del “browning” consiste nell’inattivazione di meccanismi inibitori, che bloccano il “fenotipo bruno” nella cellula adiposa bianca, in seguito a stimolo adrenergico con azione a livello del recettore $\beta 3$ adrenergico.

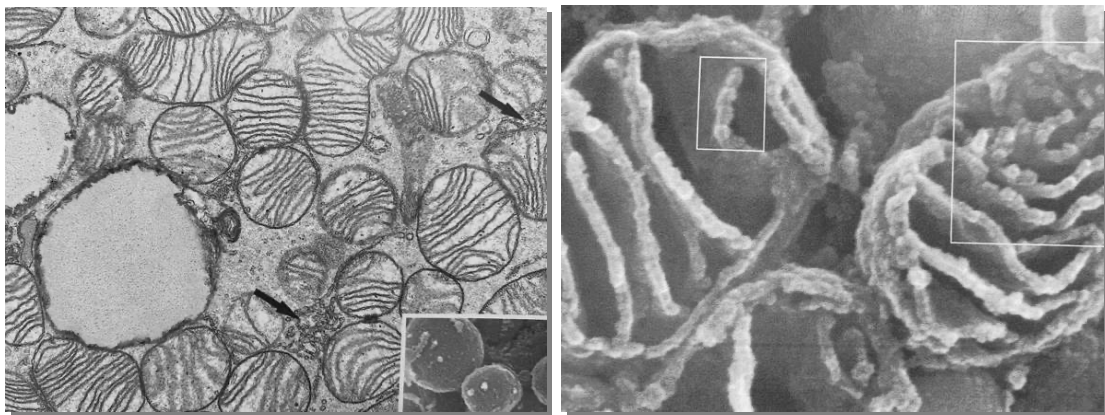


Figura 7: mitocondri in un BAT attivato: sferici (a), TEM ad alta risoluzione, con creste aumentate di numero e densità (b), HSEM (SEM ad alta risoluzione) (**Cinti S., Springer 2018**).

3.2. Funzione energetico-metabolica

La funzione principale del tessuto adiposo bianco è quella di permettere la sopravvivenza di un animale tra un pasto e l'altro, infatti, quando l'animale si sottopone a una dieta normale, il tessuto adiposo bianco accumula lipidi tramite le cellule adipose bianche. Tuttavia, quando l'organismo è sottoposto a una dieta obesogena con eccesso di calorie, l'organo adiposo accumula il più possibile queste preziose energie per la sopravvivenza, in previsione di un possibile periodo prolungato di digiuno: uno dei meccanismi con cui queste molecole energetiche vengono immagazzinate è appunto la trans-differenziazione degli adipociti bruni in adipociti bianchi (il cosiddetto “whitening”) (*Figura 6*).

4. L'ORGANO ADIPOSO NEGLI ESSERI UMANI

4.1. Anatomia dell'organo nell'uomo

A differenza del modello murino, la dissezione del tessuto adiposo negli esseri umani è molto complicata. Tuttavia, da qualche anno esiste un sistema di anatomia umana reale 3D, interamente segmentata, in cui è possibile studiare l'anatomia umana su cadaveri digitalizzati (*Figura 8*).



Sulle singole sezioni digitali è possibile evidenziare le zone occupate dal tessuto adiposo e quindi estrapolarle dal cadavere. Tenendo conto che esistono infinite sezioni seriali del cadavere, è possibile effettuare una ricostruzione tridimensionale dell'organo adiposo umano. Questo lavoro è in corso da parte del gruppo del prof. Cinti ma dati preliminari evidenziano come l'organo adiposo umano sia paragonabile a quello del topo in quanto i depositi sottocutanei occupano le estremità del corpo mentre i depositi viscerali la parte centrale e, addirittura, anche nell'uomo, sono presenti depositi di tessuto adiposo bruno nella parte corrispondente alla regione più craniale del topo.

Figura 8: Organo adiposo su cadavere digitalizzato. È possibile notare la presenza degli stessi depositi presenti nel murino: depositi sottocutanei (alle estremità), depositi viscerali (nella parte centrale dell'addome) e tessuto adiposo bruno nella parte più craniale, come nel topo (**Cinti S. dati non pubblicati**).

In particolare, il tessuto adiposo bruno è scarsamente presente nell'uomo adulto ma comunque è possibile evidenziarlo nelle sedi paracervicale, sopraclavicolare, interscapolare e perirenale. Al contrario considerevoli quantità del BAT sono presenti nei neonati, e questa condizione viene ripristinata nell'adulto in situazioni particolari come l'esposizione al freddo (**Saito et al., 2009**) o in caso di feocromocitoma (tumore che secreta adrenalina e noradrenalina, ormoni necessari per attivare il BAT) (**Frontini et al., 2013**). Uno studio recente del nostro laboratorio ha dimostrato che il tessuto adiposo bruno tende ad essere maggiormente presente nei giovani e nei soggetti magri (**Zingaretti MC et al., 2009**).

4.2. Plasticità dell'organo adiposo negli esseri umani

I casi esemplari di fenomeni di trans-differenziazione osservati nell'uomo, comprovanti la plasticità dell'organo, riguardano la diretta conversione del tessuto adiposo bianco in tessuto adiposo bruno sia in condizioni patologiche, come il feocromocitoma, sia in condizioni fisiologiche, come l'esposizione al freddo.

I soggetti affetti da feocromocitoma, tumore della midollare del surrene secernente adrenalina e noradrenalina, presentano alla PET (Tomografia a Emissione di Positroni) una grande quantità di BAT attivato. Differentemente, in seguito a resezione del tumore, facendo la PET non si osserva alcun segno di captazione, dimostrazione del fatto che il BAT si è spento dal punto di vista funzionale perché non vi sono più gli ormoni che attivano le cellule adipose brune (**Kuji I. et al., 2008**).

Inoltre, il lavoro di **Frontini A. et al. 2013** dimostra che è possibile rilevare cellule adipose brune e cellule pauciloculari, UCP1-positive, all'interno dell'omento, deposito adiposo tipicamente bianco. Dunque, non solo il BAT si attiva nei soggetti affetti da feocromocitoma ma questo lavoro evidenzia che i depositi bianchi puri

possono subire una trasformazione in cui compaiono delle vere e proprie cellule adipose brune UCP1 positive.

Tuttavia, il feocromocitoma è una condizione patologica, e il gruppo del prof. Cinti si è posto la domanda su cosa succedesse all'organo adiposo umano di fronte a uno stimolo fisiologico.

Efremova et al. dimostrano che i soggetti siberiani, esposti cronicamente a basse temperature, presentano un quantitativo di tessuto adiposo bruno molto più alto rispetto a quello solitamente presente in un adulto abitualmente esposto a temperature più miti. Biopsie di tessuto adiposo viscerale provenienti da questi soggetti evidenziano la presenza di veri e propri adipociti bruni e adipociti pauciloculari UCP1-positivi, dimostrazione del fatto che ci sia un'interconversione degli adipociti bianchi in adipociti bruni. Pertanto, non solo le condizioni patologiche inducono una diretta conversione degli adipociti bianchi in adipociti bruni, ma vi è una risposta molto chiara del tessuto adiposo umano anche a stimoli fisiologici ambientali come l'esposizione a basse temperature (**Efremova A. et al., 2019**).

5. L'ORGANO ADIPOSO OBESO

L'organo adiposo obeso sottoposto costantemente a un bilancio energetico positivo, per rispondere alle esigenze dell'organismo di accumulare tutte le energie possibili in previsione di un possibile digiuno, va incontro a un "rimodellamento patologico" con tutta una serie di alterazioni morfologiche e funzionali, tali per cui diventa un organo disfunzionale. La progressione verso lo stato obeso è determinata da un aumento del numero e delle dimensioni delle cellule adipose, fenomeni rispettivamente definiti iperplasia e ipertrofia cellulare (**Cinti S., Compr Physiol 2018**). Nel tempo questo rimodellamento tissutale è responsabile di un incremento del peso e delle dimensioni dell'organo, nonché di anomalie cellulari e tissutali.

5.1. Rimodellamento della matrice extracellulare

Una caratteristica dell'organo adiposo obeso è che il contenuto di fibre connettive aumenta drammaticamente a causa di un'upregolazione di vari tipi di collagene (***Khan T et al., 2009***).

Fisiologicamente gli adipociti sono circondati da un network di proteine della matrice extracellulare, necessario per fornire un supporto meccanico e quindi per mantenere l'integrità strutturale di queste cellule (***Sun K. et al., 2013***). Tuttavia, durante il periodo di bilancio energetico positivo la matrice extracellulare va incontro a un vero e proprio rimodellamento in cui si assiste a una variazione delle componenti proteiche che modificano la loro espressione (***Khan T et al 2009; Divoux A et al 2011; Sun K et al., 2013***). Pertanto questa aumentata deposizione di proteine della matrice extracellulare, come vari tipi di collagene, che si verifica nell'obesità, induce ad uno stato di fibrosi locale e tutto ciò si traduce in un'aumentata rigidità totale del tessuto adiposo.

L'incremento della rigidità della matrice extracellulare del tessuto adiposo contrasta la pressione continua degli adipociti a espandersi e quindi limita la loro espansione. Queste due azioni contrapposte provocano, nel tempo, uno stress meccanico sempre maggiore fino ad innescare meccanismi che determinano la morte degli adipociti e la conseguente infiammazione (***Khan T et al 2009; Divoux A et al 2010***).

5.2. Morte degli adipociti obesi per piroptosi e formazione delle Crown Like Structures (CLS)

Un ulteriore aspetto di fondamentale importanza che caratterizza il tessuto adiposo obeso è la notevole infiltrazione macrofagica, responsabile dello stato infiammatorio cronico dell'individuo obeso.

Nel 2003 due gruppi indipendenti (**Weisberg et al. 2003; Xu et al 2003**) hanno dimostrato che i tessuti adiposi obesi, sia negli animali sia nell'uomo, sono infiltrati da macrofagi e che a questa infiltrazione corrisponde l'insorgenza dell'insulino-resistenza. Inoltre, hanno trovato una correlazione positiva tra la dimensione degli adipociti e il numero dei macrofagi che infiltrava il grasso. Successivamente il gruppo del prof. Cinti ha condotto una serie di studi accurati per capire il motivo per il quale i macrofagi infiltrassero il tessuto adiposo. In particolare, hanno osservato i tessuti adiposi obesi con immunoistochimica per evidenziare la localizzazione dei macrofagi e, sorprendentemente, hanno trovato che non sono dispersi nel tessuto adiposo ma che si localizzano, quasi esclusivamente, attorno a quelle che potrebbero sembrare delle cellule adipose, formando delle strutture "a coroncina" (Crown Like Structures, CLS) (**Cinti J Lip Res 2005**) e che queste CLS sono molto più numerose negli animali e negli individui obesi rispetto ai magri (**Figura 9 e 10**).

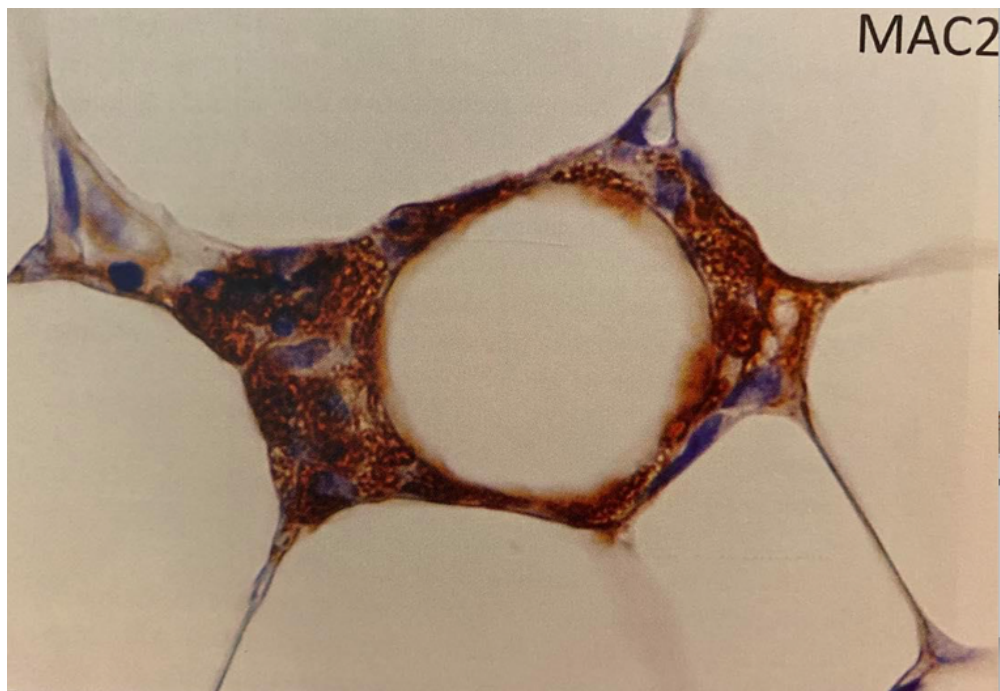


Figura 9: disposizione "a coroncina" dei macrofagi, IHC (Immunoistochimica) per MAC2 (**Cinti S., Springer 2018**)

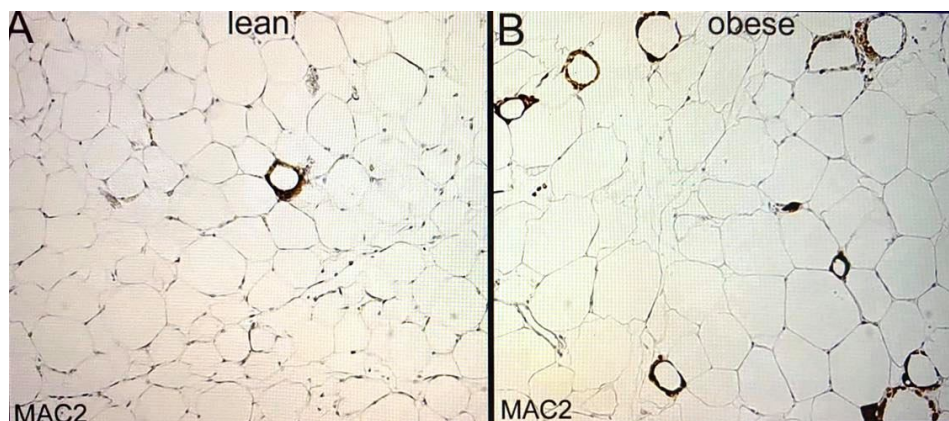


Figura 10: *Microscopia ottica di tessuto adiposo bianco viscerale di topo magro (A) e topo obeso ob/ob (B) che mostra macrofagi immunoreattivi per MAC2 (precipitato marrone) (Cinti S. J Lip Res 2005).*

In seguito, analisi immunoistochimiche e analisi di microscopia elettronica hanno rilevato che i macrofagi organizzati in coroncine rappresentano siti di riassorbimento di adipociti morti e che questi sono maggiormente presenti nel deposito adiposo viscerale rispetto al sottocutaneo, suggerendo quindi che gli adipociti viscerali hanno una “dimensione limite che induce la morte” (critical death size) minore degli adipociti sottocutanei (**Murano et al 2008**).

Al fine di capire la causa della morte degli adipociti è stato studiato un modello di topi geneticamente modificati, privi dell'enzima Hormon sensitive lipase (HSL), importante per la lipolisi. In questo modello animale le cellule adipose accumulano lipidi ma non li rilasciano: diventano quindi ipertrofiche, nonostante gli animali non siano obesi ma siano magri, e successivamente vanno incontro a morte. Questo studio è stato la dimostrazione che la morte cellulare dipende esclusivamente dallo stato ipertrofico più che da fattori esterni o dallo stato dell'animale (**Cinti J Lip Res 2005**).

Successivamente **Giordano et al 2013** hanno dimostrato, tramite studi morfologici e molecolari, il meccanismo attraverso il quale gli adipociti ipertrofici muoiono. In queste cellule adipose hanno evidenziato tutta una serie di alterazioni organulari e, tra queste, vi è la presenza di cristalli di colesterolo responsabili dell'attivazione dell'inflammosoma che, a sua volta, attivano la caspasi-1, responsabile dell'attivazione di interleuchine che portano la cellula a morte. Questo meccanismo di morte particolare prende il nome di "piroptosi".

5.3. La maggior patogenicità del grasso viscerale

Differenti dati suggeriscono una maggior patogenicità del tessuto adiposo viscerale rispetto al sottocutaneo. È stato notato, nell'uomo, che un alto valore di WHR (dall'inglese "Waist hip to ratio"), indice di accumulo di tessuto adiposo viscerale (centrale), che si ottiene facendo il rapporto tra circonferenza della vita e circonferenza dei fianchi, si correla con più probabilità a comorbidità (come il diabete) nonostante un basso BMI. Al contrario un basso WHR si correla a una bassa probabilità di comorbidità, nonostante un alto BMI (**Ohlson et al., 1985**).

Si riscontrano, inoltre, come già detto, in modelli murini e in soggetti obesi, un maggior numero di coroncine nel tessuto adiposo viscerale rispetto al deposito sottocutaneo, dimostrazione che le cellule adipose viscerali hanno una taglia di morte critica più bassa rispetto agli adipociti sottocutanei (**Murano et al., 2008**). Questa minor dimensione della taglia critica degli adipociti comporta, in caso di bilancio energetico positivo, una maggior infiltrazione macrofagica nel grasso viscerale che tenta di riassorbire le cellule adipose morte. Per questo motivo l'obesità viscerale, definita anche "obesità a mela", tipica dei soggetti maschili, è molto più grave dell'"obesità a pera" caratteristica delle donne.

5.4. La sequenza di eventi che portano a infiammazione, insulino-resistenza e diabete

Sulla base dei dati presentati, la sequenza di eventi che collegano l'obesità con la resistenza all'insulina e con il diabete mellito di tipo 2 potrebbero essere i seguenti:

1. ipertrofia dell'adipocita, dovuta alla condizione di obesità;
2. stress degli adipociti ipertrofici, principalmente nel grasso viscerale con alterazioni organulari;
3. produzione da parte dell'adipocita di:
 - MCP1 (chemoattrattante per i macrofagi);
 - IL1- β (stimola la produzione autocrina di sFRP4 che inibisce la produzione di insulina da parte delle cellule β del pancreas) (**Mahidi et al. 2012**);
4. morte dell'adipocita ipertrofico per piroptosi;
5. formazione di "CLS" e riassorbimento dei detriti derivati da adipociti morti obesi;
6. produzione di citochine da parte degli adipociti stressati e dei macrofagi che, a lungo andare, divengono tossiche per l'organismo;
7. disfunzione dei recettori insulinici (insulino-resistenza) e, a lungo andare, diabete mellito di tipo 2.

SCOPO DELLA TESI

L'organo adiposo obeso nell'uomo e nel topo, sottoposto costantemente a un bilancio energetico positivo, va incontro ad un "rimodellamento patologico" di ipertrofia e iperplasia tissutale che nel tempo determina anomalie cellulari e tissutali, responsabili di uno stato infiammatorio cronico da cui ne derivano insulino-resistenza, iperinsulinemia, diabete mellito di tipo2 e complicanze correlate. Pertanto, uno dei problemi fondamentali maggiormente studiato legato all'obesità è appunto l'infiammazione cronica dei tessuti adiposi.

Lo scopo di questa tesi è l'approfondimento morfologico di tessuti adiposi obesi umani, in cui il fenomeno della fibrosi è più accentuato che nei modelli murini.

Dunque, l'obiettivo è quello di verificare se l'infiammazione presente nel tessuto adiposo dei soggetti obesi, oltre ad essere dovuta alla dimostrata morte per piroptosi, possa essere causata anche da un'altra emergente morte delle cellule adipose, mai descritta prima, e definita da noi "morte per soffocamento".

Data la grande estensione di tessuto adiposo interessato da fibrosi, lo stato infiammatorio, a questo punto, sarebbe molto più esteso di quello descritto fino ad ora, correlato a coroncine.

MATERIALI E METODI

1. PAZIENTI E CONDIZIONI SPERIMENTALI

Sono state prese in esame biopsie di tessuto adiposo relative a 33 pazienti obesi sottoposti a interventi di chirurgia bariatrica presso l'Azienda Ospedaliera Universitaria di Ancona: ad ogni paziente è stato prelevato un campione di tessuto adiposo viscerale omentale e un campione di tessuto adiposo sottocutaneo, per un totale di 66 biopsie di grasso.

In tutti i casi è stato ottenuto un consenso scritto informato.

Riportiamo di seguito le caratteristiche principali dei soggetti in esame:

- Età media: 44,4 $\pm$ 8,5 anni
11 uomini (42,8 $\pm$ 8,9 anni)
22 donne (45,3 $\pm$ 12,1 anni)
- BMI medio: 43,6
10 uomini + 16 donne BMI > 40 (obesità patologica)
1 uomo + 2 donne BMI = 35/39.9 (obesità moderata)
1 donna BMI = 25/29.9 (sovrappeso)
- Diabete mellito di tipo 2 presente in 9 pazienti
(tutti con BMI > 40)

2. MICROSCOPIA OTTICA

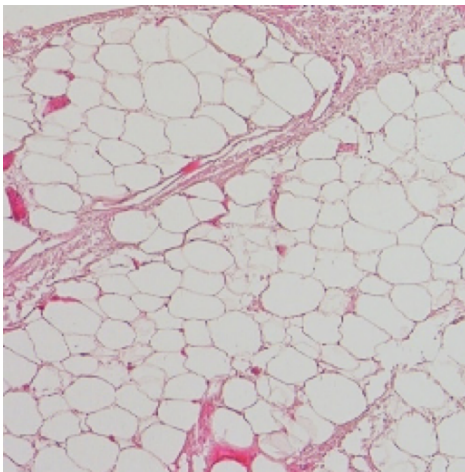
Per lo studio morfologico in microscopia ottica tutti i campionati di grasso omentale e grasso sottocutaneo sono stati processati con lo stesso trattamento:

1. fissazione in paraformaldeide al 4%, in una soluzione tampone di fosfato 0.1 M a pH 7.4, overnight a 4°C;

2. disidratazione tramite passaggi a concentrazione crescente di alcoli che vanno dal 75° (1 X 30'), al 96° (2 X 60'), al 100° (3 X 60');
3. chiarificazione in xilolo (2 X 60');
4. permanenza in paraffina liquida in stufa a 60° C overnight;
5. inclusione in paraffina in appositi blocchetti.

I blocchetti di paraffina, contenenti le singole biopsie, sono stati lasciati solidificare a temperatura ambiente e in seguito sono stati tagliati al microtomo a slitta. Questo tipo di microtomo effettua un movimento scorrevole su una guida orizzontale, con l'azione manuale dell'operatore e, intanto, taglia il blocchetto che, dopo ogni corsa, viene sollevato verso la lama di uno spessore corrispondente a quello prefissato, che nel nostro caso è di 3 µm per ogni sezione.

2.1. Colorazione con Ematossilina-Eosina



Le sezioni così ottenute sono state dapprima colorate con Ematossilina ed Eosina al fine di osservare morfologicamente i tessuti adiposi. In particolare l'Ematossilina è un colorante basico che ha un'affinità per il nucleo e per i vari componenti acidi del citoplasma che saranno, quindi, colorati in viola mentre l'Eosina è un colorante acido che colora in rosa il citoplasma e i vari tessuti basici (*Figura 11*).

Figura 11: *colorazione con EE*

Più precisamente i campioni sono stati deparaffinati in xilolo (2 X 10'), in seguito sono stati reidratati in una scala a concentrazione decrescente di etanolo (dal 100° al 50°). Successivamente le sezioni sono state colorate in Ematossilina per 2 minuti, lavate con dH₂O e poi colorate in Eosina per 30 secondi. Infine, sono stati effettuati una serie di passaggi in concentrazioni di etanolo crescenti per disidratare le sezioni colorate, le quali sono state montate con vetrino copri-

oggetto utilizzando una resina sintetica trasparente (*Eukitt*), e osservate al microscopio ottico.

2.2. Immunoistochimica (IHC)

Questa tecnica permette la localizzazione di proteine di nostro interesse, visualizzabili in microscopia ottica, tramite l'utilizzo di specifici anticorpi che riconoscono le molecole oggetto di indagine (antigeni) e, in particolare, hanno affinità per una sequenza chiamata epitopo o determinante antigenico.

L'immunoistochimica si basa sul principio di coniugazione antigene-anticorpo in addizione, poi, con sistemi di rivelazione (enzimatici/ fluorescenti) di cui è possibile, tramite microscopio ottico, visualizzarne l'avvenuta reazione.

La reazione è stata effettuata secondo il seguente protocollo standardizzato:

1. cerchiare i campioni sul vetrino con la penna a punta di diamante;
2. deparaffinare e reidratare i tessuti tramite la scala a concentrazione decrescente di etanolo;
3. smascherare (se necessario) i siti antigenici in soluzione acida, in pentola, a 96°C per 90 minuti;
4. bloccare la perossidasi endogena tramite incubazione dei tessuti con H₂O₂ 30% (in acqua distillata) in agitazione per 5 minuti;
5. 2 lavaggi in PBS 1X in agitazione;
6. incubazione dei campioni in un siero normale al 2% (in PBS) per 20 minuti in camera umida a temperatura ambiente;
7. incubazione dei campioni con anticorpo primario overnight a 4°C;
8. eseguire 3 lavaggi in PBS 1X in agitazione;
9. incubazione dei tessuti con anticorpo secondario biotinilato 1:200 (in PBS) per 30 minuti;
10. eseguire 2 lavaggi in PBS 1X in agitazione;
11. incubazione con il complesso avidina-biotina-perossidasi (Vectastain ABCKit, Vector Laboratories) per un'ora a temperatura ambiente;
12. eseguire 2 lavaggi in PBS 1X in agitazione;

13. incubazione con 3,3'-diaminobenzidina tetraidrocloruro (DAB) (Sigma-Aldrich) per 3 minuti;
14. eseguire un rapido lavaggio in dH₂O;
15. contrastare le sezioni con Ematossilina per 2 minuti;
16. disidratare i tessuti con la scala a concentrazione crescente di alcoli;
17. montare le sezioni con vetrino copri-oggetto utilizzando l'*Eukitt*

Gli anticorpi primari utilizzati nel nostro studio sono i seguenti indicati in tabella (Tabella 2):

ANTICORPO	DILUIZIONE	OSPITE	SMASCHERAMENTO	DITTA
Perilipin1	1:800	Polyclonal rabbit	NO	Abcam 3526
CD68	1:200	Monoclonal mouse	SI	Dako M0815

Tabella2: *Anticorpi primari utilizzati per l'immunoistochimica (IHC)*

In ogni reazione condotta è stata utilizzata una sezione come controllo negativo, in cui è stato omesso l'anticorpo primario e, l'eventuale colorazione risultante, considerata "fondo aspecifico" è stata utilizzata come riferimento per individuare la vera positività nelle restanti sezioni. Inoltre, è stata utilizzata una sezione come controllo positivo, in cui l'antigene è meglio rappresentato, per confermare la specificità dell'anticorpo primario e quindi la buona riuscita della tecnica.

2.3. Colorazione "Sirius Red"

La colorazione Sirius Red è una delle tecniche istochimiche più conosciute in grado di evidenziare selettivamente il network di fibre collagene (*Figura12*).

I campioni sono stati deparaffinati in xilolo (2 X 10') e reidratati con immersioni sequenziali di alcoli a concentrazione decrescente. In seguito i tessuti sono stati incubati con colorante Sirius Red per un'ora a temperatura ambiente.

Dopo un abbondante lavaggio in acqua, per eliminare il colorante in eccesso, le sezioni sono state contrastate con Ematossilina per 2 minuti, disidratate e infine montate con vetrino copri-oggetto utilizzando l'Eukitt.

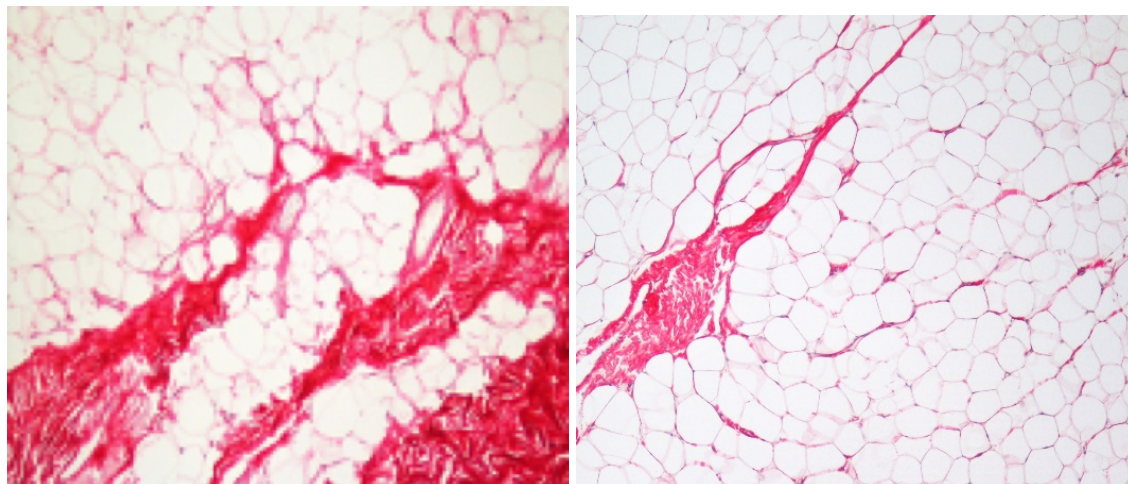


Figura 12: *Colorazione Sirius Red di depositi viscerali omentali.*

3. ANALISI MORFOMETRICA

Le sezioni di tessuto adiposo, colorate con le differenti tecniche di colorazione, precedentemente descritte, o utilizzate per reazione di immunoistochimica, sono state osservate al microscopio ottico (Nikon Eclipse E800) e, poi fotografate con fotocamera Nikon (DXM 1200).

Le immagini sono state analizzate con il programma di morfometria Image-J.

Più precisamente per poter verificare se la fibrosi possa essere correlata alla morte degli adipociti “per soffocamento” è stato ritenuto utile quantificare le aree perilipina-negative e mettere poi, queste ultime, in relazione con le aree fibrotiche.

- Per la quantificazione delle aree immunonegative per la Perilipina 1, il tessuto adiposo viscerale e sottocutaneo di ogni paziente è stato fotografato a ingrandimento 4X in un numero differente di foto in base alla grandezza della sezione. Con il programma Image-J è stata calcolata la

percentuale di negatività alla Perilipina 1 per ogni deposito adiposo di ciascun paziente misurando per ogni foto dapprima l'area tissutale totale e, successivamente, l'area tissutale risultata negativa alla reazione immunoistochimica. Infine, è stata calcolata la media delle percentuali di negatività alla Perilipina 1 di tutti i pazienti sia per l'omento sia per il sottocutaneo.

- Per la quantificazione della fibrosi, i tessuti adiposi viscerali e sottocutanei utilizzati per la colorazione Sirius Red sono stati fotografati con ingrandimento 10X in un numero differente di immagini in base alla loro grandezza. Tramite il programma morfometrico Image-J è stata misurata la percentuale di fibrosi di ogni foto dei due depositi adiposi relativi a 18 pazienti. In particolare, per quantificare il collagene, colorato di rosso, l'immagine viene convertita dapprima in una scala di grigi e in seguito viene "isolato" il colore rosso usando il Threshold. Infine, viene misurata l'area colorata selezionata e così viene calcolata la percentuale media di Sirius Red di ogni paziente e la media totale dei pazienti sia per l'omento sia per il sottocutaneo.

Inoltre, per studiare lo stato infiammatorio generale che caratterizza i tessuti adiposi obesi in esame è stata fatta una precisa quantificazione dei macrofagi presenti nei seguenti distretti: attorno all'adipocita morto (disposti a "coroncina"), all'interno di zone fibrotiche, nel parenchima, all'interno dei vasi e attorno ai vasi.

Sono state fotografate le sezioni di tessuto adiposo omentale e sottocutaneo di ogni paziente utilizzate per la reazione immunoistochimica con l'anticorpo primario CD68, marker dei macrofagi. In particolare, per ogni vetrino sono stati fotografati circa 25 campi random a ingrandimento 20X. Con il programma Image-J sono stati contati i macrofagi CD68 positivi, e precisamente per vedere la loro localizzazione nel tessuto adiposo dei pazienti in esame, sono stati suddivisi in 5 sottoclassi:

1. Macrofagi CD68+ relativi alle Crown Like Structure
2. Macrofagi CD68+ relativi alla fibrosi
3. Macrofagi CD68+ relativi al parenchima
4. Macrofagi CD68+ intravascolari

5. Macrofagi CD68+ perivascolari

Per ogni paziente è stata calcolata la percentuale dei macrofagi CD68 positivi presenti in ognuno dei 5 compartimenti analizzati, ed infine è stata calcolata la media per ognuna delle 5 sottoclassi sia per l'omento sia per il sottocutaneo.

4. MICROSCOPIA ELETTRONICA A TRASMISSIONE (TEM)

Per lo studio ultrastrutturale tramite microscopia elettronica a trasmissione, alcuni campioni di grasso omentale e grasso sottocutaneo sono stati processati con lo stesso trattamento, ma differente rispetto a quello utilizzato per la microscopia ottica:

1. fissazione in una soluzione di glutaraldeide al 2% e paraformaldeide al 2%, disciolta in una soluzione tampone di fosfato 0.15M a pH 7.35, a 4°C per almeno 4h;
2. post-fissazione in osmio tetrossido all'1% e ferrocianuro a 4°C per 1h;
3. disidratazione tramite passaggi a gradazione crescente di acetone 60° (5 X 5 minuti) e acetone 100° (5 X 5 minuti);
4. infiltrazione in resina epossidica (Epon-Araldite) tramite passaggio in una soluzione 1:1 acetone resina (per 20 minuti in stufa a 70°C), poi in una soluzione 1:3 acetone resina (per 20 minuti in stufa a 70°C), e infine in resina assoluta (per 20 minuti in stufa a 70°C);
5. inclusione in apposite formelline in stufa a 70°C overnight;

Per ogni campione di grasso omentale e grasso sottocutaneo sono state prima di tutto effettuate sezioni semifini di 1,5 µm colorate con blu di toluidina e osservate subito al microscopio ottico, le quali sono fondamentali per scegliere il campo migliore da osservare al microscopio elettronico. Successivamente, con l'ultramicrotomo MTX MICROM sono state eseguite almeno 2 sezioni fini (64 nm) per ogni campione che, in seguito, sono state colorate con citrato di piombo e studiate e fotografate al microscopio elettronico a trasmissione (TEM: Philips

CM10, Philips EM208). Gli ingrandimenti più elevati sono stati utilizzati per lo studio ultrastrutturale delle sezioni, quelli più bassi per l'orientamento.

5. ANALISI STATISTICA

I dati sono presentati come il valore medio $\pm$ l'errore standard (SEM).

Sono stati utilizzati lo "Student T test" e il "Kruskal-Wallis test" per l'analisi della significatività statistica. Valori di p inferiori a 0.05 sono stati considerati significativi.

In particolare: * indica $p < 0.05$, ** indica $p \leq 0.001$, *** indica $p \leq 0.0001$.

RISULTATI

Dati precedenti provenienti dal nostro laboratorio hanno evidenziato, tramite TEM e HRSEM (HRSEM: microscopia elettronica a scansione ad alta risoluzione), che adipociti obesi murini sono circondati da una moltitudine di fibrille collagene in stretta apposizione alla membrana basale e che presentano caratteristiche ultrastrutturali di stress e degenerazione cellulare (**Giordano et al., 2013**).

Partendo da questi dati, abbiamo eseguito uno studio sistematico di 66 biopsie di grasso viscerale e grasso sottocutaneo, prelevate da pazienti obesi durante gli interventi di chirurgia bariatrica, ottenendo i seguenti risultati.

1. IL TESSUTO ADIPOSO OBESO IPERTROFICO HA UN'AMPIA QUANTITÀ DI ADIPOCITI NON VITALI

Le biopsie adipose di soggetti obesi sono state processate per l'osservazione in microscopia ottica, e dalla colorazione Ematossilina-Eosina la nostra attenzione è stata focalizzata su singoli adipociti, o gruppi di adipociti, completamente circondati da fibre collagene. Pertanto, abbiamo deciso di verificare lo stato di queste cellule rilevando il marker di vitalità delle cellule adipose, la Perilipina 1. Quest'ultima è una proteina che si dispone sulla superficie del vacuolo lipidico ed è essenziale per impedire la lipolisi, a meno che non ci sia uno stimolo lipolitico e in questo caso la permette: dunque è un regolatore della lipolisi, una funzione fondamentale della cellula adiposa che rilascia i lipidi in modo da nutrire l'organismo tra un pasto e l'altro.

Pertanto, le sezioni di tessuto adiposo omentale e sottocutaneo sono state utilizzate per la reazione immunoistochimica con l'anticorpo primario Perilipina 1 e dall'osservazione mediante microscopio ottico è risultato chiaro che gran parte degli adipociti sono risultati positivi al marker, come in *Figura 13*. Tuttavia, sono state riscontrate aree interamente negative alla Perilipina 1, costituite quindi da adipociti morti in quanto sono caratterizzati dalla perdita di immunoreattività per la Perilipina (*Figura 14*) (**Murano et al., 2013**).

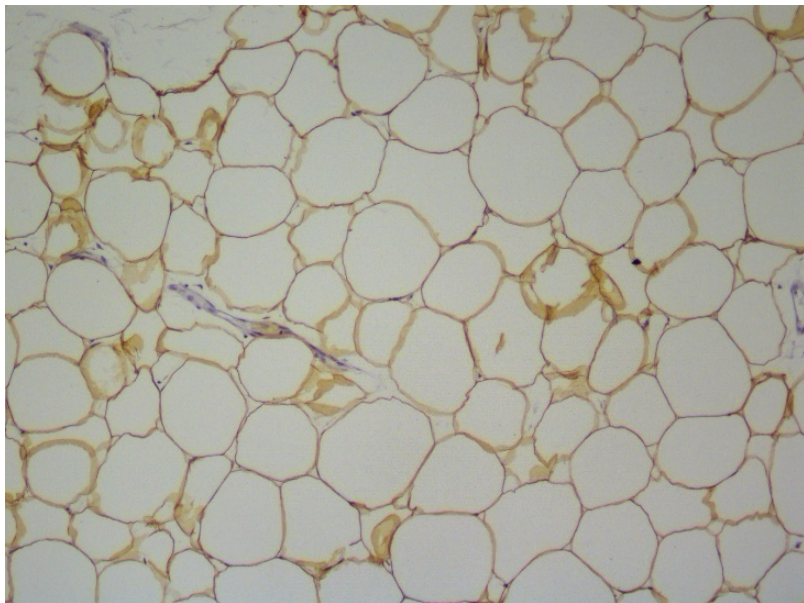


Figura 13: *Esempio di espressione positiva della Perilipina1 (precipitato marrone) tramite tecnica di immunoistochimica in tessuto adiposo omentale umano.*

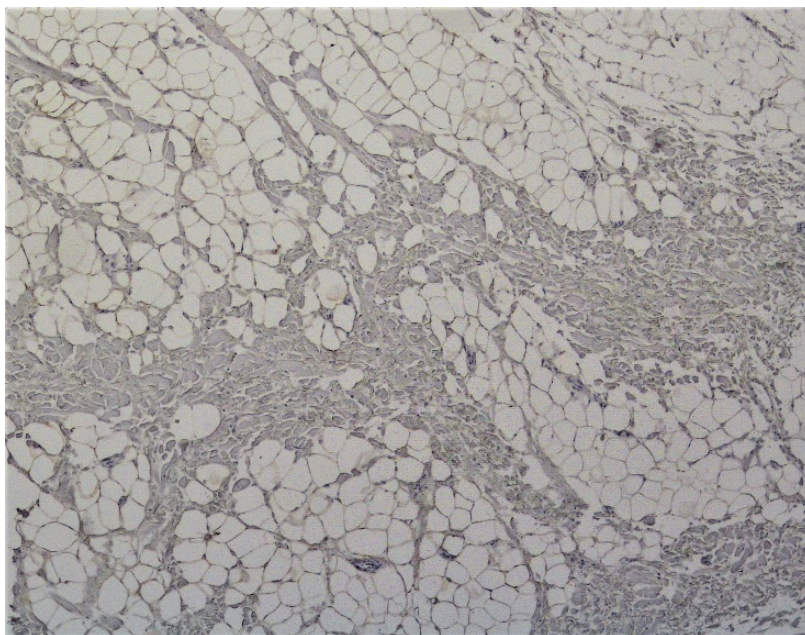


Figura 14: *Esempio di reazione immunoistochimica negativa alla Perilipina1 in tessuto adiposo sottocutaneo umano.*

Partendo da queste prime osservazioni morfologiche, abbiamo eseguito una quantificazione delle aree risultate negative per la Perilipina. In particolare, è stata effettuata un'analisi morfometrica calcolando la percentuale di negatività alla Perilipina dei campioni di tessuto adiposo omentale (*Figura 15a*) e sottocutaneo (*Figura 15b*) di tutti i pazienti, e dalla media di tutti i pazienti abbiamo trovato che gli adipociti non vitali sono circa il 12% per l'omento e il 16% per il sottocutaneo (*Figura 16*).

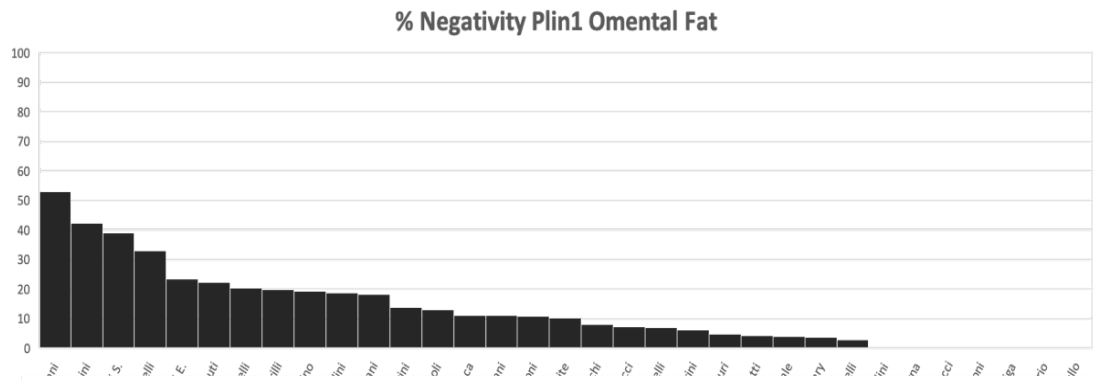


Figura 15a: Percentuale di adipociti Perilipina-negativi in tessuto adiposo omentale per paziente.

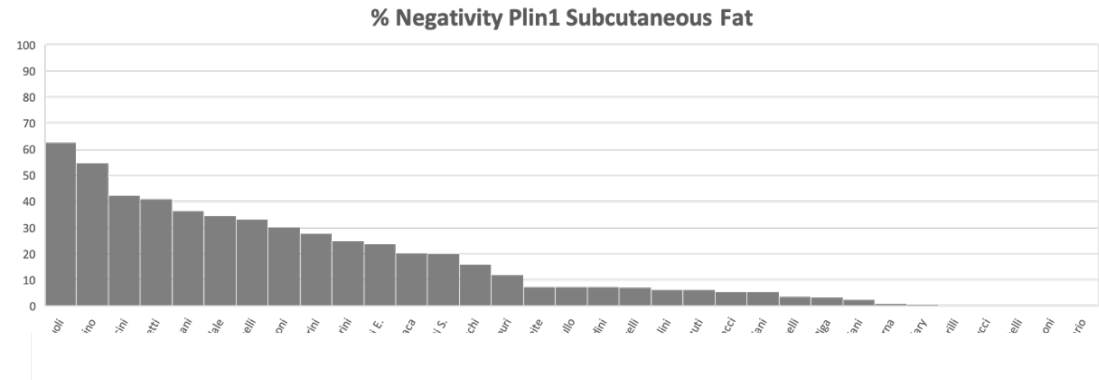


Figura 15b: Percentuale di adipociti Perilipina-negativi in tessuto adiposo sottocutaneo per paziente.

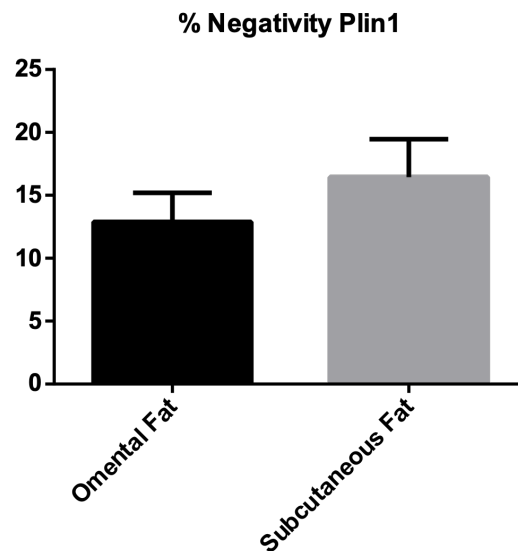


Figura 16: Percentuale media di negatività alla Perilipina di tutti i pazienti nel deposito adiposo viscerale e sottocutaneo.

Inoltre, è stata trovata una correlazione positiva significativa tra la percentuale di adipociti Plin-negativi nell'omento e adipociti Plin-negativi nel sottocutaneo (*Figura 17*), dimostrazione del fatto che la morte adipocitica non è relativa a un solo deposito adiposo ma ciò che vediamo nell'omentale si ripercuote anche nel sottocutaneo.

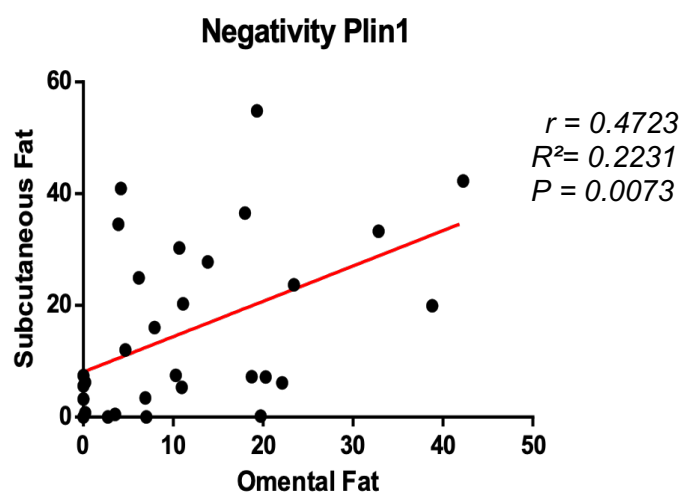


Figura 17: Correlazione positiva tra le aree immunonegative per la Perilipina nel grasso omentale e nel grasso sottocutaneo.

2. CORRISPONDENZA TRA AREE PERILIPINA-NEGATIVE E AREE FIBROTICHE

È stato notato che la maggior parte degli adipociti non vitali risiede in aree fibrotiche. Infatti, comparando due sezioni seriali di tessuto adiposo, una utilizzata per immunohistochimica e l'altra per la colorazione Sirius Red, si osserva che le aree adipocitiche negative per la Perilipina localizzano in aree infiltrate da fibrosi. È possibile, quindi, che ci sia un legame tra la fibrosi e la perdita di immunoreattività alla perilipina (*Figura 18*).

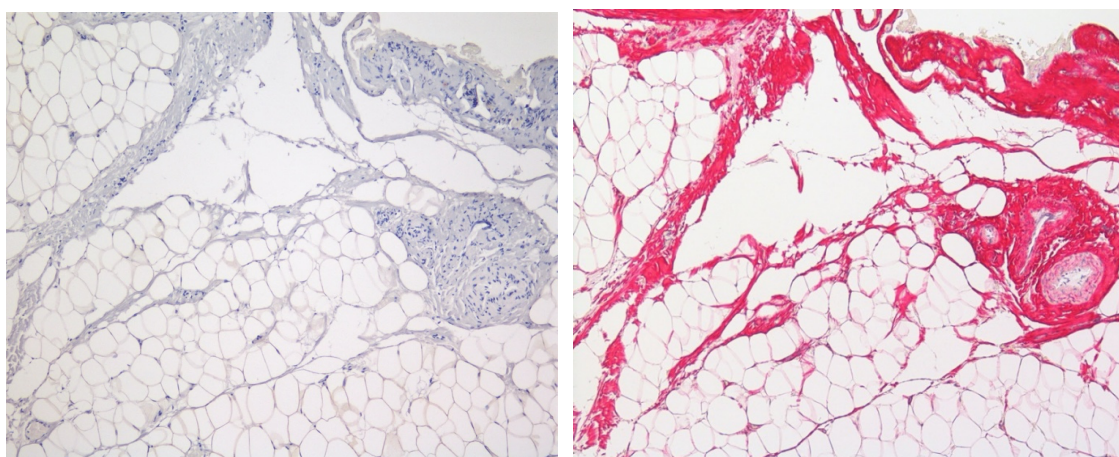


Figura 18: *Sezioni seriali di biopsia omentale di grasso in cui si nota a sinistra un'area di adipociti immunonegative per la Perilipina 1 (Immunohistochimica) che corrisponde, a destra, alla stessa area di fibrosi (Sirius Red).*

Inoltre, è stata rilevata una differente immunoreattività alla Perilipina in cellule adipose adiacenti, supportando quindi l'idea di una graduale perdita di questa proteina vitale. In particolare sono negativi gli adipociti circondati completamente da fibre collagene, mentre quelli adiacenti ma più distanti dalla fibrosi risultano essere positivi (*Figura 19*).

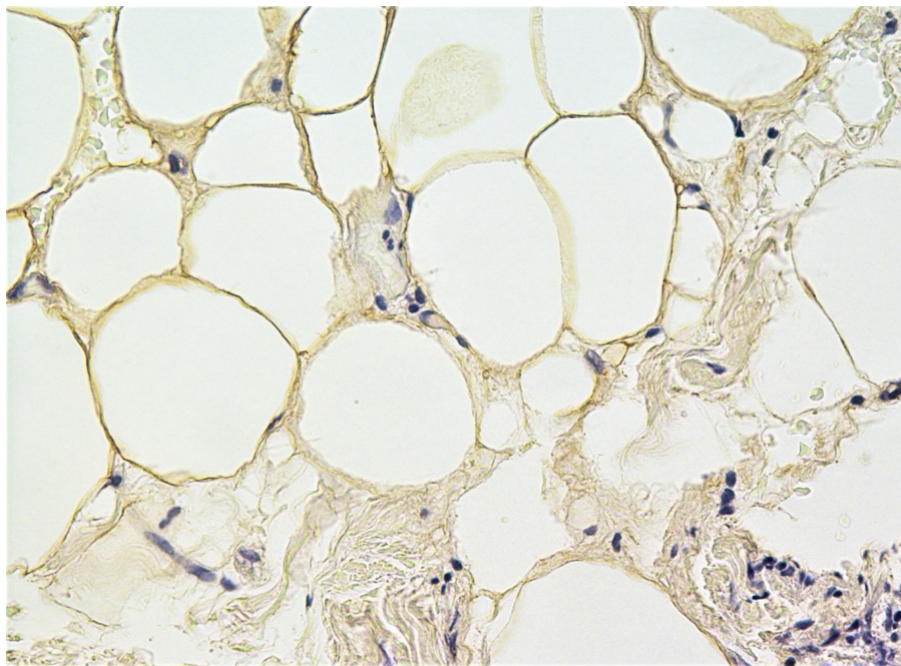


Figura 19: Perdita graduale di immunoreattività alla Perilipina 1. Si può osservare che le cellule adipose circondate da collagene sono negative, a differenza delle altre adiacenti che sono fortemente positive alla Perilipina.

In seguito a questi primi risultati, per quantificare la fibrosi, rilevata con Sirius Red, in ogni paziente abbiamo eseguito un'analisi morfometrica in cui è stata calcolata la percentuale di "red area" in 18 campioni di tessuto adiposo omentale (*Figura 20a*) e in 18 campioni di tessuto adiposo sottocutaneo (*Figura 20b*).

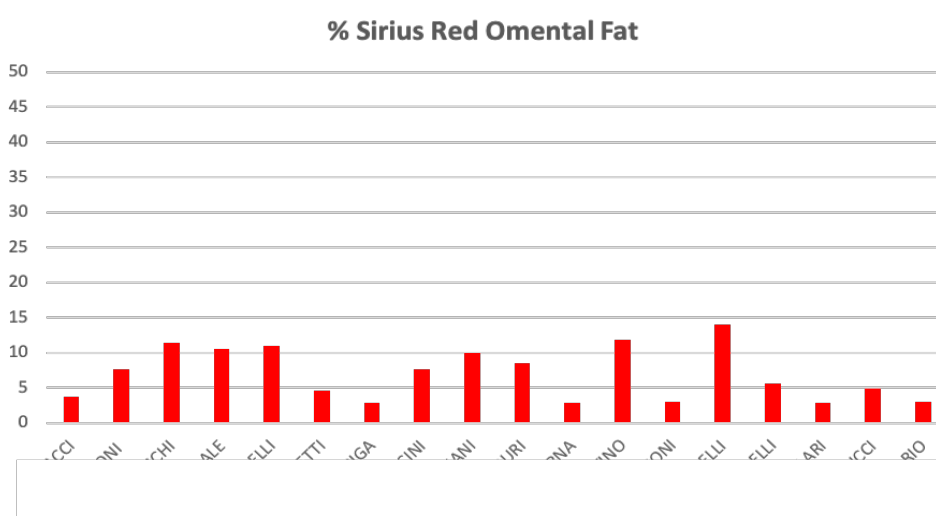


Figura 20a: Percentuale di fibrosi in tessuto adiposo omentale in 18 pazienti.

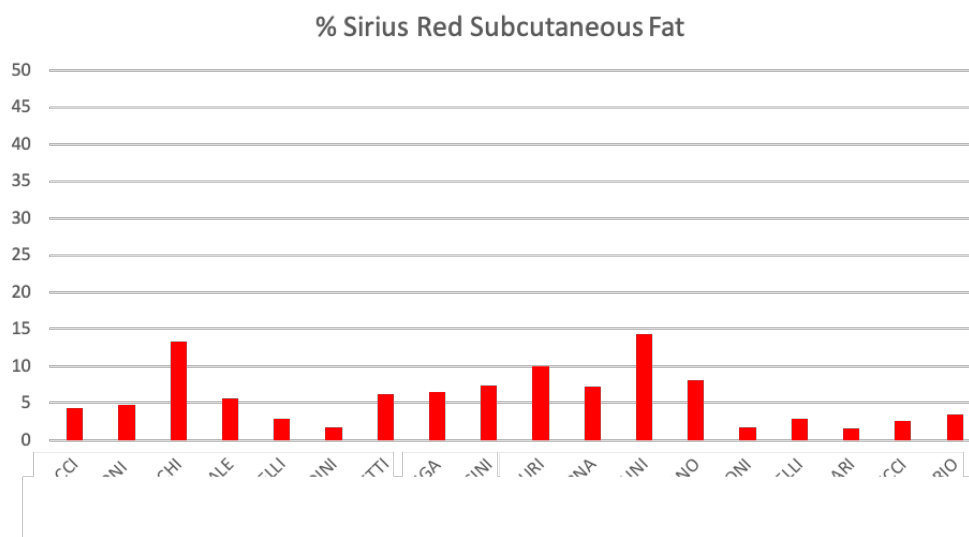


Figura 20b: Percentuale di fibrosi in tessuto adiposo sottocutaneo in 18 pazienti.

A questo punto dalla media delle percentuali di fibrosi nei singoli pazienti studiati, abbiamo ottenuto che il contenuto di collagene è circa il 7% per l'omento e il 6% per il sottocutaneo (Figura 21).

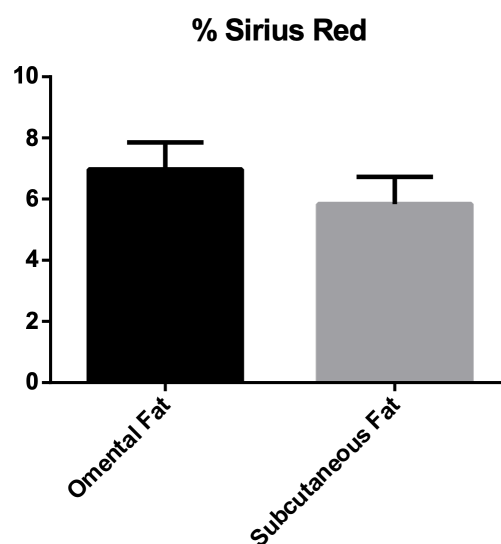


Figura 21: Percentuale media di fibrosi in 18 pazienti nel deposito adiposo omentale e sottocutaneo.

Per verificare se effettivamente esiste una relazione tra le cellule adipose negative per la Perilipina e la fibrosi, abbiamo correlato in entrambi i depositi adiposi la percentuale media di adipociti non vitali e la percentuale di fibrosi. Di fatti esiste una correlazione positiva, anche se non significativa, sia per il grasso omentale sia per il grasso sottocutaneo (*Figura 22*).

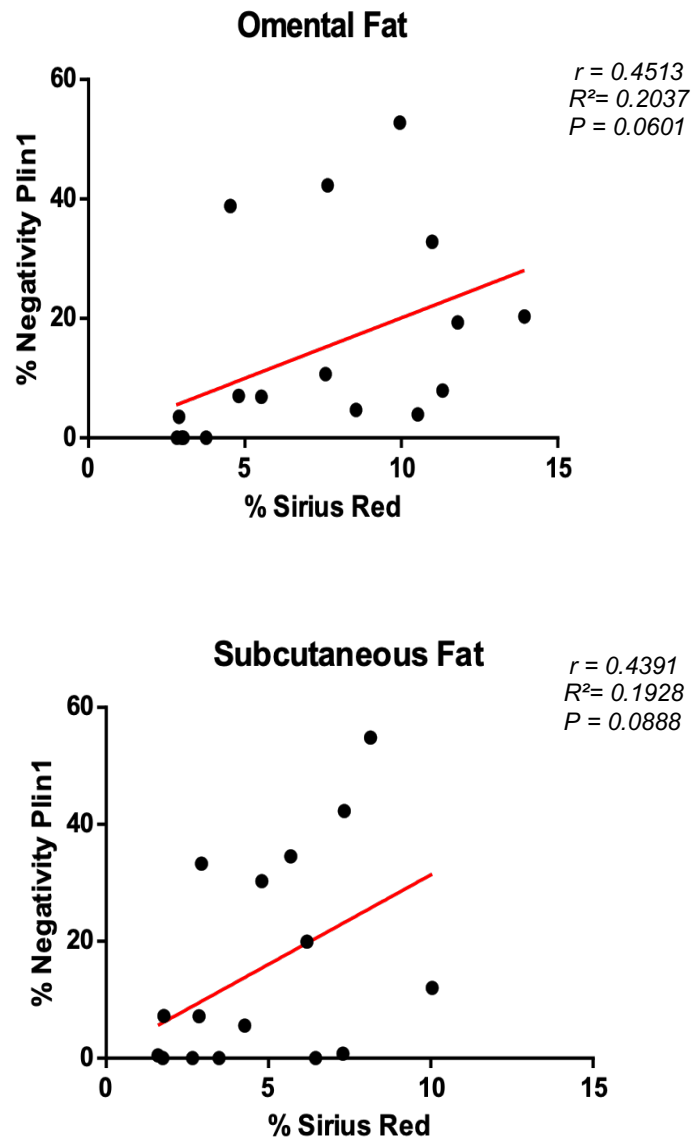


Figura 22: Correlazione positiva tra aree Perilipina-negative e fibrosi nel tessuto adiposo viscerale omentale (in alto) e nel tessuto adiposo sottocutaneo (in basso).

3. ASPETTI ULTRAISTRUTTURALI DELLE CELLULE ADIPOSE AL TEM

Piccoli frammenti di biopsie adipose sono stati processati per l'osservazione ultrastrutturale in microscopia elettronica.

Prima di tutto sezioni semifini di orientamento hanno evidenziato mediante blu di toluidina alcune aree fibrotiche attorno gli adipociti (*Figura 23*), e in seguito le analisi di microscopia elettronica hanno confermato ulteriormente che una moltitudine di fibrille collagene è associata strettamente alla parte esterna delle cellule adipose (*Figura 24*), situazione analoga a quella di adipociti obesi murini, come dimostrato da **Giordano et al., 2013**.

Inoltre, tali cellule mostrano segni di stress e sofferenza cellulare, come l'infiltrazione del lipide nel citoplasma e l'irregolarità della membrana basale (*Figura 25*).

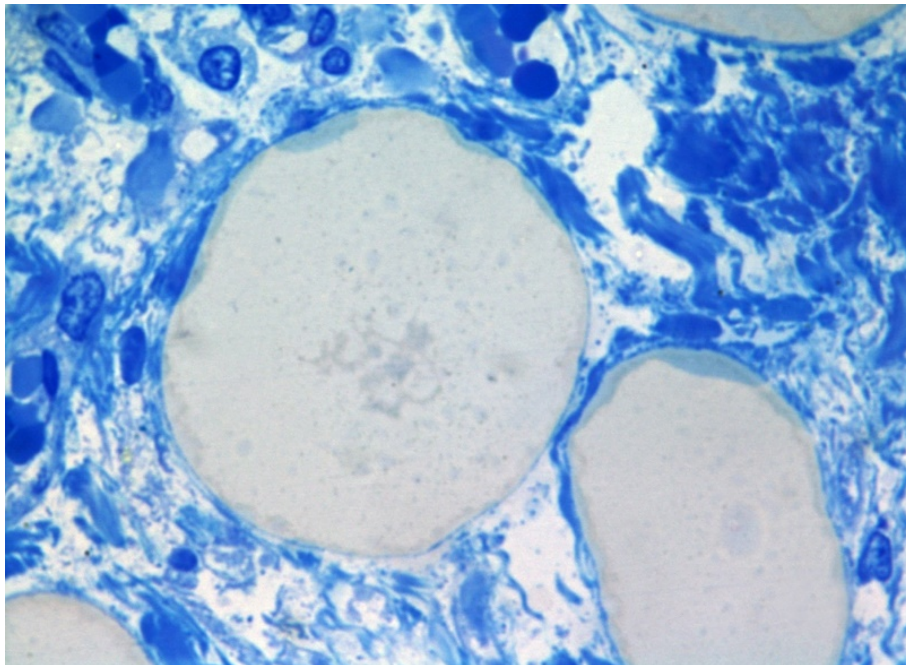


Figura 23: Osservazione al microscopio ottico di una sezione semifine in cui si osserva un'area fibrotica che circonda un adipocita.

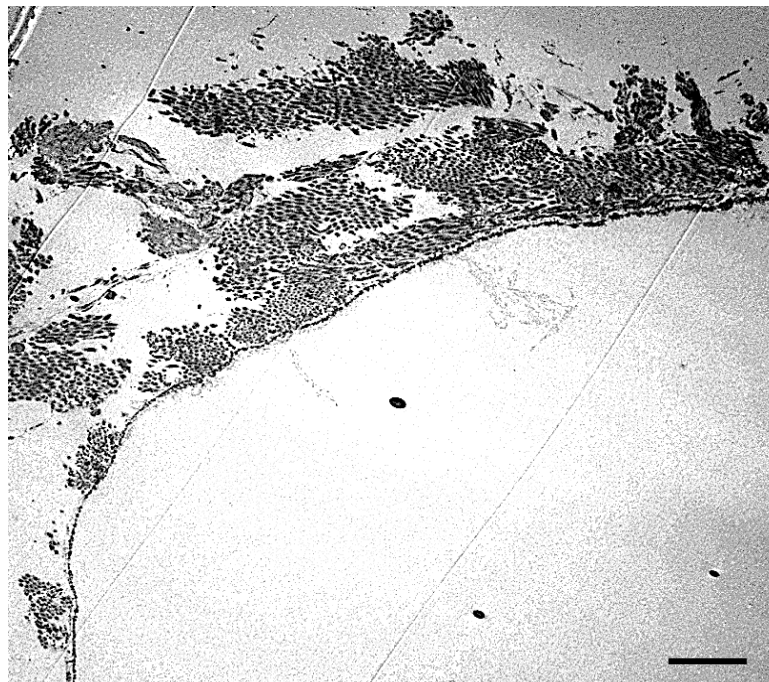


Figura 24: Osservazione al microscopio elettronico di una grande quantità di fibre collagene strettamente associate ad una cellula adiposa.

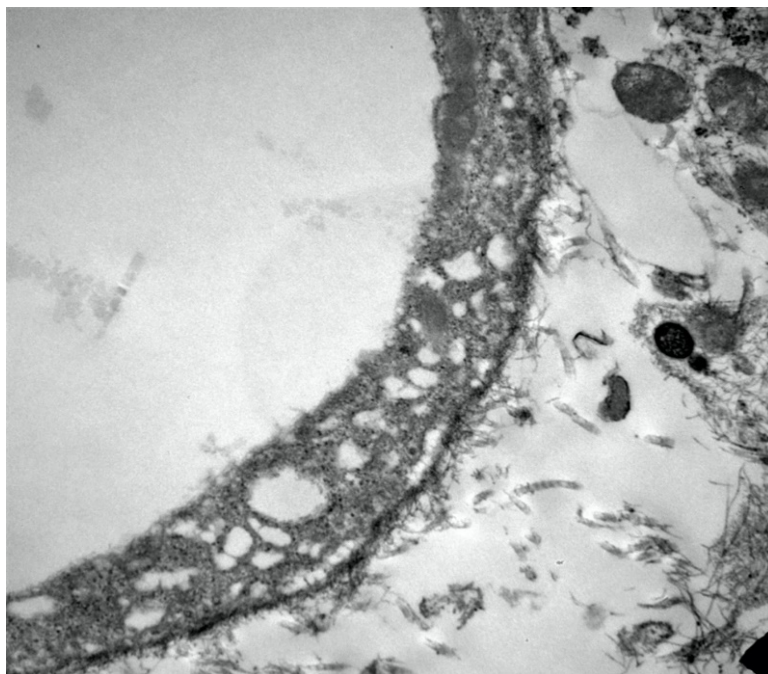


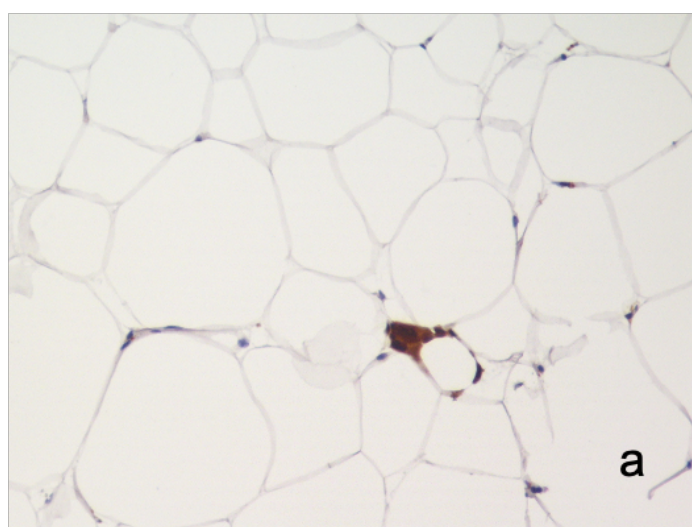
Figura 25: Adipocita ipertrofico con fibrille collagene adese alla membrana basale mostra chiari segni di stress e degenerazione cellulare.

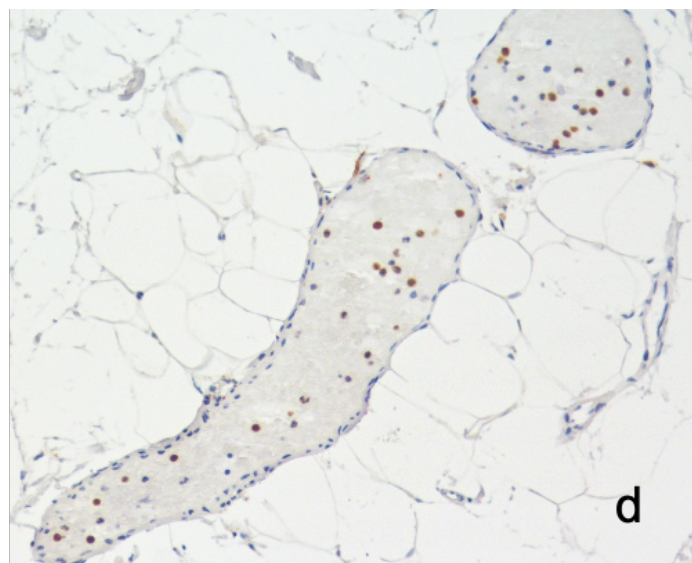
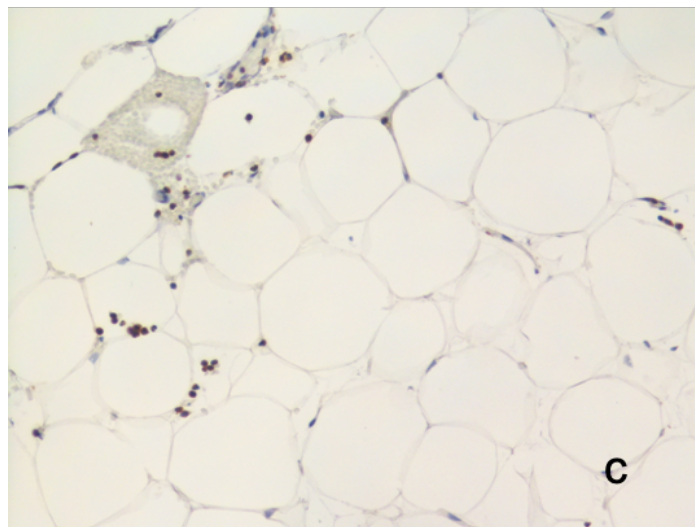
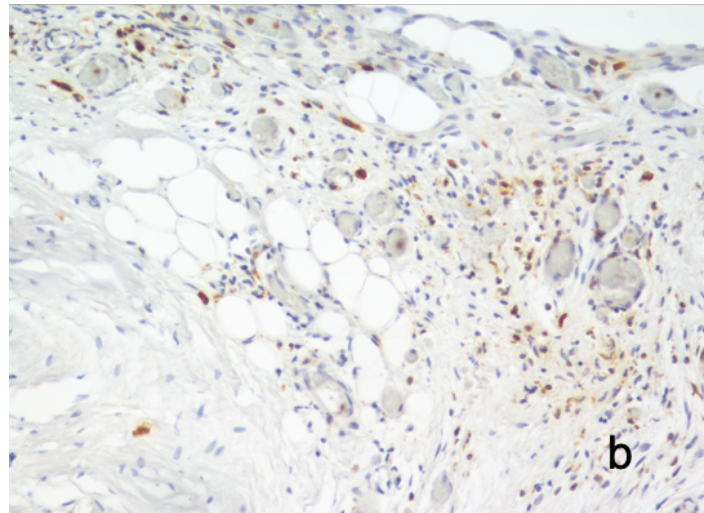
Presi insieme questi dati suggeriscono che gli adipociti bianchi obesi potrebbero andare incontro a un nuovo tipo di morte cellulare che noi definiamo “morte cellulare per soffocamento” dovuta a un’iperproduzione e a un accumulo di fibrille collagene. Pertanto, il collagene fibrillare (probabilmente collagene di tipo I) è stato proposto essere responsabile dell’infiammazione, successiva alla morte.

4. QUADRO INFIAMMATORIO DEI TESSUTI ADIPOSИ OBESI

Per verificare se questa nuova morte è causa dell’infiammazione, o comunque contribuisce all’infiammazione, come avviene nella morte per piroptosi (**Giordano A., et al., 2013**), oppure se c’è un’infiammazione legata alla morte da soffocamento, siamo andati a esaminare la composizione infiammatoria dei tessuti adiposi.

Innanzitutto, abbiamo effettuato una reazione immunoistochimica con l’anticorpo primario CD68, marker generale dei macrofagi, in tutti i campioni dei pazienti obesi in esame. In seguito, per vedere la distribuzione macrofagica nei tessuti adiposi obesi, abbiamo eseguito un’analisi morfometrica in cui abbiamo contato i macrofagi CD68 positivi presenti in cinque distretti tissutali: in particolare i macrofagi che si organizzano in CLS, quelli presenti all’interno di aree fibrotiche, quelli con distribuzione diffusa parenchimale, e infine i macrofagi intravascolari, e perivascolare (*Figura 26*).





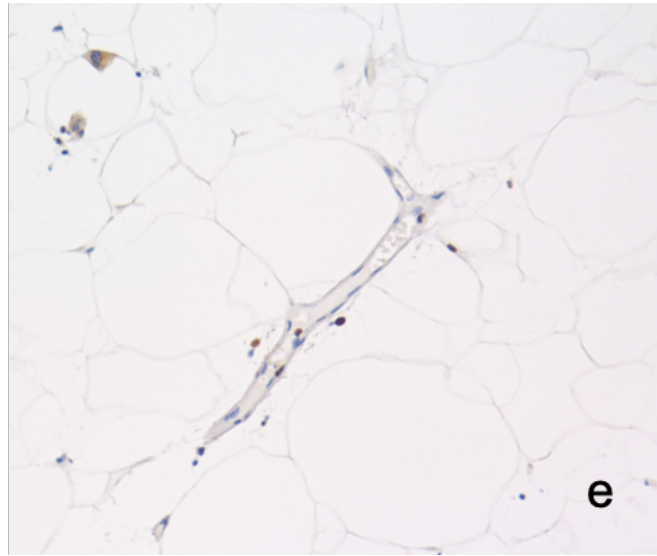


Figura 26: Osservazione microscopica di reazione immunoistochimica in cui si possono osservare macrofagi CD68+ associati a CLS (a), relativi alla fibrosi (b), diffusi nel parenchima (c), presenti all'interno dei vasi (d) e esternamente ai vasi sanguigni (e).

Dalla quantificazione dei macrofagi CD68 positivi dimostriamo che esiste una correlazione positiva significativa tra i macrofagi presenti nel deposito viscerale e quelli presenti nel sottocutaneo, normalizzati a 10000 adipociti (*Figura 27*).

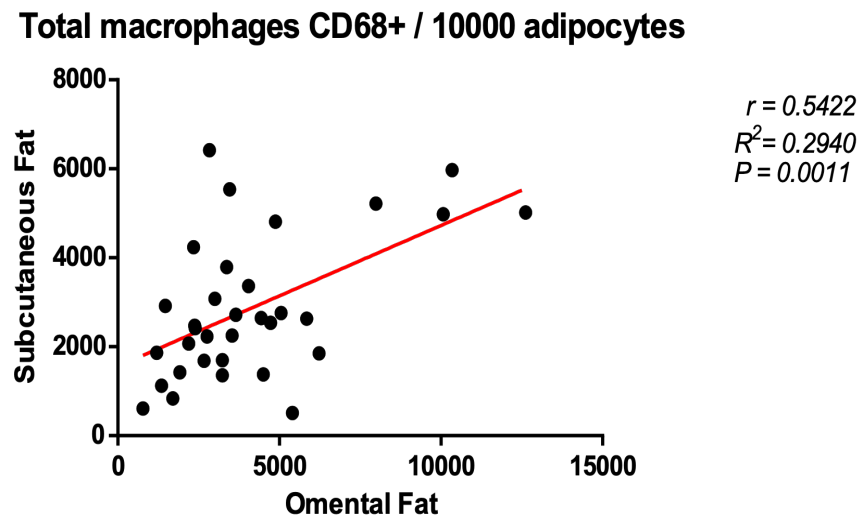


Figura 27: Correlazione positiva tra i macrofagi totali presenti nel grasso viscerale e i macrofagi presenti nel grasso sottocutaneo.

Inoltre, se consideriamo i macrofagi ripartiti nei cinque distretti tissutali considerati, emerge un dato innovativo molto interessante in cui si nota che per entrambi i depositi adiposi la distribuzione infiammatoria è pressoché analoga (*Figura 28*). Più precisamente la maggior parte dei macrofagi risulta essere diffusa nel parenchima adiposo, a differenza dell'obesità murina in cui più del 90% dei macrofagi sono stati rilevati associati in CLS (*Cinti S. et al., J Lipid Res 2005*).

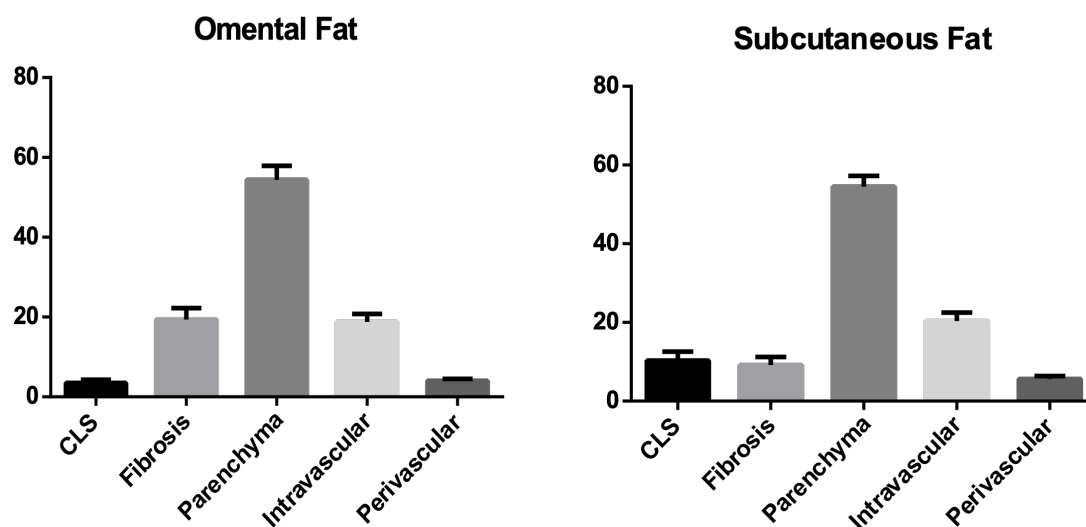


Figura 28: Percentuale di macrofagi CD68 positivi distribuiti nei cinque distretti presi in considerazione nel tessuto adiposo omentale (a sinistra) e nel tessuto adiposo sottocutaneo (a destra).

Per di più da questi risultati emerge che la percentuale dei macrofagi CD68+ relativi alle CLS risulta essere significativamente più elevata nel tessuto adiposo sottocutaneo rispetto al viscerale (*Figura 29*) ed anche che la densità di CLS è maggiore nel sottocutaneo rispetto all'omento (*Figura 30*).

% Macrophages CD68+ related to CLS

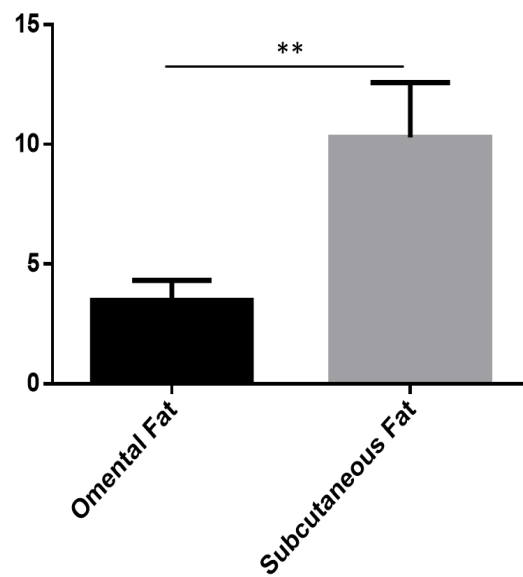


Figura 29: Percentuali dei macrofagi CD68 positivi organizzati in Crown Like Structures nei due depositi adiposi.

n° CLS / 10000 adipocytes

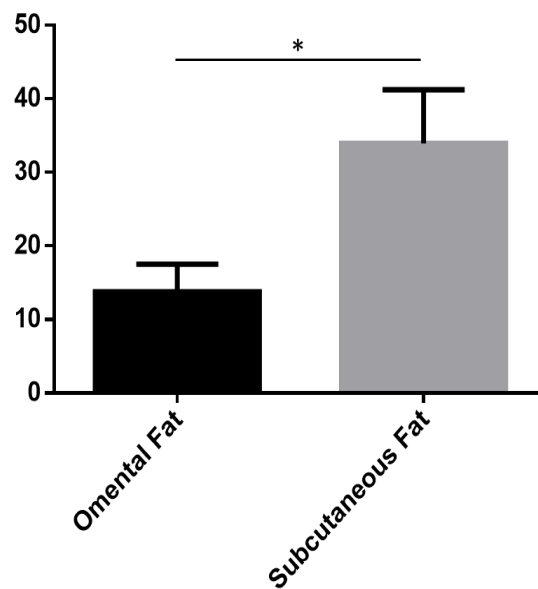


Figura 30: Densità delle Crown Like Structures per 10.000 adipociti nel grasso viscerale e nel grasso sottocutaneo.

DISCUSSIONE

L'obesità e il diabete sono due malattie strettamente collegate tra loro, l'obesità è uno dei fattori di rischio principali per il diabete di tipo 2. Circa l'80% dei pazienti con diabete di tipo 2 sono obesi. Nel 2000, è stato anche coniato il termine "diabesity" (**Chadt et al., 2000**), ad indicare la condizione di obesità e diabete al tempo stesso, condizione patologica con conseguenze cardiovascolari e neoplastiche che rappresentano i principali problemi di salute dell'uomo nonché cause primarie di morte.

I dati epidemiologici riportano che un miliardo di persone, nel mondo, è sovrappeso e 300 milioni sono obese, inoltre, l'epidemia sta anche interessando la popolazione più giovane, infatti, l'obesità infantile è triplicata negli ultimi 30 anni (**Ogden CL., 2010**). Il dato italiano conferma questo trend mondiale: 1 italiano su 10 è obeso e 4 su 10 sono sovrappeso (**World Health Organization, 2010**).

Nel 2003 due importanti lavori di Xu et al. e Wisberg et al., sulla rivista *Journal Clinical Investigation*, dimostrano che: il tessuto adiposo bianco (WAT) di animali e soggetti obesi è infiltrato da macrofagi, la comparsa dell'insulina resistenza (anticamera del diabete di tipo 2) coincide con la comparsa dei macrofagi nel tessuto adiposo, la maggioranza delle citochine implicate nel meccanismo molecolare che causa l'insulina-resistenza sono prodotte dalla componente del tessuto adiposo che contiene i macrofagi ma non dalle cellule adipose mature, suggerendo una stretta relazione tra l' infiltrazione dei macrofagi e l' insorgenza dell'insulino resistenza.

L'insulino resistenza, a lungo andare, porta a diabete mellito di tipo2.

Infatti, l'insulino-resistenza, è una condizione patologica in cui le cellule, nonostante la produzione in quantità fisiologiche di insulina da parte del pancreas, non assorbono il corretto quantitativo di glucosio a causa di un malfunzionamento recettoriale o una loro riduzione di numero. Lo stato di iperglicemia che ne deriva comporta una secrezione sempre maggiore di insulina da parte del pancreas, che

tenta di compensare la mancata funzione dell'ormone. Quando, tuttavia, quest'ultimo non riesce più a sopperire alle esigenze dell'organismo si instaura il diabete mellito di tipo 2 (o diabete "insulino- indipendente"), glicemia a digiuno $\geq$ 126 mg/dl.

La citochina più incriminata come causa di insulino-resistenza è il $\text{TNF}\alpha$. Secondo gli studi principalmente condotti da G. Hotamisligil il meccanismo molecolare coinvolto sarebbe il blocco del segnale insulinico o della produzione dell'insulina, dovuta l'attivazione del fattore intracellulare JNK, determinata dal legame del $\text{TNF}\alpha$ con il suo recettore. (**Hotamisligil G., 2017**)

Nel 2005 il laboratorio di Cinti conferma che i macrofagi nei tessuti adiposi obesi, sia di animali che di uomo, sono molto più numerosi rispetto a quelli presenti nel tessuto adiposo magro. Inoltre, scopre che la maggioranza di essi sono impegnati a riassorbire i residui di cellule adipose morte formando le caratteristiche figure denominate "CLS" (Crown-Like Structures) (**Cinti S. et al., J Lipid Res 2005**). La morte degli adipociti obesi, quindi, potrebbe essere la causa principale dell'infiammazione cronica di basso grado causata dai macrofagi.

Nel **2007 Strissel et al.** dimostrano, su topo, la sequenza degli eventi confermando tre cose importanti: i macrofagi compaiono nel tessuto adiposo di animali sottoposti a dieta obesogena solo quando gli adipociti aumentano di volume; la morte degli adipociti ipertrofici è la causa della formazione delle CLS e quindi dell'infiammazione; l'insulino-resistenza coincide temporalmente con l'infiltrazione del WAT da parte dei macrofagi.

Nel 2008, il nostro laboratorio, dimostra che gli adipociti del sottocutaneo e quelli dei depositi viscerali si comportano in modo diverso: entrambi aumentano di dimensioni nell'obesità, ma gli adipociti del sottocutaneo raggiungono dimensioni maggiori (circa 8 volte il normale) rispetto a quelli viscerali (5-7 volte il normale a seconda del deposito) (**Murano et al., 2008**).

Poiché era dimostrato che l'infiltrazione dei macrofagi correla in modo positivo con la dimensione degli adipociti (**Xu et al., 2003; Weisberg et al., 2003**), ci si doveva aspettare una maggiore infiammazione del sottocutaneo rispetto al viscerale. Tuttavia, la densità delle CLS, espressione quindi dello stato infiammatorio, risultava maggiore nel viscerale rispetto al sottocutaneo suggerendo che la dimensione critica che induce la morte dell'adipocita (CDS: Critical Death Size) è minore nell'adipocita viscerale rispetto a quella dell'adipocita del sottocutaneo.

Tutto ciò potrebbe anche spiegare la ben nota differenza clinica tra l'obesità sottocutanea (periferica, glutei-fianchi, detta "a pera", tipica della donna in pre-menopausa) e l'obesità viscerale (centrale-addominale, detta anche "a mela", tipica dell'uomo e della donna in post-menopausa): la seconda è molto più pericolosa dal punto di vista metabolico, in particolare per l'insorgenza del diabete di tipo 2 (**Björntorp P., 1993**).

Nel 2009 Cinti pubblica un'ipotesi per spiegare il differente comportamento nei confronti del bilancio energetico positivo tra sottocutaneo e viscerale: molti adipociti bianchi viscerali derivano dalla conversione di bruno in bianco (BAT-WAT) e quindi sarebbero meno predisposti alla fisiologica espansione richiesta dal bilancio energetico positivo, rispetto agli adipociti bianchi del sottocutaneo che per lo più nascono come tali (**Cinti S., 2009**).

Tale ipotesi nasce da studi condotti, in vivo ed in vitro, principalmente ad Ancona nel periodo 1985-2008, volti a comprendere l'anatomia e la fisiologia del tessuto adiposo bianco (WAT) e del tessuto adiposo bruno (BAT) ed, in particolare, dai seguenti lavori: **Cigolini M et al., 1985; Cigolini M. et al., 1986; Sbarbati A et al., 1991; Cousin B. et al., 1992; Barbatelli G. et al., 1993; Giordano et al., 1998; Wu et al., 1999; Himms-Hagen et al., 2000; Bacham et al., 2002; Jimenez M. et al., 2003; Hansen et al., 2004; Murano**

I. et al., 2005; Mercader et al., 2006. I dati emersi sono: Il “WAT” e il “BAT” si organizzano a formare un voluminoso organo denominato “Organo Adiposo”, l’organo adiposo è composto da depositi sottocutanei e viscerali ed entrambi contengono sia “WAT” che “BAT”, il “WAT” e il “BAT” hanno proprietà funzionali diverse, quasi opposte: mentre il WAT accumula molecole energetiche (gli acidi grassi) da restituire all’organismo tra un pasto e l’altro, il BAT brucia acidi grassi per produrre calore. Tuttavia, WAT e BAT hanno elevate capacità plastiche che permettono una reciproca diretta conversione in caso di richiesta funzionale: il WAT si converte in BAT per rispondere alle esigenze dell’organismo nelle croniche esposizioni al freddo e il BAT si converte in WAT per rispondere alle esigenze dell’organismo nelle croniche esposizioni a un bilancio energetico positivo.

La presenza di adipociti bruni in aree viscerali nell’uomo adulto viene sostenuta anche da lavori mediante PET (Positron Emission Tomography), che dimostrano una particolare captazione del tracciante (glucosio marcato) in depositi adiposi viscerali di soggetti con feocromocitoma. Questo tipo di tumore benigno è noto per la sua proprietà di secernere alti livelli di catecolamine e quindi di stimolare l’attività del BAT. Rilevante il fatto che dopo l’asportazione del tumore le aree di captazione scomparivano, indicando che l’assenza di stimolo adrenergico provoca un arresto o quantomeno una diminuzione significativa dell’attività metabolica del grasso che occupa tali aree e che tale grasso era verosimilmente BAT.

Nello stesso anno, inoltre, il nostro laboratorio (**Zingaretti MC et al., 2009**) e altri 4 laboratori, di cui uno in USA, due in Europa e uno in Giappone, (**Cypess et al., 2009; van Marken Lichtenbelt et al., 2009; Virtanen et al., 2009; Saito et al., 2009**) pubblicano quasi contemporaneamente dati che confermano in modo inequivocabile la presenza di tessuto adiposo bruno (BAT) metabolicamente attivo nell’uomo adulto e come tale presenza sia prevalentemente legata all’età e allo stato nutrizionale essendo il BAT prevalente nei giovani e nei magri.

A seguire, nel 2010 **Barbatelli et al.** e nel 2012 **Vitali et al.** e **Tran et al.** il nostro laboratorio conferma con dati molto approfonditi e tecniche di genetica molecolare in vivo, quanto pubblicato in diversi lavori negli anni precedenti sulle proprietà plastiche degli adipociti, la loro origine da un unico progenitore ed in particolare la capacità di conversione WAT-BAT.

Per di più, nel 2013 dati del nostro laboratorio dimostrano che adipociti viscerali bianchi umani, in individui con feocromocitoma, possono direttamente convertirsi in adipociti bruni senza alcun coinvolgimento di cellule staminali e senza processi di dedifferenziazione (**Frontini A. et al., 2013**).

Infine, dati sperimentali ottenuti usando un modello di topo geneticamente modificato (ATGL-KO: privo dell'enzima lipolitico ATGL negli adipociti), sostiene in modo robusto l'ipotesi del 2009: in questi esperimenti si dimostra che adipociti bruni privi di ATGL vanno incontro a conversione bianca e muoiono ad un "CDS" più basso rispetto a quello degli adipociti bianchi. A parità di dimensioni, gli adipociti bianchi derivati dalla conversione bianco-bruna muoiono prima di quelli bianchi nati come tali (**Kotzbeck P. et al., 2018**).

Nel 2013 il nostro laboratorio dimostra che la causa di morte dell'adipocita obeso è la "piroptosi". Questa causa di morte cellulare, da poco identificata, può essere indotta da stimoli patogeni interni (ad esempio organuli danneggiati) o esterni (ad esempio microorganismi patogeni) alle cellule (**Giordano et al., 2013**). In seguito allo stimolo patogeno, nelle cellule si attiva il complesso proteico dell'inflammosoma che, in ultima analisi, è in grado di attivare una caspasi specifica (caspasi1), in grado di promuovere l'azione di citochine capaci di distruggere le cellule.

Negli adipociti obesi abbiamo rilevato la presenza di numerosi stimoli patogeni interni dovuti ad alterazioni di organuli di vario tipo.

Inoltre abbiamo identificato cristalli di colesterolo (già noti induttori di inflammosoma) e numerosi segni sia dell'attivazione dell'inflammosoma che della caspasi1.

Di notevole rilevanza il fatto che in modelli sperimentali, in cui l'adipocita diventa artificialmente obeso in animali magri (per assenza della lipasi HSL), non si rilevano i segni di piroptosi e che le alterazioni organulari degli adipociti erano molto più evidenti negli adipociti viscerali. Quest'ultima osservazione offre una spiegazione al basso "CDS" evidenziato nei depositi viscerali ed è in linea con la clinica dell'obesità viscerale di cui sopra.

Dal lavoro condotto nel 2013 da Giordano et al., sopradescritto, inoltre, si evidenzia un aspetto particolare dell'anatomia ultrastrutturale dell'adipocita bianco, visualizzato tramite microscopia a scansione ad alta risoluzione (HRSEM), e mai descritto in precedenza: la presenza di fibrille collagene disposte a canestro sulla superficie esterna di ogni singola cellula. Questo era rilevante in quanto nelle cellule ipertrofiche degli animali obesi, le stesse fibrille esterne apparivano aumentate nel numero. Colorazioni specifiche del collagene confermavano gli aspetti ultrastrutturali.

Sebbene la fibrosi del tessuto adiposo non è una caratteristica del tessuto adiposo degli animali obesi, due laboratori in particolare, quello di Karin Clement a Parigi e quello di Philipp Scherer a Dallas, descrivono la fibrosi come una caratteristica specifica dei tessuti adiposi obesi umani (**Sun K. et al., 2013**). Questi autori, inoltre, descrivono la presenza di cellule adipose morte, infiammazione principalmente sostenuta da macrofagi, ipotizzano una relazione tra fibrosi ed adipociti morti, ma non descrivono una chiara correlazione patogenetica tra questi eventi e l'infiammazione.

Da qui nasce la necessità di approfondire lo studio di tessuti adiposi di soggetti obesi e questo è stato il motivo per cui abbiamo intrapreso questo studio.

I dati originali di questa tesi hanno evidenziato:

- una fibrosi tissutale in entrambi i depositi di circa il 6% del tessuto esaminato. Tale dato amplifica la sua importanza se si considerano anche gli aspetti particolari che si evidenziano sia in microscopia ottica che in elettronica: la presenza di un fitto strato di fibrille collagene che circondano i singoli adipociti;
- una percentuale rilevante di adipociti in due depositi diversi (sottocutaneo e viscerale-omentale) di grasso asportato a pazienti obesi (BMI medio: 43,6) sottoposti a chirurgia bariatrica rivelava una negatività per la perilipina 1 (PLIN1) all'indagine immunoistochimica: 16% nel sottocutaneo e 13% nell'omento. La negatività per la PLIN1 suggerisce la morte dell'adipocita in quanto uno studio sul time-course degli eventi che accadono nel tessuto adiposo di topi geneticamente modificati, in cui la morte degli adipociti viene indotta dalla somministrazione di un farmaco specifico (**Murano et al., 2013**), ha dimostrato che la perdita di PLIN1 segue come primo evento alla somministrazione del farmaco, il numero di adipociti PLIN1 negativo aumenta nel tempo di pari passo con evidenze ultrastrutturali di sofferenza organulare adipocitica e, successivamente, si formano in modo progressivamente crescente le CLS (sicuro segno di morte degli adipociti e relativa reazione infiammatoria macrofagica);
- Una correlazione positiva della percentuale di cellule PLIN1- tra i due depositi esaminati. Questa correlazione ci permette di escludere che siano eventi tissutali casuali;
- La maggiore presenza del marker molecolare dell'ipossia tissutale HIF α 1 nei tessuti adiposi dei soggetti obesi rispetto ai controlli magri;

- La maggiore quantità di fibrosi (area Sirius Red+) in corrispondenza delle aree PLIN1-. Tale dato supporta l'ipotesi che ci sia una relazione tra fibrosi e morte degli adipociti;
- Il rapporto topografico tra cellule PLIN1- e le cellule infiammatorie. Tale dato supporta l'ipotesi che ci sia una relazione tra morte degli adipociti e infiammazione;
- la quantificazione della popolazione macrofagica che in entrambi i depositi è solo in minima parte correlata alle CLS.

CONCLUSIONE

I dati ottenuti da questa tesi e le premesse, soprariportate, permettono di formulare la seguente ipotesi patogenetica che potrebbe avere rilevanti prospettive di interpretazione patogenetica del link obesità-diabete tipo2:

L'adipocita obeso sia nel sottocutaneo che nel viscerale-omento aumenta la produzione delle fibrille collagene che si dispongono a canestro attorno all'adipocita stesso. Quest'attività cellulare potrebbe essere in relazione al tentativo della cellula stessa di resistere ad una eccessiva dilatazione (con danno organulare e conseguente morte per piroptosi). L'accumulo di collagene attorno alla cellula produrrebbe ipossia e quindi morte per soffocamento della cellula adiposa con conseguente perdita di PLIN1 e accumulo di materiale necrotico in seno a fibrille collagene. Tale materiale richiamerebbe le cellule infiammatorie (prevalentemente macrofagi) nel tentativo di ripulire il tessuto. La massiva infiammazione produrrebbe insulino-resistenza per i noti meccanismi molecolari (*Hotamisligil G., 2017*) recentemente rinforzati da nuove scoperte (*Ying et al Cell 2017*) e ciò potrebbe spiegare il link tra obesità e diabete tipo2.

BIBLIOGRAFIA

Bachman E., Dhillon H., Zhang C., Cinti S., Bianco A. C., Kobilka B. K., Lowell B. B., *β AR Signaling Required for Diet-Induced Thermogenesis and Obesity Resistance*, Science 297(5582):843-5. doi: 10.1126/science.1073160, 2002

Barbatelli G., Morroni M., Vinesi P., Cinti S., Michetti F., *S-100 Protein in Rat Brown Adipose Tissue Under Different Functional Conditions: A Morphological, Immunocytochemical, and Immunochemical Study*, Exp Cell Res 208(1):226-31. doi: 10.1006/excr.1993.1241, 1993

Barbatelli G., Murano I., Madsen L., Hao Q., Jimenez M., Kristiansen K., Giacobino J. P., De Matteis R., Cinti S., *The emergence of cold- induced brown adipocytes in mouse white fat depots is determined predominantly by white to brown adipocyte transdifferentiation*, Am J Physiol EM 298(6): E1244-53. doi:10.1152/apendo.00600.2009, 2010

Bergh A., Pischon T., Reinhold T., Apovian C. M., Sharma A. M., Willich S. N., *Obesity Prevalence From a European Perspective: A Systematic Review*, BMC Public Health 8:200. doi: 10.1186/1471-2458-8-200, 2008

Björntorp P., *Visceral obesity: a "civilization syndrome"*, Obes Res 1:206-22, 1993

Bray G. A., *Medical consequences of obesity*, J. Clin. Endocrinol. Metab 89(6):2583-9 doi: 10.1210/c.2004 -0535, 2004

Chadt A. et al., *Molecular links between obesity and diabetes: "Diabesity."*, In: Endotext (internet), South Dartmouth (MA), 2000

Cigolini M., Cinti S., Brunetti L., Bosello O., Osculati F., Björntorp F., *Human Brown Adipose Cells in Culture*, Exp Cell Res 159(1):261-6. doi: 10.1016/s0014-4827(85)80056-2, 1985.

Cigolini M., Cinti S., Bosello O., Brunetti L., Björntorp P., *Isolation and Ultrastructural Features of Brown Adipocytes in Culture*, J Anat 145:207- 16, 1986

Cinti S., *Adipose Organ Development and Remodeling*, Compr Physiol, 8(4):1357-1431, doi: 10.1002/cphy.c170042, 2018

Cinti S., Frederich R. C., Zingaretti M. C., De Matteis R., Flier J. S., Lowell B. B., *Immunohistochemical Localization of Leptin and Uncoupling Protein in White and Brown Adipose Tissue*, Endocrinology 138(2):797-804, doi: 10.1210/endo.138.2.4908, 1997

Cinti S., Mitchell G., Barbatelli G., Murano I., Ceresi E., Faloia E., Wang S., Fortier M., Greenberg A. S., Obin M. S., *Adipocyte death defines macrophage localization and function in adipose tissue of obese mice and humans*, J Lipid Res 46:2347-2355, 2005

Cinti S., *Obesity, Type 2 Diabetes and the Adipose Organ*, Cham, Switzerland: Springer, 2018

Cinti S., *The Adipose Organ*, Milano, Kurtis, 1999

Cinti S., *The Adipose Organ*, Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids, 73(1):9-15, doi: 10.1016/j.plefa.2005.04.010, 2005

Cinti S., *The Adipose Organ: Morphological Perspectives of Adipose Tissues*, Proc Nutr Soc 60(3):319-28, doi: 10.1079/pns200192, 2001

Cinti S., *Transdifferentiation Properties of Adipocytes in the Adipose Organ*, Am J Physiol Endocrinol Metab, 297: E977-E986, 2009

Cinti S., *UCP1 protein: The molecular hub of adipose organ plasticity*, Biochimie, 134:71-76, 2017

Cousin B., Cinti S., Morroni M., Raimbault S., Ricquier D., Pénicaud L., Casteilla L., *Occurrence of Brown Adipocytes in Rat White Adipose Tissue: Molecular and Morphological Characterization*, J Cell Sci 103 (Pt 4):931-42, 1992

Cypess A. M., Lehman S., Williams G., Tal I., Rodman D., Goldfine A. B., Kuo F. C., Palmer E. L., Tseng H., Doria A., Kolodny G. M., Kahn C. R., *Identification and Importance of Brown Adipose Tissue in Adult Humans*, N Engl J Med 360(15):1509-17. doi: 10.1056/NEJMoa0810780, 2009

Dattilo A. M., Kris-Etherton P. M., *Effects of Weight Reduction on Blood Lipids and Lipoproteins: A Meta-Analysis*, Am J Clin Nutr 56(2):320-8, doi: 10.1093/acn/56.2.320, 1992

Divoux A., Clement K., *Architecture and the extracellular matrix: the still unappreciated components of the adipose tissue*, Obes Res 12(5):e494-503, doi: 10.1111/.1467-789X.2010.00811.x., 2011

Divoux A., Tordman J., Lacasa D., Veyrie N., Hugol D., Aissat A., Basdevant A., Guerre-Millo M., Poitou C., Zucker J., Bedossa P., Clément K., *Fibrosis in Human Adipose Tissue: Composition, Distribution, and Link With Lipid Metabolism and Fat Mass Loss*, Diabetes 59(11):2817-25. doi: 10.2337/db10-0585, 2010

Efremova A., Senzacqua M., Venema W., Isakov E., Di Vincenzo A., Zingaretti MC, Protasoni M., Thomsen M., Giordano A., Cinti S., *A Large Proportion of Mediastinal and Perirenal Visceral Fat of Siberian Adult People Is Formed by UCP1 Immunoreactive Multilocular and Paucilocular Adipocytes*, J Physiol Biochem doi: 10.1007/s13105-019-00721-4, 2019

Foulis A. K., McGill M., Farquharson M. A., *Insulinitis in Type 1 (Insulin-Dependent) Diabetes Mellitus in Man--Macrophages, Lymphocytes, and Interferon-Gamma Containing Cells*, J Pathol 165(2):97-103. doi: 10.1002/path.1711650203, 1991

Frontini A., Vitali A., Perugini J., Murano I., Romiti C., Ricquier D., Guerrieri M., Cinti S., *White-to-brown transdifferentiation of omental adipocytes in patients affected by pheochromocytoma*, Biochim Biophys Acta 1831: 950-959, 2013

Gardner D. G., Shoback D., *Greenspan's basic & clinical endocrinology*, Chapter 179th, New ork, McGraw-Hill Medical, 2011

Giordano A., Morroni M., Carle F., Gesuita R., Marchesi G. F., Cinti S., *Sensory Nerves Affect the Recruitment and Differentiation of Rat Periovarian Brown Adipocytes During Cold Acclimation*, J Cell Sci 111 (Pt 17):2587-94, 1998

Giordano A., Murano I., Mondini E., Perugini J., Smorlesi A., Severi I., Barazzoni R., Sherer P. E., Cinti S., *Obese Adipocytes Show Ultrastructural Features of Stressed Cells and Die of Pyroptosis*, J Lipid Res 54(9):2423-36. doi: 10.1194/lr.M038638, 2013

Giordano A., Perugini J., Kristensen D.M., Santini L., Frontini A., Kamura S., Kristiansen K., Cinti S., *Mammary alveolar epithelial cells convert to brown adipocytes in post-lactating mice*, J Cell Physiol 232(11): 2923-2928. doi:10.1002/cp.25858, 2017

Groop L., *Pathogenesis of Type 2 Diabetes: The Relative Contribution of Insulin Resistance and Impaired Insulin Secretion*, Int J Clin Pract Suppl (113):3-13, 2000

Hansen J. B., J rgensen C., Petersenn R. K., Hallenborg P., De Matteis R., B ye H. A., Petrovic N., Enerb ck S., Nedergaard J., Cinti S., te Riele H., Kristiansen K., *Retinoblastoma Protein Functions as a Molecular Switch Determining White Versus Brown Adipocyte Differentiation*, Proc Natl Acad Sci U S A 101(12):4112-7. doi: 10.1073/pnas.0301964101, 2004

Harrison T. R., Harrison - Manuale di medicina interna, a cura di Massimo Vanoli, 18ª ed., C.E.A. Casa Editrice Ambrosiana, 2014

Haslam D. W., James W. P., *Obesity*, Lancet 366(9492):1197-209. doi: 10.1016/S0140-6736(05)67483-1, 2005

Himms-Hagen J., Melnyk A., Zingaretti M. C., Ceresi E., Barbatelli G., Cinti S., *Multilocular Fat Cells in WAT of CL-316243-treated Rats Derive Directly From White Adipocytes*, Am J Physiol Cell Physiol, 279(3):C670- 81. doi: 10.1152/apcell.2000.279.3.C670, 2000

Hotamisligil G., *Inflammation, Metaflammation and Immunometabolic Disorders*, Nature, 542(7640):177-185. doi: 10.1038/nature21363, 2017

Hurst J. W., *Il cuore*, a cura di A. Zanchetti, 12^a ed., Milano, McGraw- Hill, 2009

Jimenez M., Barbatelli G., Allevi R., Cinti S., Seydoux J., Giacobino J. P., Muzzin P., Preitner F., *Beta 3-adrenoceptor Knockout in C57BL/6J Mice Depresses the Occurrence of Brown Adipocytes in White Fat*, Eur J Biochem 270(4):699-705. doi:10.1046/.1432 -1033.2003.03422.x., 2003

Kaaks R., Toniolo P., Akhmedkhanov A., Lukanova A., Biessy C., Dechaud H., Rinaldi S., Zeleniuch-Jacquotte A., Shore R. E., Riboli E., *Serum C-peptide, Insulin-Like Growth Factor (IGF)-I, IGF-binding Proteins, and Colorectal Cancer Risk in Women*, J Natl Cancer Inst 92(19):1592-600. doi: 10.1093/nci/92.19.1592, 2000

Khan T., Muise E. S., Iyengar P., Wang Z. V., Chandalia M., Abate N., Zhang B. B., Bonaldo P., Chua S., Scherer P. E., *Metabolic dysregulation and adipose tissue fibrosis: role of collagen VI*, Mol Cell Biol 29:1575 1591, 2009

Kotzbeck P., Giordano A., Mondini E., Murano I., Severi I., Venema W., Cecchini M. P., Kershaw E. E., Barbatelli G., Haemmerle G., Zechner R., Cinti S., *Brown Adipose Tissue Whitening Leads to Brown Adipocyte Death and Adipose Tissue Inflammation*, J Lipid Res, 59(5):784-794. doi: 10.1194/lr.M079665, 2018

Kui I., Imabayashi E., Minagawa A., Matsuda H., Miyauchi T., *Brown Adipose Tissue Demonstrating Intense FDG Uptake in a Patient With Mediastinal Pheochromocytoma*, Ann Nucl Med 22(3):231-5. doi: 10.1007/s12149-007-0096-x, 2008

Lichtenbelt W.D van Marken., Vanhommerig J. W., Smulders N. M., Drossaerts J. M. A. F. L., Kemerink G. J., Bouvy N. D., Schrauwen P., Teule G. J. J., *Cold-activated Brown Adipose Tissue in Healthy Men*, N Engl J Med 360(15):1500-8. doi: 10.1056/NEJMoa0808718, 2009

Maffei M., Halaas J., Ravussin E., Pratley R. E., Lee G. H., Zhang ., Fei H., Kim S., Lallone R., Ranganathan S., et al., *Leptin Levels in Human and Rodent: Measurement of Plasma Leptin and Ob RNA in Obese and Weight-Reduced Subjects*, Nat Med 1(11):1155-61. doi: 10.1038/nm1195-1155, 1995

Mahdi T. et al., *Secreted Frizzled-Related Protein 4 Reduces Insulin Secretion and Is Overexpressed in Type 2 Diabetes*, Cell Metabolism 16(5):625 633, 2012

Matteis R, Dashtipour K., Ognibene A., Cinti S., *Localization of Leptin Receptor Splice Variants in Mouse Peripheral Tissues by Immunohistochemistry*, Proc Nutr Soc 57(3):441-8, doi: 10.1079/pns19980063, 1998

McDevitt H. O., Unanue E. R., *Autoimmune Diabetes Mellitus--Much Progress, but Many Challenges*, Adv Immunol 100:1-12, doi: 10.1016/S0065-2776(08)00801-8, 2008

Mercader J., Ribot J., Murano I., Felipe F., Cinti S., Bonet M. L., Palou A., *Remodeling of White Adipose Tissue After Retinoic Acid Administration in Mice*, Endocrinology 147(11):5325-32. doi: 10.1210/en.2006-0760, 2006

Morrone M., Giordano A., Zingaretti M. C., Boiani R., De Matteis R., Kahn B. B., Nisoli E., Tonello C., Pisoschi C., Luchetti M. M., Marelli M., Cinti S., *Reversible transdifferentiation of secretory epithelial cells into adipocytes in the mammary gland*, Proc Natl Acad Sci U S A, 101:16801-16806, 2004

Murano I., Barbatelli G., Parisani V., Latini C., Muzzonigro G., Castellucci M., Cinti S., *Dead Adipocytes, Detected as Crown-Like Structures, Are Prevalent in Visceral Fat Depots of Genetically Obese Mice*, J Lipid Res 49(7):1562-1568, 2008

Murano I., Morroni M., Zingaretti M. C., Oliver P., S nchez J., Fuster A., Pic C., Palou A., Cinti S., *Morphology of Ferret Subcutaneous Adipose Tissue After 6-month Daily Supplementation With Oral Beta-Carotene*, Biochim Biophys Acta 1740(2):305-12. doi: 10.1016/bbadis.2004.10.012, 2005

Murano I., Rutkowski J. M., Wang A. Q., Cho . R., Scherer P. E., Cinti S., *Time Course of Histomorphological Changes in Adipose Tissue Upon Acute Lipoatrophy*, Nutr Metab Cardiovasc Dis 23(8):723-31, doi: 10.1016/numecd.2012.03.005, 2013

Ogden C. L., *Prevalence of high body mass Index in children and adolescents 2007-2008*, Jama 303:242-49, 2010

Ohlson L.O., Larsson B., Svardsudd K., Welin L., Eriksson H., Wilhelmsen L., B rntorp P., Tibblin G., *The Influence of Body Fat Distribution on the Incidence of Diabetes Mellitus. 13.5 Years of Follow-Up of the Participants in the Study of Men Born in 1913*, Diabetes 34(10):1055-8, doi: 10.2337/diab.34.10.1055, 1985

Rotella C. M., Mannucci E., Cresci B., *Il diabete mellito. Criteri diagnostici e terapia: un aggiornamento*, pag. 29, Firenze, SEE, 1999

Saito M., Okamatsu-Ogura ., Matsushita M., Watanabe K., oneshiro T., Nio-Kobayashi J., Iwanaga T., Miyagawa M., Kameya T., Nakada K., Kawai ., Tsuisaki M., *High Incidence of Metabolically Active Brown Adipose Tissue in Healthy Adult Humans*, Diabetes 58(7):1526 1531, 2009

Sbarbati A., Morroni M., Zancanaro C., Cinti S., *Rat Interscapular Brown Adipose Tissue at Different Ages: A Morphometric Study*, Int J Obes 15(9):581-7, 1991

Smorlesi A., Frontini A., Giordano A., Cinti S., *The Adipose Organ: White-Brown Adipocyte Plasticity and Metabolic Inflammation*, *Obes Rev* 13:83-96, 2012

Strissel K. J., Stancheva Z., Miyoshi H., Perfield J. W., DeFuria J., Jick Z., Greenberg A. S., Obin M. S., *Adipocyte Death, Adipose Tissue Remodeling, and Obesity Complications*, *Diabetes* 56(12):2910-8. doi: 10.2337/db07-0767, 2007

Sun K., Tordman J., Clément K., Scherer E.P., *Fibrosis and Adipose Tissue Dysfunction*, *Cell Metab* 18(4):470-477, doi: 10.1016/j.cmet.2013.06.016, 2013

Tran K. V., Gealekman O., Frontini A., Zingaretti M. C., Morroni M., Giordano A., Smorlesi A., Perugini J., De Matteis R., Sbarbati A., Corvera S., Cinti S., *The vascular endothelium of the adipose tissue give rise to both white and brown fat cells*, *Cell Metab* 15(2): 222-229. doi: 10.1016/j.cmet.2012.01.008, 2012

Virtanen K. A., Lidell M. E., Orava J., Heglind M., Westergren R., Niemi T., Taittonen M., Laine J., Savisto N. J., Enerbäck S., Nuutila P., *Functional Brown Adipose Tissue in Healthy Adults*, *N Engl J Med* 360(15):1518-25. doi: 10.1056/NEJMoa0808949, 2009

Vitali A., Murano I., Zingaretti M. C., Frontini A., Ricquier D., Cinti S., *The Adipose Organ of Obesity-Prone C57BL/6J Mice Is Composed of Mixed White and Brown Adipocytes*, *J Lipid Res* 53:619-29, 2012

Weisberg S. P., McCann D., Desai M., Rosenbaum M., Leibel R. L., Ferrante A. W. Jr., *Obesity is associated with macrophage accumulation in adipose tissue*, *J Clin Invest* 112:1796-1808, 2003

World Health Organization (WHO), technical report series 894: *Obesity: Preventing and managing the global epidemic*, report of a WHO consultation, Geneva, World Health Organization, 2000

World Health Organization (WHO), *Who Fact Files: Ten facts on obesity*, WHO, 2010

Wu Z., Puigserver P., Andersson U., Zhang C., Adelmant G., Mootha V., Troy A., Cinti S., Lowell B., Scarpulla R. C., Spiegelman B. M., *Mechanisms Controlling Mitochondrial Biogenesis and Respiration Through the Thermogenic Coactivator PGC-1*, *Cell* 98(1):115-24. doi: 10.1016/S0092-8674(00)80611-X, 1999

Xu H., Barnes G. T., ang Q., Tan G., ang D., Chou C. J., Sole J., Nichols A., Ross J. S., Tartaglia L. A., Chen H., *Chronic inflammation in fat plays a crucial role in the development of obesity-related insulin resistance*, *J Clin Invest* 112: 1821-1830, 2003

ing W., Riopel M., Bandyopadhyay G., Dong ., Birmingham A., Seo J. B., Ofrecio J. M., Wollam J., Hernandez-Carretero A., Fu W., Li P., Olefsky J. M., *Adipose Tissue Macrophage-Derived Exosomal miRNAs Can Modulate In Vivo and In Vitro Insulin Sensitivity*, *Cell* 171(2):372-384.e12. doi: 10.1016/.cell.2017.08.035, 2017

Zhang ., Proenca R., Maffei M., Barone M., Leopold L., J M Friedman J. M., *Positional Cloning of the Mouse Obese Gene and Its Human Homologue*, *Nature* 372(6505):425-32. doi: 10.1038/372425a0, 1994

Zingaretti M. C., Crosta F., Vitali A., Guerrieri M., Frontini A., Cannon B., Nedergaard J., Cinti S., *The Presence of UCP1 Demonstrates That Metabolically Active Adipose Tissue in the Neck of Adult Humans Truly Represents Brown Adipose Tissue*, *FASEB J* 23(9):3113-20, 2009

