

UNIVERSITA' DEGLI STUDI DI VERONA

*DIPARTIMENTO DI MEDICINA*

*SCUOLA DI DOTTORATO IN SCIENZE DELLE VITA E DELLA SALUTE*

*DOTTORATO DI RICERCA IN SCIENZE BIOMEDICHE CLINICHE E  
SPERIMENTALI*

XXXV ciclo / 2019

STUDIO DEL CROSS-TALK TRA IL TESSUTO ADIPOSO ED IL  
TESSUTO MUSCOLARE IN UN MODELLO *IN VITRO*

S.S.D. MED/09

Coordinatore: Ch.mo Prof. GIOVANNI TARGHER

Tutor: Ch.mo Prof. MAURO ZAMBONI

Ch.ma Prof.ssa ELENA ZOICO

Dottorando: Dott.ssa NICOLE NORI

Quest'opera è stata rilasciata con licenza Creative Commons Attribuzione – non commerciale  
Non opere derivate 3.0 Italia. Per leggere una copia della licenza visita il sito web:



<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/3.0/it/>



**Attribuzione** Devi riconoscere una menzione di paternità adeguata, fornire un link alla licenza e indicare se sono state effettuate delle modifiche. Puoi fare ciò in qualsiasi maniera ragionevole possibile, ma non con modalità tali da suggerire che il licenziante avalli te o il tuo utilizzo del materiale.



**Non Commerciale** Non puoi usare il materiale per scopi commerciali.



**Non opere derivate** —Se remixi, trasformi il materiale o ti basi su di esso, non puoi distribuire il materiale così modificato.

Studio del cross-talk tra il tessuto adiposo ed il tessuto muscolare in un modello *in vitro* – Nicole Nori

Tesi di Dottorato

Verona, 07 Dicembre 2022

ISBN

## INDICE

<b>INDICE</b> .....	3
<b>SOMMARIO</b> .....	5
<b>ABSTRACT</b> .....	7
<b>INTRODUZIONE</b> .....	8
<b>I. INVECCHIAMENTO DEL TESSUTO ADIPOSO</b> .....	8
1. Anatomia del tessuto adiposo.....	9
2. Caratteristiche del tessuto adiposo nell'invecchiamento .....	13
<b>II. TESSUTO MUSCOLARE: MODIFICAZIONI LEGATE ALL'INVECCHIAMENTO E SARCOPENIA</b> .....	25
1. Anatomia del tessuto muscolare e modificazioni con l'invecchiamento .....	25
2. Sarcopenia .....	28
<b>III. LE VESCICOLE EXTRACELLULARI</b> .....	34
1. Definizione, struttura, contenuto, ruoli .....	34
2. Classificazione, estrazione e caratterizzazione .....	35
<b>IV. IL CROSS-TALK TRA IL TESSUTO ADIPOSO LE MUSCOLARE</b> .....	36
1. Il ruolo delle adipochine nel cross-talk .....	37
2. Il ruolo delle miocchine nel cross-talk.....	38
3. Il ruolo delle adipo-miocchine e micro-rna nel cross-talk .....	40
4. Le extravescicole ed il tessuto adiposo .....	41
<b>SCOPO DELLO STUDIO</b> .....	42
<b>MATERIALI E METODI</b> .....	43
<b>I. Colture cellulari di adipociti: cellule 3T3L1</b> .....	43
<b>II. Medium condizionato per il trattamento di miociti</b> .....	43
<b>III. Colture cellulari di miociti: cellule C2C12</b> .....	45
<b>IV. Trattamento dei miociti</b> .....	46
<b>V. Valutazione morfologica dei miociti e determinazione del diametro e dell'indice di fusione</b> .....	47
<b>VI. Estrazione di RNA, retrotrascrizione ed espressione genica (RT PCR, Real-Time PCR)</b> .....	47
<b>VII. Analisi delle proteine mediante Western Blot</b> .....	48
<b>VIII. Analisi della sintesi proteica mediante puromicina con il metodo SUnSET</b> 50	
<b>IX. Separazione delle extravescicole</b> .....	51
<b>X. Conteggio e caratterizzazione delle extravescicole</b> .....	52
<b>XI. Visualizzazione delle EV TEM</b> .....	53
<b>XII. Analisi statistica</b> .....	54
<b>RISULTATI</b> .....	54

<b>I. Modificazioni morfologiche di miociti C2C12 trattati con medium condizionato di adipociti 3T3L1.....</b>	<b>54</b>
<b>II. Valutazione delle modificazioni dell'espressione genica in miociti C2C12 trattati con medium condizionato di adipociti 3T3L1.....</b>	<b>55</b>
<b>III. Analisi mediante WB della miostatina in miociti C2C12 trattati con MC di adipociti 3T3L1. ....</b>	<b>56</b>
<b>IV. Analisi della sintesi proteica nei miociti C2C12 trattati con MC di adipociti 3T3L1. ....</b>	<b>57</b>
<b>V. Caratterizzazione delle extravescicole. ....</b>	<b>57</b>
<b><i>DISCUSSIONE</i> .....</b>	<b>57</b>
<b><i>CONCLUSIONI</i> .....</b>	<b>64</b>
<b><i>FIGURE</i> .....</b>	<b>65</b>
<b><i>BIBLIOGRAFIA</i>.....</b>	<b>70</b>

## ABBREVIAZIONI

TA: Tessuto Adiposo; EV: Extra-Vescicole; TRPS: Tecnica Rilevamento di imPulsi resistivi Sintonizzabili; MyHC-IIb: Myosin Heavy Chain II b; MyoD: Myoblast Determination protein 1; COL1A1: COLlagen 1 A 1; SAT: Subcutaneous Adipose Tissue; VAT: Visceral Adipose Tissue; APC: Adipose Progenitor Cells; TNF- $\alpha$ : Tumor Necrosis Factor-  $\alpha$ , IL-6: Inter-Leukin 6; micro-RNA: miRNA; FM: fat mass; FFM: free fat mass; UCP-1: Uncoupling Protein-1; BMI: Body Mass Index; Insulin Grow Factor 1: IGF-1; AMP; CCAAT/enhancer binding protein  $\alpha$ : C/EBP $\alpha$ ; peroxisome proliferator-activated receptor  $\gamma$ : PPAR $\gamma$ ; CHOP: C/EBP Homologous Protein; ERK5: Extracellular signal-Regulated Kinase 5; miRNA: micro RiboNucleic Acid; RNA: RiboNucleic Acid; ROS: Reactive Oxygen Apecies; PAI-1: Plasminogen Activator Inhibitor-1; MCP-1: Monocyte Chemoattractant Protein-1; NF-kB: Nuclear Factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells; SMAD2/3: MotherS Against Decapentaplegic homolog 2; SASP: Senescence Associated Secretary phenotype; SA- $\beta$ -gal: Senescence-Associated beta-galactosidase; MuRF-1: Muscle-specific RING Finger protein; PID: Post Induction Day; FoxO: Forkhead box-O; PGC-1: Peroxisome prolifetor-activated receptor Gamma Coactivator 1  $\alpha$ ; SMAD: Small Mother Against Decapentaplegic; PI3K: Phosphatidyl-Inositol 3-Kinase; Akt: Protein kinase B; mTOR: mechanistic Target Of Rapamycin; PKB: Protein Kinase B; CTGF/CCN-2: Connective Tissue Growth Factor/ Cellular Communication Network Factor 2; TGF- $\beta$ : Transforming Growth Factor-B; SIRT: SIRTuins; JAK: JAnus Kinase; STAT: Signal Transducer and Activator of Transcription; DNA: Deoxyribonucleic Acid; FFA: Free Fatty Acids; DMEN: Dulbecco Modified Eagle; FBS: Fetal Bovine Serum; MC: Medium Condizionato; AMM: Adipocyte Mantaining Medium; SUnSET: SUrface SENSing of Translation; PBS: phosphate buffer solphate.

## SOMMARIO

Un numero crescente di evidenze ha mostrato l'effetto negativo del tessuto adiposo (TA) bianco sulla funzione e sulla qualità del muscolo scheletrico. Tuttavia, si sa poco sugli effetti degli adipociti senescenti e disfunzionali sulle cellule muscolari. Recentemente si è visto che le cellule dei tessuti, incluso il TA e quello muscolare, possono comunicare tra loro attraverso le extra-vescicole (EV) derivate dai lipidi e modulare il fenotipo e l'omeostasi delle cellule attraverso un percorso indipendente dalle citochine. Si è visto, per esempio, che le EV rilasciate dagli adipociti possono regolare la sensibilità all'insulina anche nel muscolo portando ad indurre insulino-resistenza durante l'obesità.

Per esplorare i meccanismi coinvolti nella perdita di massa e funzione muscolare legata all'età, abbiamo realizzato un modello *in vitro* utilizzando un terreno di coltura condizionato ottenuto da colture di adipociti murini 3T3-L1 maturi, invecchiati, insulino-resistenti ed esposti a stress ossidativo per trattare miociti C2C12. Dal medium condizionato di adipociti maturi ed insulino-resistenti sono state inoltre estratte e caratterizzate le EV mediante microscopia elettronica e tecnica del rilevamento di impulsi resistivi sintonizzabili (TRPS).

Le analisi morfologiche hanno indicato una significativa diminuzione del diametro dei miociti e dell'indice di fusione dopo il trattamento con medium di adipociti invecchiati o sottoposti a stress ossidativo o resi insulino-resistenti. Inoltre, abbiamo dimostrato una tendenziale riduzione dell'espressione genica dei marcatori di differenziazione miogenica (MyHC-Iib, MyoD) ed una tendenza verso un'augmentata espressione di geni coinvolti nella fibrosi (CCN-2, COL1A1) e nell'atrofia muscolare (Atrogin-1, MuRF1) nei miociti trattati con medium di adipociti invecchiati o stressati. Abbiamo osservato una tendenziale riduzione della sintesi proteica ed un significativo aumento dell'espressione della miostatina nelle cellule C2C12 trattate con medium di adipociti invecchiati rispetto ai controlli. Abbiamo osservato, inoltre, una concentrazione di EV maggiore nel gruppo insulino-resistente rispetto al controllo.

Questi risultati preliminari suggeriscono che gli adipociti invecchiati o disfunzionali potrebbero influenzare negativamente il trofismo, la funzione e la capacità rigenerativa dei miociti attraverso una rete paracrina di segnalazione. Le EV secrete dagli adipociti potrebbero avere un ruolo rilevante nella comunicazione inter-organo tra TA e tessuto muscolare e potrebbero essere in grado di attivare l'inibizione della differenziazione, aumento della fibrosi e dell'atrofia muscolare. Sono necessari ulteriori studi per chiarire se la riduzione della massa, della qualità e delle prestazioni delle cellule muscolari correlata all'età e all'obesità possa essere arrestato dal trattamento del TA disfunzionale e se gli adipociti senescenti possano rappresentare, non solo gli effettori ma anche potenziali bersagli, per contrastare la disfunzione delle cellule muscolari.

## ABSTRACT

A growing body of evidence has shown the negative effect of white adipose tissue (AT) on skeletal muscle function and quality. However, little is known about the effects of senescent and dysfunctional adipocytes on muscle cells. It has recently been shown that tissue cells, including AT and muscle, can communicate with each other through lipid-derived microvesicles and modulate cell phenotype and homeostasis through a cytokine-independent pathway. It has been seen, for example, that the microvesicles released by adipocytes can regulate insulin sensitivity also in muscle inducing insulin resistance during obesity.

To explore the mechanisms involved in the age-related loss of muscle mass and function, we set up an *in vitro* model using a conditioned culture medium obtained from cultures of mature, aged, insulin-resistant and oxidative stress-exposed 3T3-L1 murine adipocytes to treat C2C12 myocytes. Evs were extracted from the conditioned medium of mature insulin-resistant adipocytes by ultracentrifugation, observed by electron microscopy and characterized by the technique of tunable resistive pulse sensing (TRPS).

Morphological analyzes indicated a significant decrease in myocyte diameter and fusion index after treatment with aged or stressed adipocyte medium. Furthermore, we demonstrated a trend towards a reduction in gene expression of myogenic differentiation markers (MyHC-Iib, MyoD) and a trend towards an increased expression of genes involved in fibrosis (CCN-2, collA1) and muscle atrophy (Atrogin -1, MuRF1) in myocytes treated with medium from aged or stressed adipocytes compared to controls. We observed a tendency toward a decrease in protein synthesis and a significant increase in myostatin expression in C2C12 cells treated with medium from aged or stressed adipocytes compared to controls. Finally, we observed a higher concentration of EV in the insulin-resistant group compared to the control group.

These preliminary results suggest that aged or dysfunctional adipocytes could negatively affect myocyte trophism, function and regenerative capacity via a paracrine signaling network. Furthermore, Evs secreted by adipocytes could play a relevant role in the inter-organ communication between AT and muscle tissue and could be able to activate the inhibition of differentiation, increase in fibrosis and muscle atrophy. Further studies are needed to clarify whether the age- and obesity-related reduction in muscle cell mass, quality and performance can be arrested by the treatment of dysfunctional AT and whether senescent adipocytes may represent, not only the effectors but also potential targets, to counteract muscle cell dysfunction.

## INTRODUZIONE

### L'INVECCHIAMENTO DEL TESSUTO ADIPOSO

L'invecchiamento è caratterizzato da una progressiva perdita dell'integrità fisiologica con conseguente riduzione della funzionalità e deterioramento di diversi organi ed apparati e rappresenta la principale causa di patologie umane e di morte in tutto il mondo (1,2). Negli ultimi decenni, col miglioramento dello stato di salute dei soggetti anziani nel mondo, si è assistito ad una crescita importante della popolazione anziana. Si stima che nei prossimi anni la percentuale di individui con età  $\geq 65$  anni raddoppierà dal 7% al 14%, aumentando da 506 milioni nel 2008 a 1,4 miliardi per il 2040, con un aumento maggiore nei paesi in via di sviluppo ed un invecchiamento progressivo della popolazione anziana, soprattutto nella fascia  $\geq 80$  anni (3). L'intensificarsi dell'invecchiamento della popolazione è generalmente accompagnato dall'aumento delle patologie croniche età-correlate che compromettono la qualità della vita dell'anziano.

Una dei tessuti più vulnerabili ai processi di invecchiamento è il tessuto adiposo (TA), che si caratterizza per modificazioni in diversi processi biologici e fisiologici che a loro volta hanno un ruolo nella eziopatogenesi di diverse malattie cronico-degenerative. Si tratta del più esteso organo endocrino ed oltre ad essere deputato allo stoccaggio di energia, il TA svolge un ruolo significativo nell'omeostasi energetica e metabolica. Il TA diventa disfunzionale con l'invecchiamento promuovendo un'infiammazione cronica di basso grado, l'insulino-resistenza e l'infiltrazione lipidica di diversi organi fra cui il cuore, il fegato ed il muscolo scheletrico (4–6). L'invecchiamento del TA è considerato, pertanto, un importante fattore di rischio per numerose patologie, fra cui il cancro, il diabete, le malattie cardiovascolari e quelle neurodegenerative (2).

Il TA subisce drammatici cambiamenti sotto vari aspetti durante l'invecchiamento (7). Esso viene ridistribuito con una diminuzione del TA sottocutaneo ed un aumento dei depositi viscerali intra- addominali ed in altri organi ectopici come cuore, fegato e muscolo. Con l'avanzare dell'età si assiste, inoltre, alla diminuzione del TA bruno e beige con conseguente dis-regolazione termica e



squilibrio energetico. Oltre agli adipociti ed alle cellule progenitrici adipose, anche altre cellule non adipocitarie ma residenti e costituenti il TA, come macrofagi, fibroblasti e linfociti, componenti della frazione vascolare stromale hanno un ruolo determinante nella patogenesi dell'invecchiamento del TA (8–10). Si ritiene ad esempio che a causa di una ridotta espressione genica anti-infiammatoria e anti-coagulante nelle cellule stromali residenti del TA, la popolazione anziana sia maggiormente suscettibile allo stress infiammatorio (11). Un elevato tasso di senescenza cellulare ed il relativo fenotipo secretorio associato alla senescenza (SASP) sono caratteristiche significative dell'invecchiamento, che si ritiene possano svolgere un ruolo essenziale nel declino funzionale età-correlato del TA (12). Numerosi studi in letteratura hanno indagato i meccanismi biomeccanici e biologici alla base dell'invecchiamento del TA, in particolare dell'eccesso di adiposità. Trattandosi di un esteso e dinamico organo endocrino, immunitario e rigenerativo, il TA svolge un ruolo importante nella salute attraverso il rilascio fattori che regolano vari processi, come il controllo dell'appetito, il metabolismo del glucosio, la sensibilità all'insulina, un'attività infiammatoria e la riparazione dei tessuti (13–15). Dallo studio del profilo di espressione genica di geni attivi nel TA è emerso che circa il 20-30% dei geni espressi nel TA bianco producono proteine secrete (16). A causa di una dis-regolazione nella secrezione dei fattori endocrini, la capacità del TA di stoccare i nutrienti in eccesso, si riduce con l'avanzare dell'età, favorendo l'insorgenza di obesità(17). Inoltre, il TA diventa disfunzionale a causa di una dis-regolazione complessiva del secretoma, che coinvolge citochine pro-infiammatorie e ormoni, contribuendo a una condizione di infiammazione cronica tipica dell'invecchiamento.

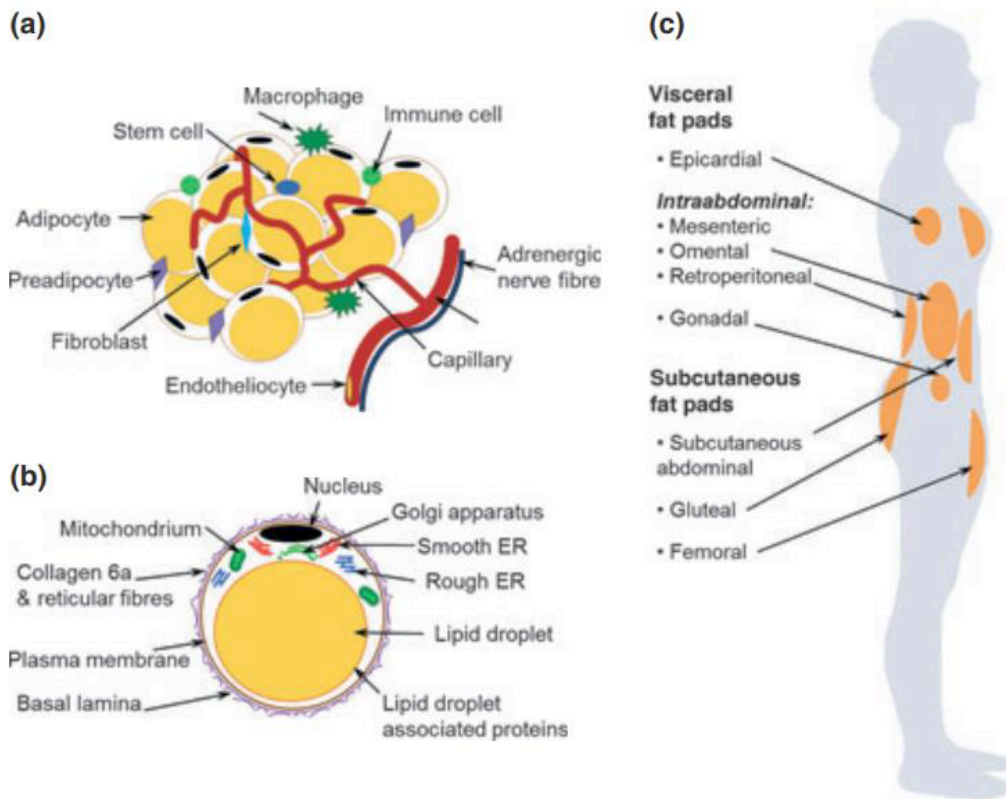
## 1. ANATOMIA DEL TESSUTO ADIPOSO

Il TA è da tempo riconosciuto come un organo vero e proprio, dotato di una propria anatomia, citologia complessa ed alta plasticità fisiologica; esso gioca un ruolo importante non solo nell'omeostasi dei nutrienti e nella termogenesi, ma possiede anche una funzione endocrina essendo in grado di produrre numerosi fattori sierici, tra cui diverse citochine e peptidi con azioni su diversi organi e tessuti

bersaglio. I principali depositi di TA sono rappresentati dai compartimenti viscerale, sottocutaneo, midollare e peri-vascolare.

Il TA è stato tradizionalmente classificato in TA bianco e TA bruno (18). Il TA bianco rappresenta il principale organo di stoccaggio dei lipidi ed è coinvolto in molteplici risposte immuno-endocrine. Dal punto di vista istologico, il TA bianco è costituito dagli adipociti, cellule di morfologia tondeggianti, immunoreattive alla leptina e a S100B, con il 90% del volume rappresentato da una singola goccia lipidica citoplasmatica con un nucleo schiacciato in periferia. Esso può essere classificato sulla base della sua localizzazione in TA sottocutaneo (subcutaneous adipose tissue, SAT) o viscerale (visceral adipose tissue, VAT) (19).

È stato osservato che il VAT è associato a variazioni di pressione sanguigna, glicemia a digiuno e trigliceridi con maggior rischio di ipertensione, alterata glicemia a digiuno, diabete mellito e sindrome metabolica. Il VAT è infatti correlato con la maggior parte dei fattori di rischio metabolici ed è considerato come il principale deposito adiposo pro-infiammatorio (20). La maggiore correlazione ai fattori di rischio metabolico del VAT rispetto al SAT è dovuta alla presenza di differenze, non solo dal punto di vista morfologico, ma anche di tipo metabolico e funzionale. Il VAT è generalmente considerato metabolicamente più attivo, con un maggiore assorbimento di glucosio e metabolismo dell'insulina, inoltre, contiene una percentuale maggiore di cellule infiammatorie e immunitarie e possiede una capacità di differenziazione dei preadipociti inferiore rispetto al SAT (21). Le cellule progenitrici adipogeniche (*adipose progenitor cells*, APC) derivate dal VAT differiscono da quelle derivate dal SAT in termini di espressione genica, di fattori di crescita e capacità di differenziazione. Esse hanno proprietà più simili alle staminali mesenchimali, si espandono per ipertrofia e contribuiscono all'infiammazione tipica dell'obesità. Al contrario le cellule sottocutanee si espandono per iperplasia e rimangono metabolicamente integre nell'obesità (22). Il VAT presenta uno stato infiammatorio maggiore rispetto al SAT, con maggiore espressione di citochine pro-infiammatorie, tra cui TNF- $\alpha$ , IL-6 e PAI-1. Questo è dovuto anche a una maggiore espressione di CCR2 e *Macrophage Migration Inhibitory Factor* e citochine chemiotattiche che favoriscono l'infiltrazione macrofagica del TA viscerale (23) (**Figura 1**).



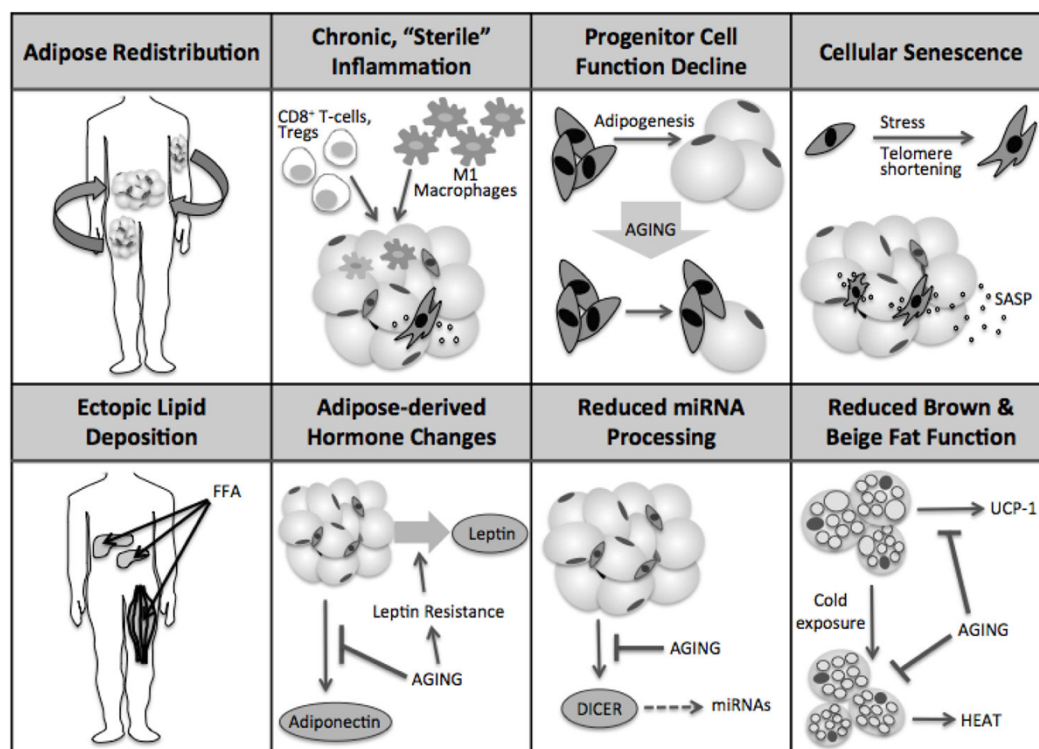
**Figura 1.** Struttura e distribuzione del tessuto adiposo bianco nel corpo. **(a)** Tipi di cellule presenti nel tessuto adiposo bianco. **(b)** Struttura di un adipocita uniloculare (bianco). Solo alcuni organelli sono raffigurati e non sono disegnati in scala. Elementi del citoscheletro (ad esempio microtubuli e actina corticale filamenti) sono stati omessi per una migliore chiarezza dell'immagine. **(c)** Localizzazione dei principali depositi di tessuto adiposo bianco nel corpo umano. ER: reticolo endoplasmatico; WAT: tessuto adiposo bianco.

Il TA bruno che si localizza soprattutto nello spazio interscapolare, sopra-clavicolare, surrenale e para-aortico degli esseri umani va incontro a progressiva riduzione con l'invecchiamento ed è coinvolto nella regolazione del dispendio energetico dell'organismo (24,25). Il ruolo principale del TA bruno è la dissipazione dell'energia attraverso la respirazione disaccoppiata per produrre calore attraverso un processo che utilizza una proteina chiamata uncoupling-protein-1 (UCP-1) espressa nello strato più profondo della membrana mitocondriale (25). Nel corso dell'esposizione al freddo, il TA bruno è responsabile, inoltre, del mantenimento della temperatura corporea mediante termogenesi senza brividi (25,26). Il TA bruno è costituito da cellule poligonali con nucleo tondeggiante,

diverse goccioline lipidiche citoplasmatiche e numerosi mitocondri di grandi dimensioni, ricchi di creste e contrassegnati dall'espressione di UCP-1 (25).

Nell'organo adiposo sono presenti anche gli *adipociti beige* o *brite* (brown-like-in-white) che hanno una morfologia intermedia tra quella degli adipociti bianchi e bruni. Essi derivano da depositi di TA bianco anche se sono più simili al TA bruno in termini sia di morfologia che di funzione (25,27). Si ritiene che il fenotipo degli adipociti beige possa cambiare in funzione delle condizioni ambientali e possano svolgere funzioni sia termogeniche che di stoccaggio (25).

Oltre agli adipociti, il TA contiene matrice extracellulare ricca di fibre collagene, vasi sanguigni, fibroblasti e cellule immunitarie che funzionano come un'unità integrata, rendendolo un vero e proprio organo endocrino (28). Con l'invecchiamento, il TA subisce cambiamenti significativi in quantità, distribuzione, composizione cellulare e attività endocrina e svolge un ruolo centrale nello sviluppo di insulino-resistenza, disfunzione metabolica, infiammazione, presentando una ridotta capacità rigenerativa con l'età (29) (**Figura 2**).



**Figura 2.** Il tessuto adiposo si modifica con l'invecchiamento. Con l'invecchiamento, il tessuto adiposo subisce numerosi cambiamenti, che comprendono la sua distribuzione, lo

stato infiammatorio, la funzione progenitrice, il carico cellulare senescente, la deposizione di lipidi nei siti ectopici, la produzione e l'azione degli ormoni derivanti dal tessuto adiposo, l'elaborazione dei miRNA e la funzione adiposa marrone e beige.

## 2. CARATTERISTICHE DEL TESSUTO ADIPOSO NELL'INVECCHIAMENTO

### *2.1. Modificazioni della composizione corporea età-correlate*

Nel processo di invecchiamento, il TA subisce cambiamenti notevoli sia nella massa che nella sua distribuzione.

L'accumulo di massa grassa totale è un evento comune nei soggetti anziani sia sani che malati e può verificarsi già a partire dalla mezza età (30). In genere, col passare degli anni, la percentuale di grasso corporeo aumenta, mentre la massa magra e la densità minerale ossea diminuiscono progressivamente (31). Tuttavia, si può assistere ad una riduzione della massa grassa in fasi più avanzate dell'invecchiamento, elemento questo indicativo di un deterioramento dello stato di salute (30). Anche in condizioni di stabilità di peso, la perdita di SAT risulta spesso mascherata dall'aumento della massa grassa corporea totale che si verifica con l'avanzare dell'età. L'aumento percentuale della massa grassa (*fat mass*, FM) è dovuto principalmente alla riduzione della massa magra (*fat free mass*, FFM), mentre l'aumento percentuale della FM addominale è legato all'aumento dei depositi in questa regione (32,33). E' stato osservato che la FM aumenta con l'avanzare dell'età e si stabilizza a 70 anni, mentre la FFM aumenta tra i 20 e i 47 anni, per poi diminuire costantemente; infine, anche la massa corporea totale aumenta tra i 20 e i 60 anni e poi si riduce. L'aumento della massa corporea è dovuto principalmente all'aumento della FM, mentre il declino è correlato alla perdita di FFM, che è responsabile anche dell'aumento percentuale della FM dopo i 70 anni (34). Per quanto riguarda la FFM, la sua riduzione è più evidente dopo i 60 anni d'età, soprattutto nelle donne in post-menopausa ed il tasso di perdita è influenzato dalle variazioni del peso corporeo. Si ritiene, infatti, che la riduzione del peso corrisponda ad una maggiore perdita di FFM, mentre un aumento o una stabilità del peso corrisponda ad una sua perdita meno rapida (35). Oltre alla perdita di massa

muscolare, con l'invecchiamento diminuisce anche la qualità del muscolo, in quanto si verifica un aumento del grasso intramuscolare e della fibrosi con riduzione delle fibre di tipo II e della capacità contrattile muscolare, che si associa a una diminuzione della forza e della performance fisica (36).

Un altro cambiamento legato all'età nella composizione corporea è la redistribuzione del grasso. L'invecchiamento non è solo associato all'aumento dell'adiposità totale, ma anche ad una redistribuzione del grasso corporeo. Si verifica, infatti, una riduzione dei depositi di SAT nella parte inferiore del corpo ed un aumento dei depositi viscerali sia nella regione addominale che in siti ectopici fra cui il fegato, muscolo, midollo osseo e cuore (7). Confrontando soggetti giovani e anziani con *body mass index* (BMI) e percentuale di grasso corporeo simili si osservano differenze significative nella distribuzione dell'adiposità; con la TC si osserva un aumento dell'area del grasso intraddominale ( $72.6 \pm 38.2$  vs  $143.6 \pm 56.2$  cm<sup>2</sup>,  $p < 0.0001$ ) e una diminuzione di quello sottocutaneo ( $156.3 \pm 69.3$  vs  $82.4 \pm 29.7$  cm<sup>2</sup>,  $p < 0.001$ ) nei soggetti più anziani rispetto ai più giovani (37). È noto che i soggetti di sesso maschile hanno una percentuale di FM totale inferiore rispetto a quelli di sesso femminile e tendono a depositare più TA a livello addominale, nei compartimenti viscerale e sottocutaneo (pattern androide di distribuzione del TA) rispetto alle donne in pre-menopausa, che accumulano grasso prevalentemente a livello sottocutaneo e, in particolare, a livello gluteo-femorale (pattern ginoide di distribuzione del TA). Ciò è dovuto prevalentemente alle differenze nei livelli di ormoni sessuali, testosterone ed estrogeni, e all'espressione specifica nel TA dei loro recettori. Negli uomini, con l'invecchiamento, si verifica prevalentemente l'espansione dei compartimenti viscerale e sottocutaneo a livello addominale e si ritiene che ciò sia attribuibile alla diminuzione dei livelli di testosterone, sia per ridotta produzione, che per aumento dei livelli di globulina legante l'ormone steroideo. Nelle donne, dopo la menopausa, i livelli di estrogeni diminuiscono e il rapporto tra androgeni e estrogeni aumenta per cui si verifica di conseguenza una redistribuzione dei lipidi nel compartimento del VAT (38). Il SAT ed il VAT sono molto diversi in termini di effetti sul metabolismo. In generale, SAT è considerato vantaggioso per metabolismo, mentre si ritiene che il VAT sia dannoso. La redistribuzione età-correlata del TA a favore dei depositi viscerali si

associa ad un aumentato rischio di anomalie metaboliche, in particolar modo, allo svilupparsi di insulino-resistenza, aumentato rischio di malattie cardiovascolari e diabete (30,39). I meccanismi alla base della perdita di grasso periferico sottocutaneo durante l'invecchiamento non sono pienamente compresi. È stato suggerito che la perdita di grasso periferico nell'invecchiamento sia in parte dovuta a difetti nell'adipogenesi nel SAT, e correlata ad una iper-attivazione dell'infiammazione (40). Si è osservato, inoltre, che la lunghezza basale dei telomeri del SAT è minore rispetto al VAT, suggerendo che il SAT sia più vulnerabile al danno legato all'età (41). La distribuzione del grasso corporeo è un importante fattore di rischio metabolico e cardiovascolare, in quanto il grasso corporeo addominale è correlato ad incremento di comorbidità e mortalità rispetto a quello gluteo-femorale, che, al contrario, è associato a un profilo lipidico e glicemico protettivo e a una diminuzione del rischio cardiovascolare e metabolico. Il TA gluteo-femorale, infatti, presenta un profilo metabolico anti-infiammatorio ed è in grado di stoccare i lipidi a lungo termine, riducendo il numero di acidi grassi circolanti e la deposizione di TA ectopico (42). L'incremento dell'adiposità addominale, invece, porta a una condizione di infiammazione cronica e lipotossicità ed è spesso associato a una serie di comorbidità come iperinsulinemia, ipertensione arteriosa, resistenza all'insulina e ridotta tolleranza al glucosio con aumento del rischio di diabete e malattie cardiovascolari (43). Considerando gli effetti benefici del SAT sul metabolismo sistemico, probabilmente la disfunzione metabolica tipica dell'invecchiamento deriva sia da una carenza di SAT che da un aumento del VAT.

## *2.2. Declino funzionale dei progenitori staminali*

Le APC sono il pool di cellule staminali essenziali nella frazione vascolare stromale del TA e danno origine agli adipociti maturi. I preadipociti sono parte integrante del TA, rappresentando dal 15% al 50% delle cellule del tessuto. Il potenziale di differenziazione e proliferazione delle APC garantisce il rinnovamento, l'espansione e la plasticità funzionale del TA. Si tratta, infatti, di cellule in grado di replicarsi e differenziarsi in cellule adipose e la loro

differenziazione è promossa dall'esposizione a sostanze nutritive, fattori ormonali come insulina, glucocorticoidi, *insulin growth factor 1* (IGF-1), oltre che a fattori paracrini e autocrini, tra cui acidi grassi liberi e AMP ciclico, che modulano l'attività dei fattori di trascrizione *CCAAT/enhancer binding protein  $\alpha$*  (C/EBP $\alpha$ ) e *peroxisome proliferator-activated receptor  $\gamma$*  (PPAR $\gamma$ ), fattori chiave nella differenziazione in senso adipocitario. Infatti, tali fattori di trascrizione influenzano l'espressione di geni della differenziazione, tra cui la proteina legante gli acidi grassi adipocita-specifica (aP2), l'adiponectina, l'acido grasso sintasi, la leptina e GLUT4 (44). Durante il normale invecchiamento dell'organo adiposo, i preadipociti vanno incontro a fenomeni di senescenza cellulare, con riduzione della capacità di proliferazione e di differenziazione adipogenica (45,46).

Si ritiene che il declino della capacità di proliferazione di APC inizi all'età di 30 anni e si faccia più evidente all'età di 50 anni. È stato dimostrato che le APC ottenute da donatori più anziani possiedono un potenziale osteogenico inferiore rispetto a quelle ottenute da donatori giovani, ad indicare che le APC che invecchiano potrebbero avere solo una limitata capacità rigenerativa (47). Confrontando preadipociti isolati dal SAT di soggetti sani giovani e anziani, è stato osservato che sia il tasso di replicazione che di differenziazione sono ridotti nei soggetti più anziani. Tali cambiamenti nei preadipociti del SAT influenzano sia la dimensione del pool di preadipociti disponibile per la differenziazione, sia la velocità con cui queste cellule si differenziano in adipociti (40).

Oltre alla riduzione della capacità di proliferazione dei preadipociti negli individui più anziani, anche la differenziazione dei preadipociti è significativamente compromessa rispetto a quella di individui più giovani. La differenziazione cellulare, che è regolata anche dalla via ubiquitina-proteasoma, subisce, infatti, delle alterazioni durante l'invecchiamento. L'inibizione del proteasoma diminuisce la differenziazione adiposa e aumenta lo stress ossidativo negli adipociti maturi, portando effetti deleteri che contribuiscono alla disfunzione del TA tipica dell'invecchiamento. I membri della famiglia C/EBP e PPAR $\gamma$  svolgono ruoli vitali nel programma di differenziazione regolando la trascrizione dei geni adipogenici (48). Studi precedenti hanno dimostrato che l'espressione di C/EBP $\alpha$ , un regolatore fondamentale dell'inizio della differenziazione dei



preadipociti e del mantenimento degli adipociti, è ridotta nel TA di soggetti più anziani rispetto a individui più giovani (49). L'inibizione del proteasoma determina una diminuzione di PPAR $\gamma$  e C/EBP $\beta$ , entrambi fattori regolatori chiave dell'adipogenesi (50). La ridotta capacità di differenziazione dei preadipociti è prevalentemente legata alla riduzione nell'espressione del fattore di trascrizione adipogenico C/EBP $\alpha$  con l'invecchiamento. Tale riduzione compromette, non solo la differenziazione dei preadipociti, ma anche la funzione delle cellule adipose che si sviluppano da essi, che presentano ridotta dimensione, ridotta capacità di accumulo dei lipidi e ridotta tolleranza al glucosio (49). Di conseguenza, la riduzione dei depositi di grasso che si verifica nell'invecchiamento è correlata alla diminuzione delle dimensioni degli adipociti e alla ridotta lipolisi, entrambe conseguenza di una diminuita capacità di differenziazione e replicazione dei preadipociti, e non a una riduzione del numero di cellule che rimane costante o aumenta con la vecchiaia (46). La ridotta differenziazione dei preadipociti è legata anche a livelli alterati di altri fattori adipogenici. Ad esempio, le proteine C/EBP $\beta$ -LIP (CCAAT/proteina beta inibitoria del fegato) e CHOP (CCAAT/proteina omologa della proteina potenziatrice) sono sovraregolate con l'invecchiamento, il che riduce la differenziazione degli adipociti (51,52). Oltre ai fattori di trascrizione, anche alterazioni nei microRNA (miRNA) e negli RNA non codificanti corti (17-20 nts) sono coinvolti nella disfunzione dei preadipociti durante il processo di invecchiamento, regolando la trascrizione e la traduzione dell'RNA messaggero nelle vie adipogeniche. I difetti di differenziazione dei preadipociti con l'invecchiamento sono correlati ai livelli di ridotti miR-143, che gioca un ruolo chiave nel promuovere la differenziazione adipocitaria attraverso la via ERK5-PPAR $\gamma$  (53,54).

In conclusione la disfunzione delle APCs altera la plasticità del TA, costituendo un meccanismo alla base dell'insulino-resistenza negli anziani (55). Inoltre, poiché i preadipociti sono meno in grado di differenziare e immagazzinare correttamente i lipidi, l'invecchiamento del TA espone altri tessuti e organi a quantità ancora maggiori di acidi grassi liberi lipotossici (56). Questa lipotossicità è riconosciuta come un meccanismo critico nella patogenesi della sindrome metabolica che si associa a maggiore comorbidità e mortalità nel soggetto anziano.

### 2.3. Accumulo di cellule senescenti

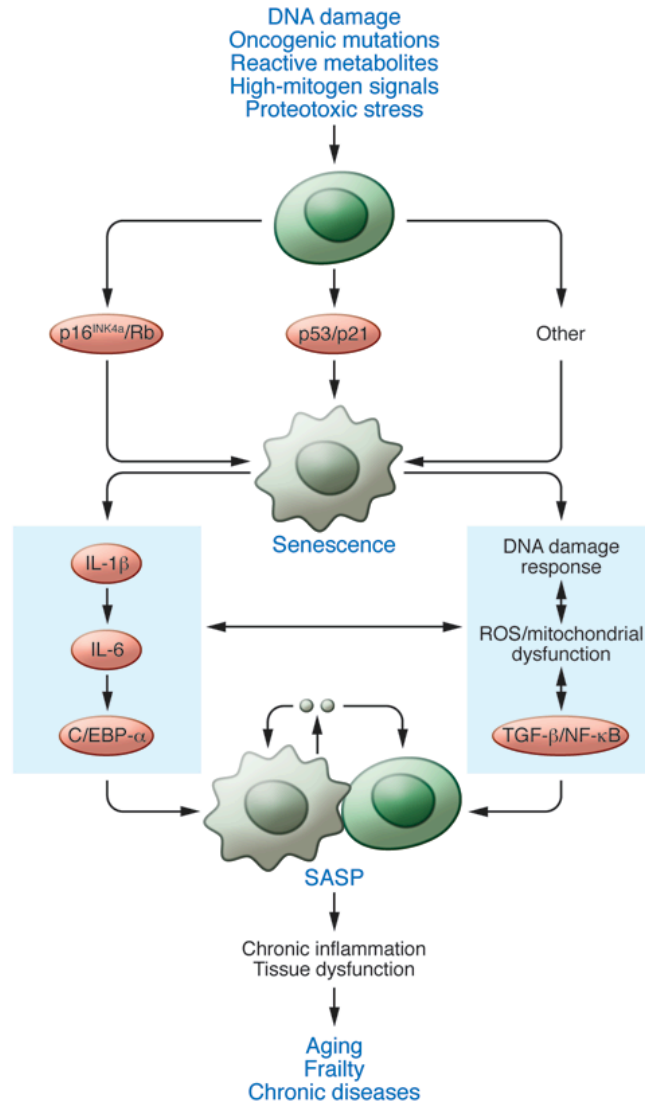
La senescenza cellulare è una condizione caratterizzata dall'arresto del ciclo cellulare ed è correlata al declino del potenziale rigenerativo e della funzione di vari tessuti (57). Il TA è un sito ricco di cellule senescenti durante l'invecchiamento (43,58) che accumulandosi, attraverso la produzione di citochine, possono indurre una combinazione di stress replicativo e metabolico (59). Sebbene si suggerisca che la senescenza cellulare sia un meccanismo difensivo in grado di limitare la genesi tumorale, la sua presenza nel TA causa molteplici disfunzioni, tra cui un'adipogenesi difettosa, infiammazione, produzione aberrante di adipo-citochine e resistenza all'insulina. L'accumulo di cellule senescenti può essere indotto da vari stress endogeni ed esogeni, inclusi danni al DNA, accorciamento dei telomeri, mutazioni oncogeniche (es. Ras, Myc e B-Raf) e stress ambientali (es. aggregazione proteica e proteine spiegate) (60). Coerentemente con l'idea che la senescenza cellulare sia un meccanismo importante per prevenire la progressione del cancro, le vie tumorali p53 e pRB rappresentano regolatori centrali dell'accumulo di cellule senescenti (61). È stato dimostrato che l'inibizione di p53 induce le cellule senescenti a rientrare nel ciclo cellulare (62,63). L'infiammazione cronica con sovraregolazione continua dei mediatori proinfiammatori (ad es. TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , 6, ciclo-ossigenasi-2, ossido nitrico sintasi inducibile) può promuovere la senescenza cellulare, che a sua volta diventa una fonte di secrezione proinfiammatoria (64).

Le cellule senescenti presentano dimensioni aumentate, positività alla colorazione SA- $\beta$ -gal e cambiamenti diffusi nell'espressione genica che portano alla produzione di un fenotipo secretorio associato alla senescenza (*senescence associated secretory phenotype*, SASP) costituito da citochine, chemochine, proteasi e fattori di crescita, che si ritiene essere un marcatore di invecchiamento tissutale (59,65). I fattori SASP derivati da cellule senescenti nel tessuto adiposo sono rappresentati da fattori proinfiammatori (citochine, chemochine e miRNA), recettori del TNF, fattori solubili non proteici (ossido nitrico), fattori di crescita (EGF, VEGF e NGF) e macromolecole della matrice extracellulare (fibronectina, collagene e laminina) (58,66). Uno dei potenziali bersagli della terapia anti-aging potrebbe essere rappresentato da NF- $\kappa$ B o C/EBP $\beta$ , che sono attivati in cellule

senescenti e mediano la sovraregolazione dei componenti SASP a livello di mRNA (67). Abbiamo recentemente dimostrato che il trattamento col senolitico quercetina di preadipociti e adipociti invecchiati, determina una significativa diminuzione del numero di cellule senescenti, la soppressione dello stress ossidativo ed il SASP attraverso la diminuzione di miR-155-5p con downregulation dell'espressione di NF- $\kappa$ B e upregulation di SIRT-1 (68). Un'altra via potenziale target di terapie anti-aging è rappresentata dalla via Janus chinasi/trasduttore di segnale e attivatore della trascrizione (JAK/STAT), che svolge un ruolo significativo nello sviluppo e nella funzione del tessuto adiposo e regola il SASP, e che se bloccata, potrebbe inibire parzialmente la secrezione di SASP (69). Poiché i ruoli della senescenza cellulare e del SASP nell'invecchiamento sono ancora non del tutto noti, gli studi futuri devono chiarire con precisione gli effetti deleteri del SASP e della senescenza cellulare per una migliore identificazione di eventuali target terapeutici.

La diminuzione nel numero delle cellule staminali e dell'adipogenesi delle APC invecchiate potrebbe anche essere il risultato di un accumulo di cellule senescenti e dei loro prodotti (65). Le cellule senescenti, infatti, possono influenzare le cellule adiacenti attraverso la secrezione del SASP, inibendo lo sviluppo delle cellule progenitrici, prevenendo la sostituzione delle cellule morenti e riducendo le funzioni tissutali. Uno studio, infatti, ha scoperto che i progenitori degli adipociti senescenti umani inibiscono l'adipogenesi dei progenitori non senescenti circostanti attraverso meccanismi paracrini (65). Si è visto che solo il 20% dei progenitori adiposi accumula lipidi quando viene co-coltivato con cellule senescenti, rispetto a oltre il 50% dei progenitori co-coltivato con cellule non senescenti. Questi effetti possono essere correlati all'attivina A, all'interleuchina-6 (IL-6), al TNF- $\alpha$ , all'interferone- $\gamma$  (IFN- $\gamma$ ) e/o ai componenti SASP prodotti da cellule progenitrici adipose senescenti e/o da altri tipi di cellule senescenti. Il SASP è composto infatti da una serie di citochine, chemochine, fattori pro-infiammatori e di rimodellamento della matrice extracellulare, che operano in modo dipendente o indipendente per promuovere l'infiammazione alla base di diverse patologie infiammatorie croniche e sembra essere regolato attraverso cascate trascrizionali che comprendono NF- $\kappa$ B e p38-MAPK e una risposta al danno al DNA che coinvolge p53 (70). Si ritiene che le citochine e chemochine prodotte nel contesto

del SASP possano attivare una risposta del sistema immunitario in grado di amplificare la senescenza cellulare a livello sistemico, anche grazie al rimodellamento della matrice extracellulare con esposizione di antigeni (71) (Figura 3).



**Figura 3.** Numerosi induttori possono agire per spingere verso la senescenza attraverso percorsi che coinvolgono p16INK4a/Rb, p53/p21 e probabilmente altre vie. I fattori scatenanti possono includere danni al DNA (ad es., accorciamento dei telomeri e rotture a singolo e doppio filamento), mutazioni oncogeniche (ad es. Ras, Myc, B-Raf), metaboliti reattivi (ad esempio, ROS, ceramidi, acidi grassi, glucosio alto), segnali che aumentano l'attività mTOR (*mechanistic target of rapamycin*) e lo stress proteotossico (ad esempio, aggregazione proteica e proteine non ripiegate). Questi possono contribuire a cambiamenti

diffusi nell'espressione genica e nel rimodellamento della cromatina (formazione di eterocromatina) che sono alla base dell'arresto della crescita associato alla senescenza, del SASP e dei cambiamenti nella morfologia. I circuiti autocrini intracellulari rafforzano la progressione verso l'arresto replicativo irreversibile, la formazione di eterocromatina e l'attivazione del SASP. Oltre a rimuovere cellule del pool di progenitori staminali, la senescenza può contribuire alla disfunzione tissutale ed alla predisposizione alle malattie croniche attraverso il SASP e infiammazione sterile cronica associata e degradazione di la matrice extracellulare.

#### *2.4. Bassi livelli di infiammazione ed "Inflammaging"*

L'infiammazione cronica caratterizzata dalla continua secrezione di fattori proinfiammatori a livelli superiori al basale contribuisce all'invecchiamento generale e alle malattie legate all'età (72). È stato suggerito che il TA sia una delle principali fonti di citochine infiammatorie durante l'invecchiamento, responsabile di uno stato pro-infiammatorio sistemico tipico dell'invecchiamento e noto con il termine "inflammaging" (18).

Alcuni studi condotti su animali hanno mostrato che il TA dei topi anziani esprime elevati livelli di citochine proinfiammatorie come IL-1, IL-6, TNF- $\alpha$ , COX-2 (ciclossigenasi 2) rispetto a quelli di topi giovani (72). Un altro studio sull'invecchiamento ha osservato che, nei topi anziani di 18 mesi, alcuni geni facenti parte di vie infiammatorie che mediano l'espressione di citochine, fra cui Ccl8, sono sovra-regolati (73). Il rilascio di citochine proinfiammatorie dai preadipociti sotto l'esposizione al TNF- $\alpha$  porta le cellule adiacenti a loro volta in uno stato proinfiammatorio, parallelamente alla promozione dell'adesione cellula-monocita endoteliale e dell'infiltrazione dei macrofagi (74). Inoltre, il rilascio di TNF- $\alpha$  da preadipociti indifferenziati con alta espressione di C/EBP e CHOP può determinare a sua volta una alterazione dell'adipogenesi, con ulteriore peggioramento della disfunzione legata all'età del TA (52).

Nel TA invecchiato, l'aumento della produzione di citochine infiammatorie e l'espressione di alcune chemochine, varia a seconda della tipologia del deposito. Ad esempio, l'aumento correlato all'età della risposta dell'IL-6 è maggiore nel SAT rispetto al VAT (75). Sebbene i cambiamenti legati all'età nell'ambiente infiammatorio del TA siano simili a quelli dell'obesità, l'espansione infiammatoria

e l'attivazione dei macrofagi nell'invecchiamento sembrano meno eclatanti di quelle nell'obesità (76). La risposta dei macrofagi al passaggio a uno stato proinfiammatorio da parte di chemochine e citochine generalmente diminuisce con l'invecchiamento (77).

Diversi meccanismi hanno dimostrato di indurre l'infiammazione con l'invecchiamento. L'attività autofagica disregolata nel TA invecchiato promuove stress ed infiammazione elevati legati all'invecchiamento del reticolo endoplasmatico, che possono essere collegati all'accumulo di substrati autofagici LC3-II e p62 (78) e la risposta allo stress nel TA invecchiato promuove l'infiammazione associata all'età (5). Poiché è noto che le adipochine disregolate dal TA possono contribuire all'infiammazione cronica di basso grado nell'obesità, è stato ipotizzato che le adipochine possano svolgere un ruolo anche nell'infiammazione correlata all'età (17). L'espansione del TA per ipertrofia, la deposizione di grasso ectopico, l'ipossia e lo stress cronico, tutti fenomeni che si riscontrano sia nel soggetto obeso che nell'anziano, provocano un'infiammazione cronica di basso grado e una disfunzione metabolica sistemica associata ad alterazioni nella secrezione endocrina, con un aumento di adipochine pro-infiammatorie.

#### *2.5. Disfunzione metabolica ed insulino-resistenza*

Si presumeva che diversi cambiamenti legati all'età nel TA fossero la ragione endogena della disfunzione metabolica. L'ipertrofia degli adipociti con trasporto inefficiente dei nutrienti e scarsa segnalazione cellulare, che è una caratteristica comune dell'invecchiamento, può portare a difetti metabolici e diminuzione del dispendio energetico (79). I cambiamenti legati all'età nella matrice extracellulare del tessuto adiposo, come la diminuzione della periostina e del collagene VI, possono portare a difetti metabolici influenzando negativamente l'omeostasi dei nutrienti e dell'energia (80,81). L'ablazione del gene che codifica per la periostina nei topi porta a disfunzioni metaboliche legate all'età con un basso adattamento del tessuto adiposo alla stimolazione adrenergica e all'alimentazione con dieta ricca di grassi, nonché al metabolismo dei lipidi nel tessuto adiposo (80). La senescenza cellulare nel tessuto adiposo partecipa probabilmente alla

disfunzione metabolica, il che è supportato dalla scoperta che l'inibizione dell'attività di p53 nel tessuto adiposo migliora notevolmente la sensibilità all'insulina (82). Coerentemente, è stato dimostrato che l'inibizione delle cellule senescenti o dei loro prodotti nel tessuto adiposo migliora il metabolismo nei topi anziani (65). L'evidenza accumulata indica che le alterazioni legate all'età nel tessuto adiposo contribuiscono all'insulino-resistenza nella popolazione anziana. I difetti legati all'età nella cascata di segnalazione dell'insulina, come una riduzione della fosforilazione della tirosina stimolata dall'insulina, sono più gravi nel tessuto adiposo che nel fegato o nei muscoli, il che suggerisce che il tessuto adiposo può essere un'origine dell'insulino-resistenza durante il processo di invecchiamento (83). La redistribuzione dei lipidi e l'infiammazione cronica derivata dall'invecchiamento del tessuto adiposo inducono infatti alterazioni metaboliche, tra cui insulino-resistenza, ridotta tolleranza al glucosio e diabete. Alti livelli di citochine proinfiammatorie, come i membri della famiglia IL-1, nel TA disfunzionale possono alterare direttamente la via di segnalazione dell'insulina (84,85). Inoltre, anche modificazioni a carico delle cellule immunitarie legate all'invecchiamento, come l'accumulo di cellule T, sono state indicate come una delle cause dell'insulino-resistenza (86).

#### *2.6. Alterazioni nella secrezione delle adipochine e stress ossidativo nel TA con l'invecchiamento*

Il TA, considerato il più grande organo endocrino dell'organismo e secernente centinaia di molecole bioattive, chiamate adipochine, ha effetti autocrini, paracrini ed endocrini e contribuiscono, all'interno del TA, all'adipogenesi, alla migrazione delle cellule immunitarie, al metabolismo e alla funzione degli adipociti. A livello sistemico, le adipochine partecipano alla regolazione dell'appetito e della sazietà, alla distribuzione del grasso, alla secrezione e alla sensibilità dell'insulina, al dispendio energetico, alla funzione endoteliale, all'infiammazione, alla regolazione della pressione sanguigna e all'emostasi (87). Studi *in vitro* sull'invecchiamento degli adipociti hanno mostrato come la funzione endocrina si modifichi con l'invecchiamento cellulare.

Gli adipociti invecchiati *in vitro* appaiono più insulino-resistenti e presentano una riduzione dell'espressione genica di adiponectina e di leptina (88). In generale, si osserva uno spostamento della secrezione verso un profilo maggiormente pro-infiammatorio, come dimostrato dall'aumento dell'espressione e della secrezione di mRNA di IL-6, MCP-1 e da una riduzione dell'adiponectina (89). In letteratura negli studi condotti sull'uomo non c'è concordanza sulle modificazioni dei valori di leptina con l'invecchiamento. Secondo alcuni autori i livelli di leptina diminuiscono con l'invecchiamento cellulare (88) e negli anziani fragili per una diminuzione del grasso corporeo (90). Tuttavia, nella maggior parte degli studi si osservano livelli circolanti elevati di leptina per cui è stata ipotizzata l'esistenza di un fenomeno di leptino-resistenza sia a livello periferico che centrale. In particolare, si osservano livelli elevati di leptina associati a una riduzione della sua attività, con incapacità di ridurre l'assunzione di cibo e di aumentare il metabolismo e quindi di favorire la perdita di peso (91). Inoltre, è stato osservato come i livelli plasmatici di leptina, che sono direttamente proporzionali alla quantità di grasso corporeo, nell'invecchiamento in modelli animali, continuano ad aumentare in modo sproporzionato rispetto all'aumento della massa grassa, suggerendo come l'invecchiamento del TA possa avere un ruolo nell'aumento della produzione di leptina. Infatti, sottoponendo i ratti anziani a una restrizione calorica, in modo che il quantitativo di depositi di grasso sia simile ai ratti giovani, si osservava un aumento dei livelli di leptina (92).

L'alterata produzione di citochine si osserva anche come conseguenza del danno cellulare indotto dall'accumulo di ROS, che si verifica nel corso della vita. Studi su soggetti obesi e studi *in vitro* su adipociti trattati con elevati livelli di acidi grassi, che comportano un aumento dello stress ossidativo, hanno rilevato alterazioni nella secrezione adiposa, in particolare, con una riduzione nella produzione di adiponectina e aumento di PAI-1, IL-6 e MCP-1 (93). I ROS, infatti, possono indurre danni cellulari diretti a DNA, proteine e lipidi, e influenzare varie vie di segnalazione e programmi di trascrizione che regolano processi chiave dello sviluppo cellulare, tra cui la differenziazione, proliferazione, senescenza e apoptosi. L'invecchiamento è associato a un aumento dell'accumulo di ROS, sia per aumento della produzione da parte dei mitocondri, che per un alterato meccanismo



antiossidante a causa della riduzione di sostanze antiossidanti, tra cui glutatione-perossidasi, superossido-dismutasi e catalasi (94). Questo si traduce in un danno cellulare e, in particolare a livello adiposo, si hanno disfunzioni degli adipociti, con alterazioni nell'insulino-sensibilità cellulare e alterazioni nella secrezione di adipochine con aumento della produzione di leptina, MCP-1, IL-6 e TNF $\alpha$  e diminuzione dell'adiponectina (95). Lo stress ossidativo o l'esposizione delle cellule adipose alle radiazioni ultra-violette possono determinare anche una ridotta espressione di Dicer, enzima responsabile del processamento dei miRNA, che sono importanti regolatori dei processi biologici in molti tessuti, inclusa la differenziazione e la funzione degli adipociti. Tali riduzioni si osservano anche in alcuni modelli murini di invecchiamento e nei preadipociti umani di soggetti anziani. La regolazione dell'elaborazione dei miRNA nei tessuti adiposi gioca un ruolo importante nella longevità e nella capacità di un organismo di rispondere allo stress ambientale e alle malattie legate all'età (96). Infatti, topi *know-out* per Dicer nel TA risultano ipersensibili allo stress ossidativo, presentano senescenza cellulare prematura e lipodistrofia caratterizzata da perdita di grasso bianco intra-addominale e sottocutaneo, grave insulino-resistenza e "whitening" del TA bruno (97).

## **II.TESSUTO MUSCOLARE: MODIFICAZIONI LEGATE ALL'INVECCHIAMENTO E SARCOPENIA**

### 1. ANATOMIA DEL TESSUTO MUSCOLARE E MODIFICAZIONI CON L'INVECCHIAMENTO

Il tessuto muscolare scheletrico rappresenta circa il 40% del peso corporeo totale ed è responsabile del mantenimento e del cambiamento della posizione del corpo, della locomozione e del movimento degli organi interni (98).

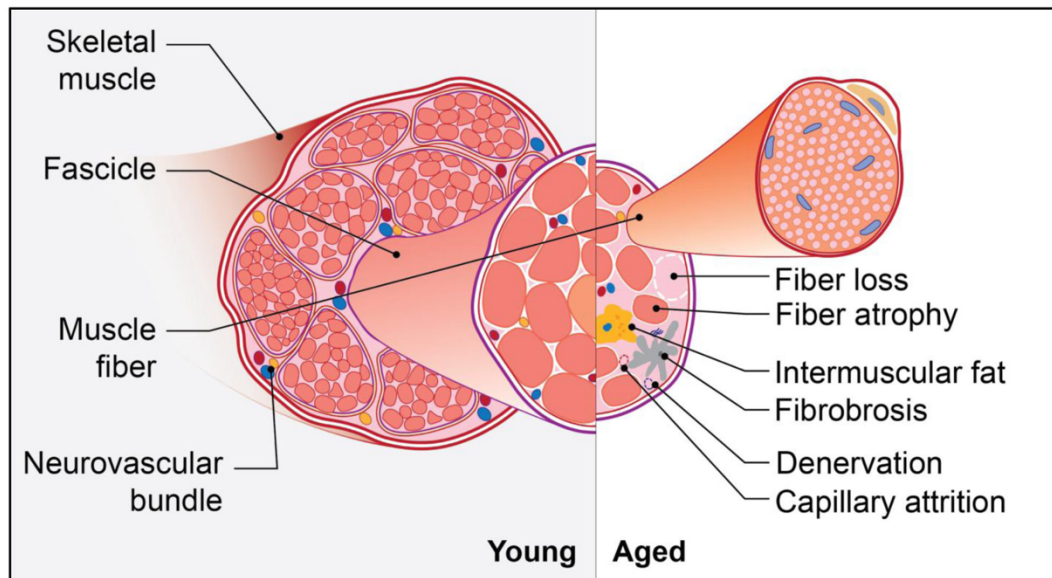
Il muscolo scheletrico è costituito dalle fibre muscolari (o cellule muscolari) e da matrice extracellulare composta da fibre collagene in una matrice di proteoglicani che circonda i singoli muscoli, formando l'epimisio, i gruppi di fibre, formando il perimisio, e ciascuna fibra, formando l'endomisio. Le cellule satelliti sono le cellule staminali adulte del muscolo scheletrico che si trovano tra il sarcolemma e la lamina

basale e contribuiscono alla crescita, riparazione e rigenerazione muscolare quando attivate da fattori miogenici che ne inducono la replicazione e differenziazione. La matrice extracellulare funge da supporto per vasi e nervi e ha un ruolo nella trasmissione della forza, nel mantenimento e nella riparazione delle fibre muscolari. Secondo la classificazione più frequentemente utilizzata il muscolo scheletrico è costituito da tre tipi di fibre: tipo I (lento, ossidativo, resistente alla fatica), tipo IIA (veloce, ossidativo, con proprietà metaboliche intermedie) e tipo IIX (veloce, glicolitico, affaticabile) (98).

L'unità funzionale del sistema motorio, l'unità motoria, è composta da un motoneurone e da un gruppo di fibre muscolari con proprietà strutturali e funzionali simili. Per formare un muscolo, molte unità motorie (decine o centinaia) vengono assemblate e ciascuna porta il proprio contributo. Le proprietà strutturali e funzionali delle fibre, che sono generalmente indicate come fenotipo della fibra, possono cambiare in risposta alle influenze ormonali e neurali, in quanto il muscolo è un tessuto estremamente plastico (99).

Il tessuto muscolare è anche considerato un tessuto endocrino in quanto è in grado di secernere sostanze, definite miochine, che hanno azione autocrina, paracrina ed endocrina. Le miochine sono citochine o peptidi sintetizzati e rilasciati dai miociti nel tessuto muscolare in risposta alla contrazione muscolare e sono implicate nella regolazione autocrina del metabolismo muscolare, ma anche paracrina ed endocrina di altri tessuti come TA, fegato e cervello (100).

L'invecchiamento del muscolo scheletrico è caratterizzato da una serie di cambiamenti morfologici, strutturali e funzionali associati a un maggior rischio di limitazioni fisiche e comorbidità (101) (**Figura 4**).



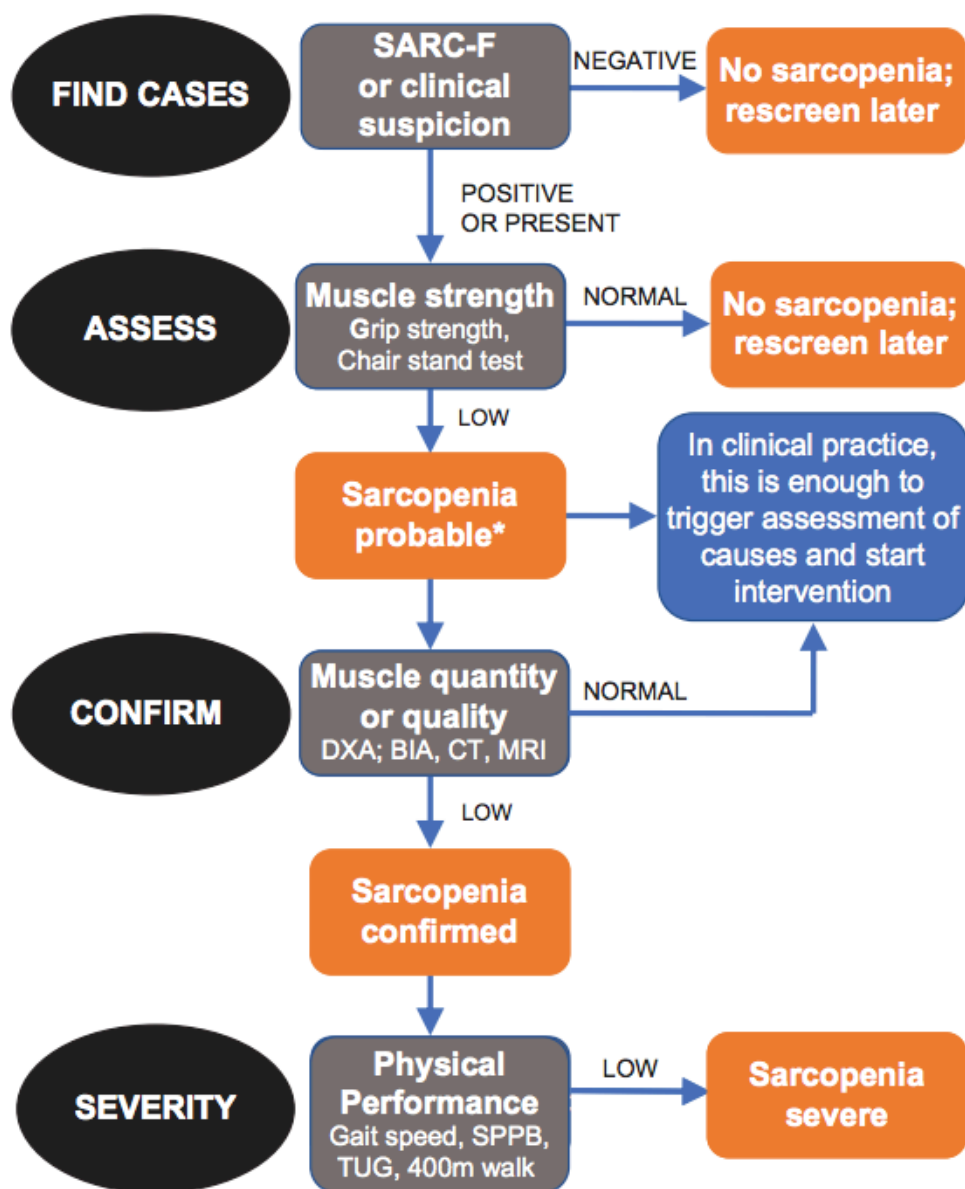
**Figura 4.** Cambiamenti legati all'età nel muscolo scheletrico. In entrambi, con l'avanzare dell'età, si verifica una notevole perdita di massa muscolare e di volume, a cui si associa, nel tessuto muscolare, la perdita e l'atrofia delle fibre muscolari. La progressiva diminuzione della funzionalità contrattile del tessuto muscolare è associata all'accrescimento del tessuto adiposo e fibrotico. Queste alterazioni, insieme alla progressiva perdita di motoneuroni innervanti e a quella dei capillari, contribuiscono all'invecchiamento e alla perdita di forza, potenza e resistenza muscolare.

La principale alterazione del muscolo scheletrico associata all'invecchiamento è l'atrofia muscolare, definita da una progressiva perdita di massa muscolare che inizia intorno ai 40 anni ed è stimata dell'8% per decade fino ai 70 anni, successivamente aumenta al 15% per decade. L'area della sezione trasversale del muscolo può ridursi fino al 30% dai 20 ai 70 anni ed è associata inoltre a un accumulo di grasso all'interno del muscolo (102). I cambiamenti morfologici del muscolo scheletrico associati all'invecchiamento non comprendono solo una riduzione dell'area e del volume della sezione trasversale muscolare, ma anche un rimodellamento dell'architettura muscolare stessa. Attraverso metodica ecografica è stato osservato che, sia la lunghezza dei fasci di fibre muscolari, che il loro angolo di inserzione nell'aponeurosi tendinea diminuivano nel gastrocnemio di anziani con l'invecchiamento (103). La

diminuzione della lunghezza dei fasci implica una perdita di sarcomeri in serie e quindi una perdita di velocità di accorciamento muscolare, mentre la diminuzione dell'angolo riflette una perdita di sarcomeri in parallelo e quindi di forza. Poiché la potenza è il prodotto di forza e velocità tali cambiamenti giocano un ruolo nella perdita di forza e potenza muscolare tipica dell'invecchiamento (104).

## 2. SARCOPENIA

La sarcopenia è attualmente definita come perdita di forza muscolare e della quantità o qualità muscolare legata all'invecchiamento (105). Questa malattia è stata riconosciuta dal Organizzazione Mondiale della Sanità nel 2016 e il suo rischio aumenta con l'età (105). Dopo i 50 anni, c'è una perdita dall'1 al 2% all'anno nella massa muscolare e dall'1,5 al 5% all'anno nella forza muscolare (106). Si stima che nel 2060, la popolazione sopra i 65 anni potrà rappresentare fino a un terzo della popolazione. La prevalenza della sarcopenia differisce tra i diversi studi a seconda della popolazione considerata e per la mancanza di uniformità nelle definizioni e nei cut-off di normalità utilizzati con valori variabili dal 5 al 50% e maggiore prevalenza (cioè il 50%) dopo 80 anni ed oltre (106). A partire dal 2010 e poi più recentemente sono state introdotte e implementate dal EWGSOP le Linee Guida per la diagnosi e la stadiazione della sarcopenia (105) (**Figura 5**).



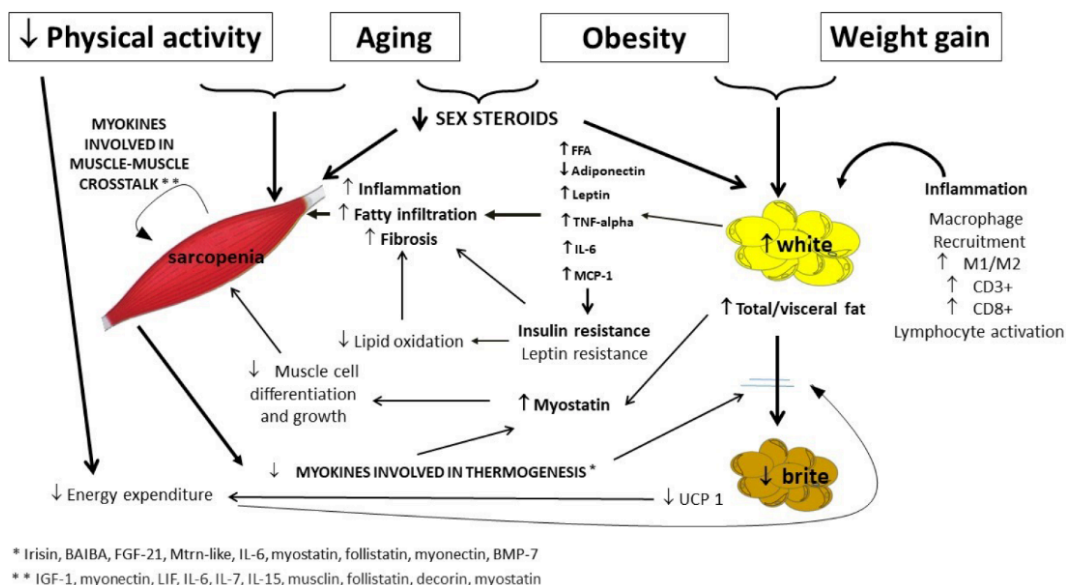
**Figura 5.** Sarcopenia: algoritmo EWGSOP2 per la ricerca di casi, la diagnosi e valutazione della gravità nella pratica clinica. Sono rappresentate le tappe del percorso come Trova-Valuta-Conferma. Gravità (F-A-C-S). \* Considera altri motivi per una forza muscolare ridotta (ad es. depressione, ictus, disturbi dell'equilibrio, disturbi vascolari periferici).

La sarcopenia è associata ad un aumentato rischio di cadute e fratture, una ridotta capacità di svolgere le attività della vita quotidiana, malattie cardiovascolari, malattie respiratorie, disturbi cognitivi, bassa qualità della vita, perdita di indipendenza, morte e un aumentato rischio di ricovero e costi sanitari (105).

La sarcopenia viene classificata in primaria e secondaria. La sarcopenia primaria è direttamente correlata all'età (105). In primo luogo, l'invecchiamento umano del muscolo scheletrico determina una ridotta capacità e attività contrattile delle fibre muscolari (106) che riduce le capacità di resistenza (105). Inoltre, con l'età il tessuto magro diminuisce e la massa grassa viene ridistribuita con meno grasso sottocutaneo e più grasso viscerale (107). Pertanto, vi è una progressiva infiltrazione di grasso nel muscolo con l'età che colpisce l'area della sezione trasversale (107) e influenza la qualità muscolare (108). Esistono altri meccanismi che spiegano la sarcopenia negli anziani tra cui la diminuzione dell'ormone della crescita e del fattore di crescita insulino-simile 1 (IGF1) che influenzano la composizione corporea (108). Inoltre, con l'età si ha una modificazione della composizione del muscolo con preservazione della fibre di tipo I (ossidative) e perdita delle fibre di tipo II (glicolitiche) (108).

La sarcopenia è considerata secondaria quando è associata ad un'altra malattia come una malattia infiammatoria sistemica (es. tumori maligni, insufficienza d'organo, diabete, artrite reumatoide, obesità) ma anche ad altri fattori come la malnutrizione (tra cui anoressia, malassorbimento, accesso limitato al cibo) (105).

La coesistenza di adiposità eccessiva e bassa massa muscolare o funzione viene definita come obesità sarcopenica (109). Come la sarcopenia, la prevalenza dell'obesità sarcopenica aumenta con l'età (109). La qualità muscolare è alterata a causa dell'infiltrazione di grasso all'interno del muscolo che si verifica di per sé con l'obesità (105) ma anche con l'invecchiamento (107). L'infiltrazione del tessuto muscolare da parte del grasso, denominata lipotossicità sembra essere uno dei fenomeni alla base della fisiopatologia dell'obesità sarcopenica; questo fenomeno della lipotossicità può essere in parte spiegato dalla disfunzione che si verifica nel tessuto adiposo bianco con l'obesità e l'invecchiamento stessi (110) (**Figura 6**).



**Figura 6.** Patogenesi dell'obesità sarcopenica nell'anziano, con particolare attenzione al crosstalk muscolare e del tessuto adiposo. Link più rilevanti in grassetto. FFA, acidi grassi liberi; TNF-alfa, fattore di necrosi tumorale-alfa; IL-6, Interleuchina-6; MCP-1, proteina-1 chemiotattica dei monociti; UCP-1, proteina di disaccoppiamento 1.

### 2.1. Patogenesi dell'atrofia muscolare

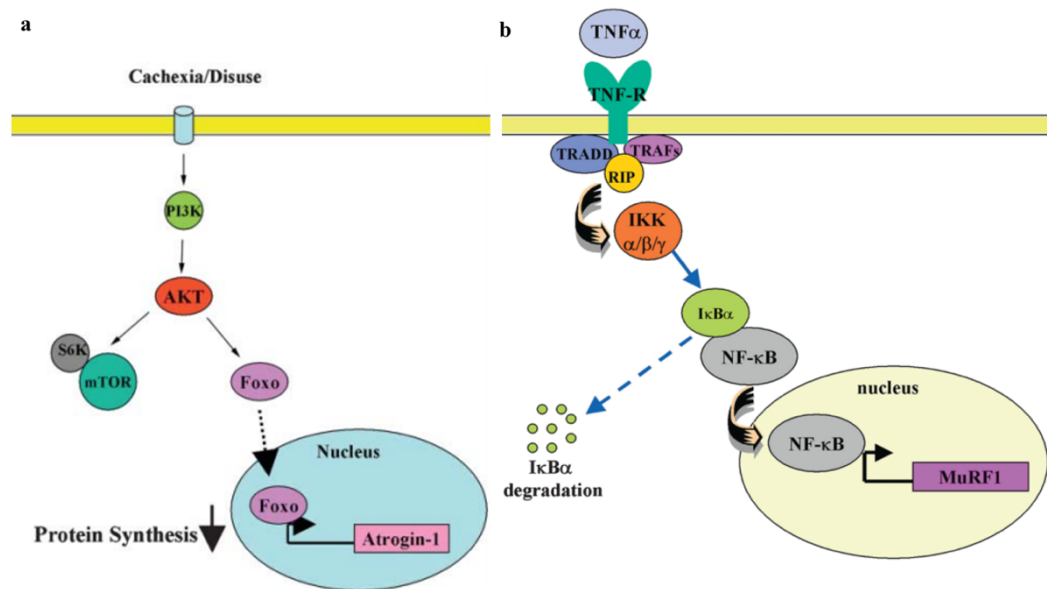
Diversi meccanismi sono stati proposti alla base dell'atrofia muscolare, tra cui un'eccessiva degradazione proteica, aumentati livelli di apoptosi e stress ossidativo nei miociti, denervazione delle fibre muscolari e ridotto numero di cellule satelliti (110,111).

Con l'invecchiamento si assiste a una graduale perdita di fibre muscolari, in particolare, con l'età tendono a diminuire le fibre muscolari a contrazione rapida di tipo II che morfologicamente appaiono più piccole. La diminuzione delle fibre di tipo IIB (o IIX) è maggiore di quella delle IIA, e questo potrebbe spiegare la maggiore perdita in termini di potenza muscolare tipica degli anziani ed evidente in una loro maggiore difficoltà nell'esecuzione di movimenti rapidi (112).

La perdita di massa muscolare e forza, soprattutto quando avviene rapidamente, risulta primariamente da una eccessiva degradazione proteica che spesso è accompagnata anche da una riduzione nella sintesi. In diversi stati catabolici, infatti, sono coinvolte molteplici vie di segnalazione intracellulare che stimolano l'espressione degli atrofici (come MuRF-1 e Atrogin-1), che, a loro

volta, favoriscono la degradazione proteica attraverso il proteasoma e l'autofagia. Nel muscolo tali effetti catabolici sono mediati da fattori di trascrizione come FoxO, NF- $\kappa$ B e SMAD2/3, che vengono attivati da stimoli extracellulari, come l'aumento di glucocorticoidi o la miostatina, un inibitore autocrino di crescita muscolare, o da una diminuzione della via PI3K/Akt/mTOR (113). Inoltre, è stata dimostrata, nell'anziano, una significativa riduzione dell'inibizione della proteolisi indotta dall'insulina e una riduzione dell'attivazione di Akt-protein kinase B (PKB) con riduzione della sintesi proteica muscolare (114,115) (**Figura 7a, 7b**).

**Figura 7.** Atrofia muscolare indotta **a**, da FoxO attraverso l'attivazione di Atrogin-1; **b**, da NF- $\kappa$ B attraverso l'attivazione di MuRF1.



Un'altra potenziale causa di atrofia muscolare nell'invecchiamento è un aumentato tasso di apoptosi dei miociti, condizione associata anche ad un'alterazione della funzione mitocondriale, in seguito a danno ossidativo. I mitocondri possono indurre l'apoptosi dei miociti attraverso percorsi caspasi-dipendenti (via intrinseca) o indipendenti (via estrinseca) (116). Con l'invecchiamento, la via caspasi-indipendente, attraverso il fattore inducente l'apoptosi e l'endonucleasi G, gioca un ruolo più rilevante nella perdita del muscolo scheletrico, rispetto all'apoptosi mediata dalla caspasi, attraverso il citocromo C e Bax/Bcl2. Anche lo stress ossidativo è un importante stimolo pro-apoptotico,



responsabile di alterazioni dell'equilibrio tra sintesi e degradazione proteica, disfunzione mitocondriale e induzione dell'apoptosi attivando la caspasi-2 (117). Un'altra conseguenza della disfunzione mitocondriale associata all'età è il declino della bioenergetica cellulare, che comprende la riduzione del consumo di ossigeno e della sintesi di ATP. Esiste, infatti, una correlazione tra il rapporto sintesi di ATP/consumo di ossigeno e la velocità di deambulazione nell'anziano sano, che è un criterio utilizzato per la diagnosi di sarcopenia. La carenza di ATP, infine, si riflette sulla diminuzione di sintesi proteica, e sulla bioenergetica e anabolismo muscolare (118).

Si è visto che anche i cambiamenti delle cellule satelliti sono importanti nella regolazione dell'atrofia muscolare. Le cellule satelliti sono cellule miogeniche mononucleate quiescenti Pax7+ e CD56+, situate tra il sarcolemma e la membrana basale delle fibre muscolari a differenziazione terminale. Normalmente sono quiescenti nel muscolo adulto e agiscono come popolazione di riserva in grado di proliferare in risposta a lesioni e di rigenerare il muscolo, grazie alle loro proprietà staminali (119). L'invecchiamento è associato a una riduzione nel contenuto di cellule satelliti soprattutto nelle fibre di tipo II. Questo è evidente quando espresso come numero di cellule satellite per fibra muscolare o per area di fibra muscolare. Il contenuto di cellule satelliti è fortemente associato al mantenimento delle miofibre ed è stato ipotizzato che la riduzione età-correlata del contenuto di cellule satelliti possa rappresentare un fattore importante nella perdita specifica e nell'atrofia delle fibre muscolari con l'invecchiamento (120). Le cellule satelliti invecchiate, inoltre, hanno una maggiore tendenza a convertirsi in una linea fibrogenica sotto il controllo della via di Wnt e presentano iperespressione di TGF- $\beta$ 2, favorendo lo sviluppo della fibrosi a livello del tessuto muscolare, che aggrava ulteriormente la riduzione della funzionalità del tessuto con ridotta performance e funzioni contrattili (121). È stato osservato, infatti, che le cellule miogeniche di animali anziani mostrano importanti alterazioni nel livello di espressione di molti geni dipendenti dall'attivazione della via di segnalazione del TGF- $\beta$ , tra cui PAI-1, fibronectina e CTGF che partecipano alla deposizione di tessuto connettivo. La sovraespressione dei geni regolati dal TGF- $\beta$ , quindi, può svolgere un ruolo importante nell'aumento della fibrosi muscolare tipica dell'invecchiamento (122).

Anche modificazioni nella matrice extracellulare del muscolo scheletrico, fondamentale per la trasmissione della forza e per la risposta elastica passiva del muscolo scheletrico, partecipano alla patogenesi dell'atrofia muscolare. Infatti, l'aumento delle fibre collagene e alterazioni nei legami crociati del collagene con accumulo di prodotti finali di glicazione avanzata, determinano aumento della rigidità e compromissione della forza generata dalla contrazione delle fibre muscolari (123).

Anche modificazioni nel sistema neuromuscolare, in particolare nella coordinazione motoria, nell'accoppiamento eccitazione-contrazione e nell'integrità scheletrica, si associano al declino delle prestazioni fisiche tipiche dell'invecchiamento. L'atrofia della miofibrilla di tipo II e una riduzione del contenuto di cellule satelliti potrebbero essere causate esse stesse da una diminuzione dell'input neuronale (124). È stato dimostrato, infatti, che gli anziani presentano un deficit del 20% nell'attivazione nervosa volontaria dei muscoli flessori del polso (125). Altri cambiamenti che si verificano nell'invecchiamento nel sistema neuromuscolare includono la riduzione dell'eccitabilità corticospinale e la perdita di motoneuroni, in termini di numero e dimensione; tale perdita è stata osservata nei soggetti sarcopenici e porta a una riduzione della funzione muscolare, quindi è considerata importante nella patogenesi della sarcopenia (110,126).

### **III. LE VESICOLE EXTRACELLULARI**

#### **1. DEFINIZIONE, STRUTTURA, CONTENUTO, RUOLI**

Le vescicole extracellulari (EV) sono nano-vescicole derivate da lipidi e rilasciate da una grande varietà di cellule (127,128). Sono delimitate da un doppio strato lipidico e contengono al loro interno un nucleo non funzionale (129). Sono costituite da proteine, lipidi, acidi nucleici come l'acido desossiribonucleico (DNA) e acidi ribonucleici (RNA) specifici derivanti dalla cellula sorgente (129). I ruoli principali delle EV sono l'eliminazione di composti inutili per la cellula e la comunicazione inter-organo in condizioni fisiologiche e patologiche (130). In base alla loro biogenesi, alla loro composizione ed alle loro dimensioni, si riconoscono

tre sottogruppi principali di EV: esosomi, le microparticelle o ectosomi ed i corpi apoptotici. Si è visto che i muscoli ed il TA probabilmente rilasciano tutti e tre questi tipi di vescicole.

Le EV provengono dall'endosoma o dalla membrana plasmatica (131). Le EV sono chiamate microvescicole quando vengono rilasciate attraverso il germogliamento verso l'esterno della membrana plasmatica (130) mentre prendono il nome di esosomi quando il processo inizia con il germogliamento interno della membrana endosomiale. Nel processo di formazione degli esosomi, il germogliamento all'interno della membrana è seguito dalla formazione di corpi multi-vescicolari all'interno dell'endosoma che fondendosi tra loro, determinano il rilascio verso l'esterno del loro contenuto (130). Le ceramidi contribuiscono alla formazione degli esosomi; infatti, quando la loro membrana è arricchita di ceramidi, aumentata anche l'attività di secrezione esosomica consentendo una maggiore costruzione all'interno di corpi multi-vescicolari (130). I corpi apoptotici (AB) sono generati dallo smontaggio della cellula apoptotica attraverso una sorta di contrazione della membrana (132).

L'assorbimento delle EV può essere effettuato da diversi tipi di endocitosi, inclusa l'endocitosi mediata da clatrina, l'endocitosi mediata da caveolina, l'endocitosi mediata da zattera lipidica, la pinocitosi e la fagocitosi (130). Un altro processo comporta la degradazione delle EV da parte della metalloproteinasi della matrice sulla superficie cellulare a cui segue il legame delle parti costitutive ad un recettore che media la segnalazione cellulare (133). La modalità di assorbimento dipende dal tipo di cellula ed il suo stato fisiologico e questo determinerà anche l'effetto funzionale.

## 2. CLASSIFICAZIONE, ESTRAZIONE E CARATTERIZZAZIONE

Esistono diverse classificazioni delle EV (principalmente basate sulla dimensione e sulla biogenesi). I tipi di EV più comuni in letteratura sono: le microvescicole (dimensione: 50-10000 nm), gli esosomi (dimensione: 30- 150 nm) e i corpi apoptotici (dimensione: 800-5000 nm) (130). Dal momento che le dimensioni si sovrappongono e la biogenesi è difficile da valutare (129), si

definiscono invece grandi/medie vescicole, le micro-vescicole con diametro > 200 nm e piccole vescicole quelle con diametro < 200 nm. Un altro modo per classificare le EV è di utilizzando alcuni marcatori specifici come le tetraspanine (cluster di differenziazione 9 (CD9), CD63, CD81), vALG-2 Interacting protein X (ALIX), ceramide, syntenin-1 e syndecan per gli esosomi; ADP-Fattore di robosilazione 6 (ARF6), il complesso di istocompatibilità maggiore 1 (MHC1), integrina  $\beta$ 1 e proteina di membrana associata alla vescicola (VAMP3) per le micro-vescicole (130); fosfatidilserina per corpi apoptotici (132). Tuttavia, esistono discrepanze relative a questi marcatori con una significativa sovrapposizione tra i diversi sottotipi (133).

L'ultracentrifugazione differenziale è la tecnica di isolamento più comune per i veicoli elettrici dal 2015 (133). Esistono varie altre tecniche come i gradienti di densità, l'esclusione delle dimensioni cromatografia, precipitazione, filtrazione e immunisolamento (tabella 4) (134). La scelta del metodo di isolamento dipende dal tipo e dal volume del campione (129). Il problema principale dell'isolamento delle EV è la contaminazione con strutture macromolecolari non vescicolari come lipoproteine, apolipoproteine, albumina e proteine aggregate (129).

Ad ora non esiste un metodo gold standard per caratterizzare le EV (129). Morfologicamente, la microscopia elettronica a trasmissione (TEM) è la tecnica più utilizzata per lo studio delle EV perché dimensione e morfologia possono essere determinate contemporaneamente (135). Il *Western blot* (WB) può rilevare la quantità totale di proteine ed è in genere eseguito da un mezzo condizionato (CM) (129). Altre tecniche che possono essere utilizzate per caratterizzare le EV sono la citometria a flusso diretta e la proteomica ma questi metodi richiedono un'attrezzatura specifica (135). Oltre alla quantificazione delle proteine, anche altre molecole contenute all'interno delle EV possono essere caratterizzate come ad esempio lipidi o RNA (129). Ad esempio, in condizioni fisiologiche, le EV sembrano arricchite con alcuni lipidi come sfingomieline, colesterolo, fosfatidilserina e ceramidi mentre la fosfatidilcolina e il diacilglicerolo sono diminuite (130).

#### **IV. IL CROSS-TALK TRA IL TESSUTO ADIPOSO LE MUSCOLARE**

Storicamente, si pensava che la comunicazione tra le cellule potesse essere mediata dal contatto cellula-cellula o dalla secrezione di molecole nell'ambito extracellulare, principalmente citochine, una vasta famiglia di piccole proteine secrete, che possono esercitare effetti autocrini, paracrini ed endocrini su molteplici tessuti. Accanto alle citochine, recentemente è stato scoperto che le cellule dei tessuti, incluso il TA e quello muscolare, possono rilasciare informazioni incorporate all'interno di nanovesicole derivate dai lipidi, che possono modulare il fenotipo e l'omeostasi delle cellule riceventi, mediante un percorso indipendente da quello delle citochine. Alcuni studi hanno anche dimostrato che le EV partecipano alla patogenesi di malattie metaboliche, pertanto, la comprensione del messaggio veicolato da questi vettori è molto importante ed è sempre più oggetto di studi ed interesse (136) (110).

L'interesse per le EV è aumentato nelle malattie metaboliche perché potrebbero essere utilizzate come biomarcatori o anche come bersagli terapeutici (133). Le malattie metaboliche contengono un gruppo di fattori di rischio per le malattie cardiovascolari tra cui iperglicemia, dislipidemia, ipertensione, obesità ed insulino-resistenza (133). La produzione ed il rilascio di EV dal TA bianco aumenta in condizioni di aumento della pressione sanguigna, ridotta tolleranza al glucosio, iperlipidemia, ipossia, infiammazione e obesità (137). Tuttavia, durante la sindrome metabolica, i tessuti sono esposti a un mix di EV di diversa origine quindi è difficile analizzare il contributo specifico di ogni sottoinsieme di EV *in vivo* (110,133).

### 1. Il ruolo delle adipochine nel cross-talk

La prima evidenza di un legame tra il TA bianco ed il muscolo nasce dal fatto che alterazioni muscolari sia in termini quantitative che qualitative si osservano sia in caso di carenza che di eccesso di TA bianco.

Il danno muscolare può essere correlato all'eccesso od alla disfunzione del TA bianco responsabile di una eccessiva produzione di FFA da parte degli adipociti ipertrofici. Gli FFA possono accumularsi all'interno e tra le fibre muscolari portando a disfunzione mitocondriale, aumento della produzione di radicali liberi durante l'ossidazione dei FFA e accumulo di lipidi reattivi nel muscolo con

conseguente danno da lipotossicità, un processo legato all'insorgenza di insulino-resistenza, sarcopenia ed obesità sarcopenica. Inoltre, le adipochine producono diversi effetti sul muscolo scheletrico influenzando la sensibilità insulinica, l'anabolismo ed il catabolismo proteico (110).

La leptina, una delle adipochine circolanti più abbondanti rilasciate dal SAT, determina proliferazione dei miociti, induce l'espressione di alcuni fattori miogenici e può anche sopprimere la miostatina agendo come un regolatore negativo della crescita muscolare. Miotubi C2C12 esposti alla leptina hanno mostrato un'aumentata sintesi proteica, una ridotta degradazione delle proteine ed un incremento della proliferazione dei mioblasti. Tuttavia, in caso di obesità, invecchiamento e malattie croniche, l'iperleptinemia può indurre resistenza alla leptina, con conseguente limitazione dell'ossidazione degli FFA muscolari riducendo gli effetti positivi della leptina sui muscoli (110).

L'adiponectina è un altro peptide secreto dagli adipociti con proprietà antinfiammatoria e sensibilizzazione all'insulina ed è anche espressa dalle cellule muscolari scheletriche. Essa aumenta l'ossidazione degli FFA e l'assorbimento del glucosio nel muscolo ed inibisce la gluconeogenesi epatica. Si è visto che l'attività aerobica ad alti livelli aumenta i livelli plasmatici di adiponectina ed aumenta l'espressione del suo recettore nel muscolo scheletrico di soggetti gravemente obesi (110).

Anche il TA bruno è noto essere un organo secretore di diversi fattori, chiamati batochine, fra cui si annoverano le prostaglandine, endotelina, IL-6, fattore di crescita dei fibroblasti-21, miostatina e CXCL14, che contribuiscono all'imbrunimento del TA. I preadipociti di topi carenti di miostatina hanno mostrato un aumento della propensione a differenziarsi in cellule di grasso bruno secernenti CXCL14, portando a termogenesi adattativa tramite il reclutamento di macrofagi M2, migliorando anche l'attivazione del TA bruno (110).

## 2. Il ruolo delle miochine nel cross-talk

Molte miochine sono mediatori endocrini chiave nel metabolismo del glucosio e dei lipidi, specialmente in risposta all'esercizio, attraverso il crosstalk

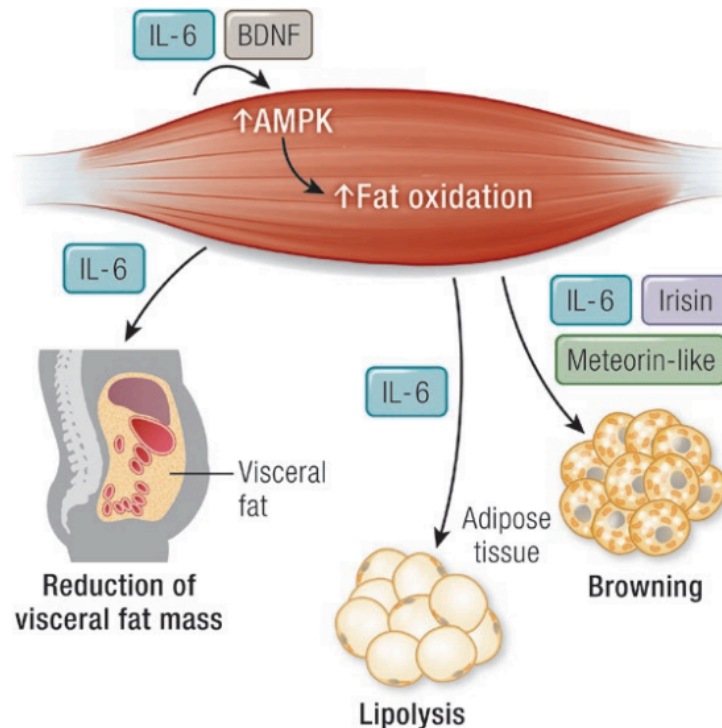
con altri tessuti, incluso il TA bianco. IL-6 è nota per aumentare la lipolisi ed il rilascio di acidi grassi dal TA (138).

L'irisina è una delle miochine di maggior interesse, prodotta in risposta alla contrazione muscolare e secreta dopo la scissione della forma intracellulare FNDC5. Essa influenza l'omeostasi energetica, e potrebbe essere un regolatore chiave nel metabolismo degli adipociti, agendo da ponte tra l'esercizio e l'omeostasi metabolica. L'irisina è stata proposta come il principale mediatore nell'imbrunimento del TA bianco ed è un attivatore della termogenesi, che promuove un aumento del dispendio energetico, prevenendo così l'accumulo di grasso (110,138).

La mionectina, come con l'irisina, sarebbe prodotta in risposta alla contrazione muscolare e parrebbe regolare l'assorbimento dei FFA negli adipociti in vitro. Inoltre, la sua trascrizione nelle cellule muscolari in vitro può essere sovraregolata con l'aggiunta di acidi grassi liberi (*free fatty acids*, FFA) e glucosio, suggerendo un ruolo nella comunicazione tra muscolo e TA (110,138).

Prove recenti suggeriscono che diverse miochine possono inoltre indurre l'imbrunimento del TA bianco, quindi aumentare la spesa energetica globale. Infatti, fattori circolanti indotti dall'esercizio ("exerkines") sarebbero in grado di modulare l'attivazione del TA bruno e l'imbrunimento del TA bianco attivando la proteina di disaccoppiamento 1 (UCP-1). L'espressione di UCP1 è modulata da PGC-1 $\alpha$ , che dipende a sua volta da diverse miochine fra cui irisina, acido  $\beta$ -aminoisobutirrico, miostatina, follistatina, decorina, meteorina-simile, IL-6.

Inoltre, la regolazione della via PI3K-AKT e l'espressione di UCP1 nel TA bruno sono sovregolate dall'irisina (110,138) (**Figura 8**).



**Figura 8.** Le miochine e l'imbrunimento del TA bianco. IL-6 stimola la lipolisi e diminuisce la massa grassa viscerale. Irisin, meteorin-like e IL-6 hanno un ruolo nella "imbrunimento" del tessuto adiposo bianco. IL-6 e BDNF stimolano l'attivazione di AMPK. AMPK: protein chinasi attivata da 5'-AMP, BDNF: fattore neurotrofico derivato dal cervello.

### 3. Il ruolo delle adipo-miochine e micro-rna nel cross-talk

Esiste, inoltre, una sovrapposizione tra miochine e adipochine. Infatti, diverse citochine, chiamate le adipo-miochine, sono secrete sia dalle cellule muscolari che dagli adipociti, confermando l'esistenza di una forte interazione tra muscolo e TA.

Tra queste, la miostatina, noto come inibitore della differenziazione e della proliferazione dei miociti, è una delle principali adipomiochine sinora caratterizzate. La miostatina è sovregolata nei modelli animali di obesità e livelli elevati di miostatina sono stati osservati in soggetti obesi. Biopsie muscolari



raccolte da donne obese, hanno mostrato che esiste una forte correlazione tra l'espressione genica della miostatina, il BMI e l'insulino-resistenza. A parte i suoi effetti sul metabolismo e sul trofismo muscolare, la miostatina ha anche dimostrato essere un regolatore positivo dell'adipogenesi. Con l'avanzare dell'età, livelli aumentati di miostatina possono portare alla riduzione dell'invecchiamento della massa muscolare. Questo effetto potrebbe essere accentuato dal possibile ruolo della miostatina nell'inibizione della sintesi di irisina, che contribuisce al declino della massa muscolare, all'aumento della massa grassa, portando alla fine all'insorgenza di obesità sarcopenica. La perdita di miostatina porta a una diminuzione dell'espressione di miR-34a, con successivo aumento dell'espressione di Fndc5, aumentando così l'espressione di geni coinvolti nella termogenesi ed imbrunimento del TA bianco (110).

Anche i micro RNA possono anche essere coinvolti nel cross-talk tra TA bianco e muscolare. È stato descritto un ruolo nella differenziazione e proliferazione dei miociti dei micro-RNA e fra questi sono inclusi miR-133b, miR-133a, miR-208a, miR-208b e miR-486. MiR27 media la comunicazione tra TA e muscolo scheletrico e si è visto che la somministrazione di un analogo di miR-33a ai mioblasti primari di origine animale riduce la proliferazione cellulare mentre la sua inibizione ne stimola un incremento (110).

#### 4. Le extravescicole ed il tessuto adiposo

Le EV sono state recentemente riconosciute come mediatori della comunicazione intercellulare tra gli adipociti ed altri organi tra cui cervello, fegato, muscoli, pancreas, parete vascolare e sistema immunitario come così come all'interno del TA stesso (137). Di conseguenza, le EV di derivazione adiposa hanno dimostrato di regolare la sensibilità e la secrezione di insulina, l'ossidazione dei lipidi, l'appetito ed il peso corporeo (139). Ad esempio, è stato dimostrato che le EV di derivazione adiposa alterano la fosforilazione di Akt negli adipociti *in vitro* portando così ad insulino-resistenza (137). Inoltre, le EV di derivazione adiposa secrete da grandi adipociti possono indurre infiammazione (137). Bisogna tuttavia sottolineare come le EV sono secrete da tutti i tipi di cellule all'interno del TA (139).

Sono stati proposti diversi marcatori per le EV di derivazione adiposa fra cui perilipina 1, adiponectina, resistina e proteina legante gli acidi grassi 4 (FABP4) (139). Perilipina 1 è una proteina specifica per gli adipociti che riveste le goccioline lipidiche (19) e regola la lipolisi (140). L'ipertrofia degli adipociti, associata ad elevata produzione e rilascio di EV, è caratterizzata dall'espressione di perilipina 1 (133) in quanto la composizione fosfolipidica delle EV secreta dal TA bianco è simile a quella della membrana plasmatica degli adipociti (137). Le EV di derivazione adiposa mediano il legame tra adiposità ed insulino-resistenza nei tessuti periferici sensibili all'insulina come muscolo, pancreas, fegato e TA bianco stesso (131). Sembra che le EV modulino la via di segnalazione dell'insulina nel muscolo portando a indurre insulino-resistenza durante l'obesità (131). La concentrazione delle EV di derivazione adiposa dipende dalle dimensioni degli adipociti (137). Sfortunatamente, ci sono poche informazioni su come venga distribuito il contenuto delle EV derivate dagli adipociti alle cellule muscolari e della loro azione sul loro metabolismo.

## **SCOPO DELLO STUDIO**

Lo scopo di questo studio *in vitro* è stato quello di indagare il cross-talk tra adipociti e miociti, valutando le modificazioni morfologiche e funzionali che si verificano in miociti C2C12 dopo trattamento con medium condizionato proveniente da adipociti 3T3L1 in diverse condizioni sperimentali. In particolare, i miociti sono stati trattati con medium proveniente da adipociti maturi (PID10), da adipociti maturi sottoposti a stress ossidativo (PID10 IR), ad insulino-resistenza ed infine a medium condizionato da adipociti invecchiati (PID18).

Le modificazioni morfologiche e funzionali dei miociti dopo il trattamento sono state valutate in termini di riduzione del differenziamento muscolare, induzione dell'atrofia ed alterata produzione proteica.

Si è voluto quindi verificare la presenza di EV di derivazione adipocitaria ed analizzare le caratteristiche morfologiche delle vescicole provenienti da adipociti nelle diverse condizioni sperimentali.

## **MATERIALI E METODI**

### **I. COLTURE CELLULARI DI ADIPOCITI: CELLULE 3T3L1**

I preadipociti 3T3L1 (ECACC-Sigma-Aldrich) sono stati coltivati a 37°C in 5% CO<sub>2</sub> con terreno DMEM/GlutaMAX (Gibco), contenente Dulbecco's Modified Eagle Medium (D-MEM) e 2mM di L-glutamina, addizionato con FBS 10% e soluzione antibiotica antimicotica all'1% (SIGMA). A una confluenza dell'85-90%, raggiunta il terzo giorno, le 3T3L1 sono state staccate mediante tripsina/EDTA (0,5 mg/ml) (Gibco) e lavate con PBS. Successivamente, le cellule sono state contate e seminate in piastre da 6 wells (30000 cellule per pozzetto) (Becton Dickinson). Due giorni dopo la confluenza, le cellule sono state indotte alla differenziazione con medium DMEM/F12 contenente 10% FBS, 1% soluzione antibiotica antimicotica, 0,2 mM IBMX, 10µM di rosiglitazone, 1µM di desametasone, 1,72 µM di insulina per tre giorni. I giorni di coltura sono definiti *Post Induction Day* (PID) con numeri progressivi a partire dall'esposizione al terreno di differenziamento (PID0). Dopo 72 ore dall'induzione (PID3), il terreno di differenziamento è stato sostituito con un terreno di mantenimento degli adipociti (Adipocyte Mantaining Medium: AMM), composto da DMEM/F12 arricchito con 10% FBS, 1% di soluzione antibiotica antimicotica e 1,72µM di insulina (Sigma), in cui le cellule sono state coltivate per due giorni (PID5). A PID5 le cellule sono state coltivate in un terreno di mantenimento per adipociti contenente concentrazioni fisiologiche di insulina (10nM) per altri tredici giorni cambiando il medium ogni due giorni. Gli adipociti a PID10 sono stati considerati adipociti maturi, mentre a PID18 adipociti invecchiati, in accordo con pubblicazioni precedenti (88,89).

### **II. MEDIUM CONDIZIONATO PER IL TRATTAMENTO DI MIOCITI**

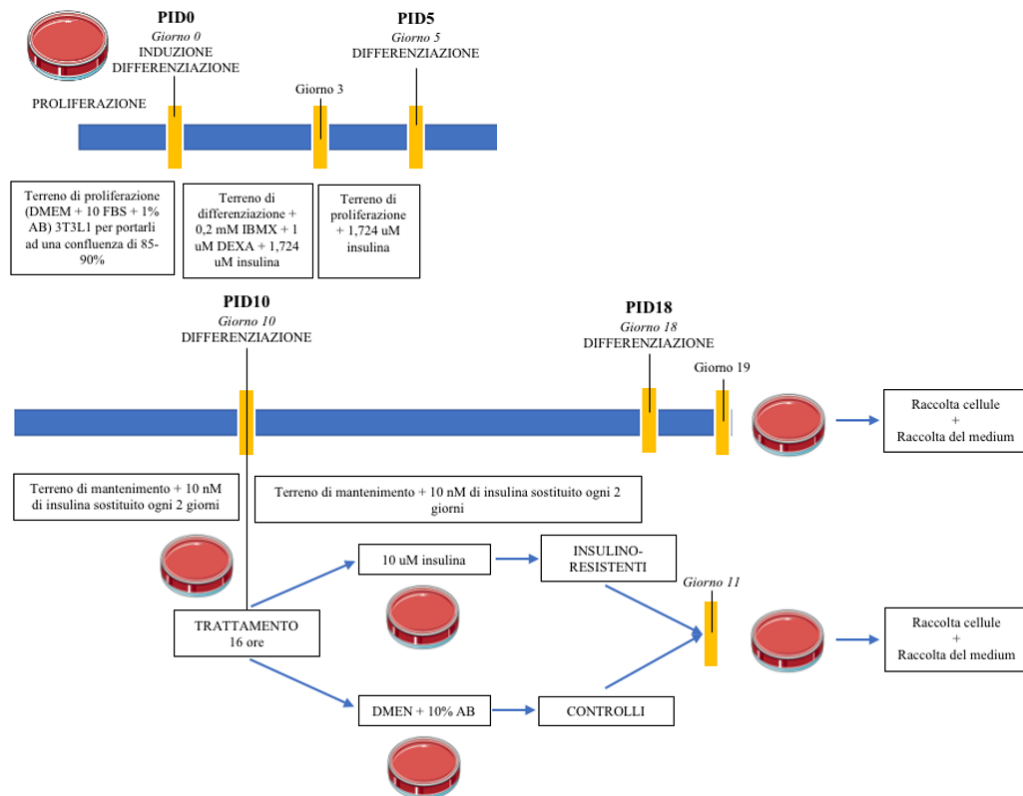
Il medium condizionato (conditioned medium, CM) per il trattamento dei miociti è stato raccolto dalle colture cellulari di adipociti nelle seguenti condizioni sperimentali: adipociti maturi, adipociti invecchiati, adipociti sottoposti a stress ossidativo, adipociti insulino-resistenti.

*Adipociti maturi (PID10).* Le cellule 3T3L1 sono state indotte al differenziamento e sono state considerate mature a PID10, con raccolta di MC in tale fase della coltura cellulare.

*Adipociti invecchiati (PID18).* Le cellule 3T3L1 sono state indotte al differenziamento e sono state coltivate sino a PID18 con raccolta del MC. La coltura *in vitro* di adipociti fino a PID18 è caratterizzata da un aumento della percentuale di cellule senescenti, valutata mediante colorazione SA- $\beta$ -gal e di cellule apoptotiche rispetto alla coltura di adipociti maturi. Inoltre, gli adipociti invecchiati a PID18 presentano diametri ed area maggiori con nuclei periferici più piccoli, una grossa goccia lipidica centrale circondata da quelle più piccole e un maggiore accumulo di ROS rispetto a quelli maturi, come dimostrato in lavori precedentemente pubblicati (89).

*Adipociti sottoposti a stress ossidativo (PID10 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>).* Gli adipociti 3T3L1 differenziati a PID5 sono stati trattati con perossido di idrogeno 150 $\mu$ M (30% w/w in H<sub>2</sub>O, SIGMA) per tre ore per tre giorni consecutivi in terreno DMEM/F12 privo di siero contenente 1% di soluzione antibiotica antimicotica. Dopo il trattamento ciascun pozzetto è stato lavato delicatamente due volte con PBS e addizionato di terreno completo. Il MC è stato raccolto a PID10. Gli adipociti trattati con H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> presentano una senescenza prematura caratterizzata da una modifica della morfologia, un aumento significativo del numero di cellule SA- $\beta$ -gal<sup>+</sup> e di ROS, come dimostrato in lavori precedentemente pubblicati (141).

*Adipociti insulino-resistenti (PID10 IR).* Gli adipociti 3T3L1 differenziati a PID9 sono stati trattati con Insulina (10  $\mu$ M) per 16 ore. Per evitare la presenza di insulina nel medium raccolto per il trattamento dei miociti le cellule sono state lavate con PBS e incubate con medium privo di insulina e siero per 6 ore, con raccolta del medium a PID10. Tale protocollo è stato validato in lavori pubblicati precedentemente in letteratura attraverso la valutazione della fosforilazione di Akt mediata dall'insulina, usata come indice di insulino-sensibilità (142) (**Figura 9**).



**Figura 9.** Caratteristiche delle colture cellulari di adipociti 3T3L1 resi insulino-resistenti. Sono evidenziate le epoche colturali di riferimento per il trattamento con insulina 10 $\mu$ M per 16h (PID10) e per la raccolta del medium condizionato (PID10). PID: post-induction day, DMEM: Dulbecco's Modified Eagle's Medium, FBS: siero bovino fetale; AB: antibiotici (100 U/ml penicillina e streptomycina 100 mg/ml); IBMX: 3-isobutil-1-metilxantina; DEXA: 3-isobutil-1-metilxantina.

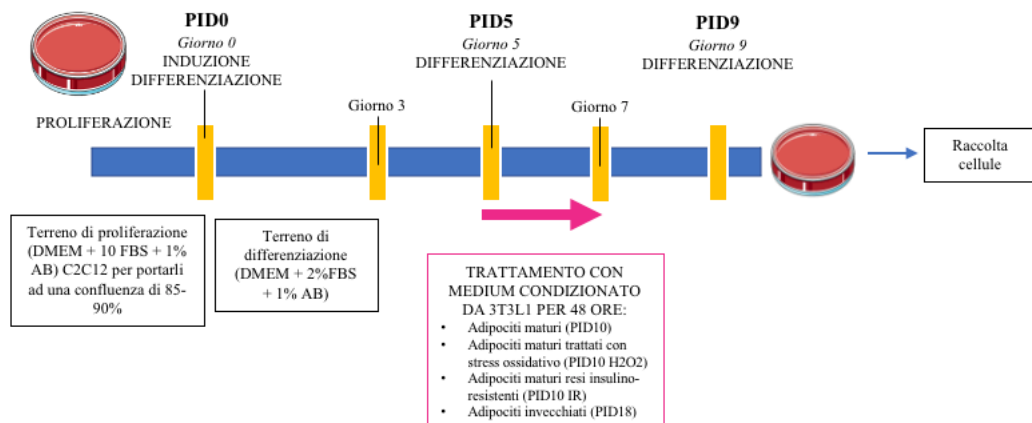
### III. COLTURE CELLULARI DI MIOCITI: CELLULE C2C12

I mioblasti murini C2C12 (ATCC) sono stati coltivati in terreno Dulbecco's Modified Eagle Medium con alto glucosio (DMEM/GlutaMAX) completo, addizionato con 10% FBS e 1% di soluzione antibiotica antimicotica, a 37°C in un'atmosfera costituita da 95% di O<sub>2</sub> e 5% di CO<sub>2</sub>. Le cellule sono state controllate quotidianamente e al terzo giorno, raggiunto l'80% di confluenza, sono state staccate con tripsina/EDTA e colorate con Trypan Blue 0,5% per contare le cellule vitali. Successivamente sono state seminate in piastre da 6 well (Falcon, BD

Bioscience) 48000 cellule per pozzetto contenente un vetrino circolare pre-sterilizzato (Menzel-glaser Thermo Scientific) con medium DMEM/GlutaMAX addizionato con 10% di FBS e 1% di soluzione antibiotica antimicotica. Due giorni dopo la semina, all'80% di confluenza, è stato indotto il differenziamento sostituendo il terreno con terreno di differenziamento DMEM addizionato con 2% FBS e 1% soluzione antibiotica antimicotica. Dopo tre giorni dall'induzione del differenziamento, si è osservata la formazione di miotubi sinciziali. Il differenziamento è stato valutato in microscopia ottica a 0, 3, 5 e 7 giorni.

#### IV. TRATTAMENTO DEI MIOCITI

Il trattamento di miociti con CM da adipociti è stato eseguito a partire dal giorno 5 dall'induzione al differenziamento dei miociti attraverso la sostituzione del 50% del medium di coltura con CM da adipociti a PID10, adipociti invecchiati a PID18, adipociti trattati con H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> e adipociti insulino-resistenti. Sono stati eseguiti due trattamenti consecutivi a PID 5 e PID 7, ciascuno della durata di 48h. Le analisi sono state svolte a PID9 (**Figura 10**).



**Figura 10.** Protocollo per i miociti C2C12. Dopo 10 giorni di differenziamento le C2C12 sono state trattate con terreno condizionato isolato dagli adipociti. DMEM: Dulbecco's Modified Eagle's Medium, FBS: siero bovino fetale, AB: antibiotici (100 U/ml penicillina e streptomicina 100 mg/ml).

## **V. VALUTAZIONE MORFOLOGICA DEI MIOCITI E DETERMINAZIONE DEL DIAMETRO E DELL'INDICE DI FUSIONE**

Dopo il lavaggio con *phosphate buffer solphate* (PBS) 0,1M pH7,4 le cellule sono state fissate per 10 min con formalina tamponata neutra al 10%. Le cellule sono state lavate due volte con acqua bidistillata e colorate con soluzione pronta all'uso di ematossilina di Mayer (Bio-Optica, Milano, Italia) per 1 minuto a temperatura ambiente e quindi lavate nuovamente con acqua bidistillata. I vetrini sono stati trattati con Aqueous Mount Quick Medium (Bio-Optica, Milano, Italia). Le cellule sono state osservate a 200x e a 400x di ingrandimento mediante microscopio EVOS FL Auto Cell Imaging System with EVOS Onstage Incubator (Thermo Fisher Scientific).

Il diametro dei miotubi è stato calcolato su miotubi presenti in 10 immagini scelte random a 400x di ingrandimento per ogni trattamento (> 50 miotubi misurati per condizione).

La valutazione dell'indice di fusione, detto anche indice di formazione dei miotubi, è stata espressa come rapporto dei nuclei nelle cellule multinucleate MyHC-positive con  $\geq 3$  nuclei (miotubi) e il numero totale di nuclei colorati presenti nel campo analizzato. L'indice di fusione è stato calcolato su almeno 1000 nuclei, su 5 immagini a 400x di ingrandimento.

Le immagini sono state acquisite a 200x e a 400x di ingrandimento mediante microscopio EVOS FL Auto Cell Imaging System with EVOS Onstage Incubator (Thermo Fisher Scientific).

Tutte le analisi sono state effettuate utilizzando il software ImageJ versione 1.52o.

## **VI. ESTRAZIONE DI RNA, RETROTRASCRIZIONE ED ESPRESSIONE GENICA (RT PCR, REAL-TIME PCR)**

L'RNA totale è stato estratto utilizzando il miRNeasy Mini Kit (Qiagen) come descritto in precedenza (89). I miociti sono stati prima lisati con Qiashtredder column (Qiagen).

La reazione di retrotrascrizione del cDNA è stata effettuata mediante il First Strand cDNA Synthesis Kit (Origen) utilizzando il seguente protocollo: cinque minuti a 25° C, venti minuti a 46° C e un minuto a 95° C in un termociclatore Ep Gradient S (Eppendorf). La reazione di amplificazione dell'mRNA è stata effettuata con la macchina CFX96 Real-Time utilizzando un SsoAdvanced Universal SYBR Green Supermix (Bio-Rad), secondo il protocollo del produttore. La reazione RT-PCR è stata eseguita in un volume totale di 20 µl amplificando 50 ng di cDNA per 40 cicli nelle seguenti condizioni: cinque secondi a 95 ° C e trenta secondi a 60 ° C. Sono state progettate coppie di sequenze primer specifiche per amplificare un piccolo frammento di DNA (150 bp): MYOD (FW, 5'- ccactccgggac atagacttg-3'; RW, 5'-aaaagcgcaggtctggtgag-3'), MYOGENIN (FW, 5'-ccttgctcagctccctca-3'; RW, 5'-tgggagttgcattcactgg-3'), MHC-IIb (FW, 5'-ctttgcttacgtcagtcaggaag-3'; RW, 5'-agcgcctgtgagcttgtaaa-3'), MYOSTATIN (FW, 5'-ccaggaccaggagaagatgg-3'; RW, 5'-ggattccgtggagtgtcat-3'), ATROGIN-1 (FW, 5'-ctctgtaccatgccgttct-3'; RW, 5'-ggctgctgaacagattctcc-3'), MURF-1 (FW, 5'-tgcctacttgctccttgtgc-3'; RW, 5'-caccagcatggagatgcagt-3'), , CCN-2 (FW, 5'- ccacccgagttaccaatgac-3'; RW, 5'-gtgcagccagaaagctca-3'), COL1A1 (FW, 5'-atgttcagcttgggacct-3'; RW, 5'-cagctgacttcaggatgt-3'), GAPDH (FW, 5'-aacttggcattgtggaag-3'; RW, 5'-acacattggggtaggaaca-3'). GAPDH è stato utilizzato come controllo interno per normalizzare i dati.

I dati RT-PCR sono stati analizzati con il software del sistema ottico Bio-Rad iQ™. I livelli di espressione relativa sono stati calcolati utilizzando la formula  $2^{-(\Delta\Delta Ct)}$ . Ogni analisi è stata condotta almeno in duplicato.

## VII. ANALISI DELLE PROTEINE MEDIANTE WESTERN BLOT

Il Western Blot (WB) è una metodica che consente di identificare e quantificare una specifica proteina in un campione. L'elettroforesi, in condizioni denaturanti, in presenza di sodio dodecil solfato (SDS), è stata eseguita secondo il metodo di Laemmli.

Le cellule sono state risospese nel buffer di lisi Pierce RIPA (ThermoFisher) addizionato con un cocktail di inibitori delle proteasi (completo, Roche Cat.No



11697498001). Per rimuovere il materiale insolubile i campioni sono stati centrifugati a 13000 rpm per 10 minuti a 4°C ed è stato raccolto il surnatante. La quantificazione delle proteine totali è stata effettuata attraverso analisi allo spettrofotometro utilizzando il “Bradford protein assay Bio-Rad. L’assorbanza a 595nm è stata misurata allo spettrofotometro e la concentrazione proteica è stata determinata interpolando i valori così ottenuti con quelli di una curva standard di BSA. Una concentrazione proteica complessiva di 25 µg per ciascun campione è stata caricata in gel-acrilammide SDS al 7,5%. La corsa è stata eseguita nelle seguenti condizioni: 100 V per 90 minuti utilizzando il running buffer allo 0,1% di SDS. Le proteine sono state trasferite dal gel in membrana di Polivinildenfluoruro PVDF (Immobilon P, Millipore, Bedford MA) a 100V costanti mediante il sistema BioRad Mini Protean II TM. Il trasferimento è stato eseguito per un’ora in ghiaccio a 300mA con buffer costituito da: Tris-HCl, pH 8,3 10mM, Glicina 192mM, Metanolo 10%. La membrana è stata incubata per 1 ora a temperatura ambiente, in una soluzione di bloccaggio (BSA (Albumin Bovim Serum, Sigma) 5%, Tris-HCl pH 7,5 10 nM, NaCl 100 mM, Tween 20 0,1%). La membrana è stata quindi incubata per una notte a 4°C in agitazione, con un anticorpo primario monoclonale nella soluzione di bloccaggio. La membrana è stata lavata tre volte per dieci minuti in una soluzione contenente Tris-HCl, pH 7,5 10 mM, NaCl 100 mM, Tween 20 0,1% (TBST). La membrana è stata incubata per 1 ora in agitazione e a temperatura ambiente con l'anticorpo secondario coniugato con una perossidasi, diluito nella soluzione di bloccaggio. La membrana è stata rilavata (3 volte per 10 minuti) dall'anticorpo in eccesso. Le bande sulla membrana sono state rilevate mediante la chemiluminescenza che si sviluppa in seguito alla reazione enzimatica della perossidasi in presenza di acqua ossigenata e luminol. Il kit di rilevazione ECL (ECL Select™ western Blotting Detection Reagent GE Healthcare) è stato utilizzato come substrato secondo le proporzioni consigliate dal fornitore. I complessi antigene-anticorpo che hanno reagito con i substrati sono stati rivelati da Alliance Q9 Advanced chemidoc imaging platform (Uvitec). Gli anticorpi utilizzati sono: anticorpo primario anti-miostatina (Anti- GDF8/Myostatin Antibody rabbit anti-mouse; Abcam. 1:1000), anticorpo primario anti- $\alpha$ -tubulina (Anti- $\alpha$ -tubulin

Antibody rabbit anti-mouse; Cell Signaling. 1:1000) e anticorpo secondario anti-rabbit HRP linked antibody (Cell Signaling. 1:4000).

## **VIII. ANALISI DELLA SINTESI PROTEICA MEDIANTE PUROMICINA CON IL METODO SUNSET**

Per studiare dinamicamente il tasso di sintesi proteica intracellulare è stato utilizzato il saggio della puromicina secondo il protocollo SUnSET (surface sensing of translation), un metodo non radioattivo per misurazioni *ex vivo* e *in vivo* della sintesi proteica. Questa tecnica prevede l'uso dell'antibiotico puromicina (un analogo strutturale del tirosil-tRNA) e di anticorpi anti-puromicina per rilevare la quantità di incorporazione della puromicina nelle catene peptidiche nascenti. È stato dimostrato che l'incorporazione di puromicina nelle proteine nascenti arresta il loro allungamento. Pertanto, la quantità di proteine presenti contenenti puromicina, riflette accuratamente il tasso di sintesi proteica.

Per il saggio con la puromicina è stata preparata una soluzione stock di puromicina (Puromycin, Dihydrochloride, Cell Culture-Tested - CAS 58-58-2 – Calbiochem di SIGMA ALDRICH) 18,4 mM in DMSO e conservata a -20°C (aliquote da 20 µl).

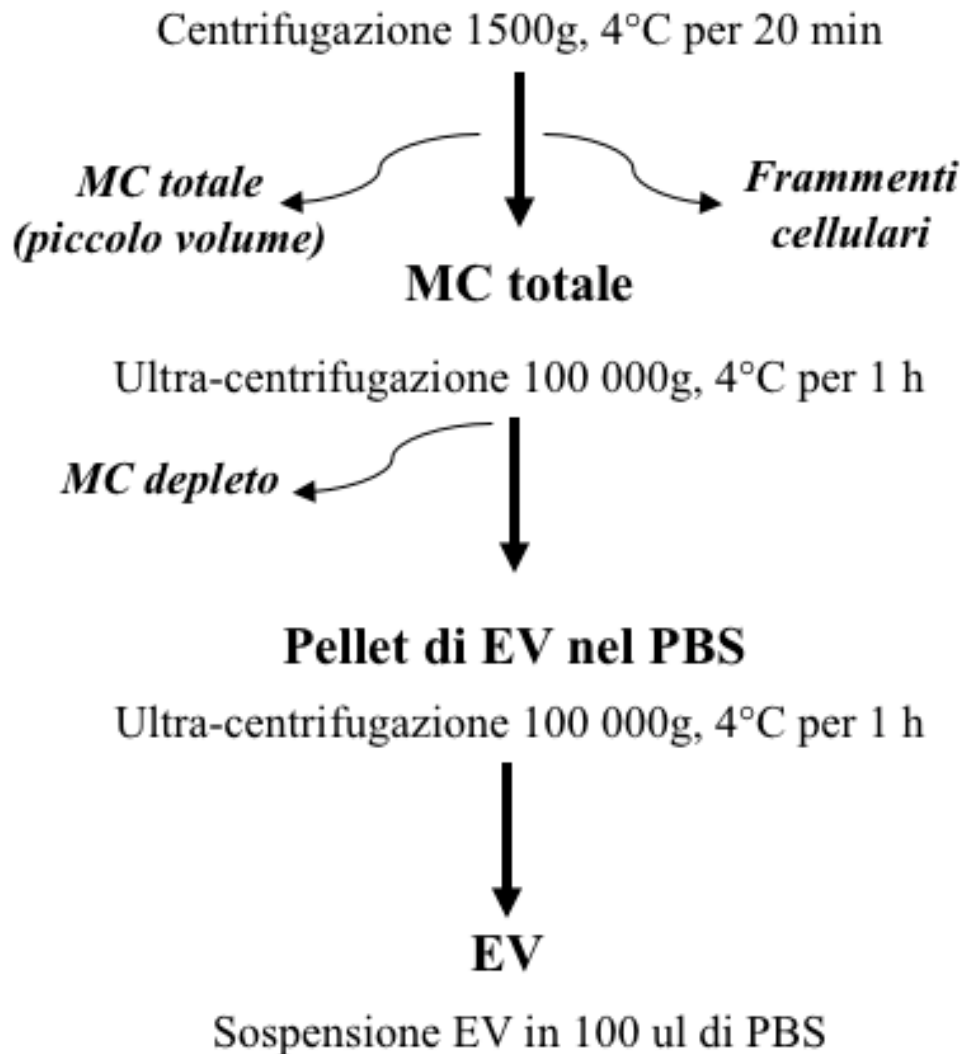
Il giorno dell'esperimento è stata preparata una soluzione di puromicina da 1 mM (20 µl di puromicina 18.4mM + 348 µl di PBS) e questa soluzione è stata aggiunta direttamente in ciascun pozzetto delle piastre a 6 wells contenente le cellule e il medium per ottenere una concentrazione finale di 1 µM. Le piastre sono state quindi incubate per 30 minuti nell'incubatore a 37°C. Il medium è stato rimosso e i pozzetti sono stati lavati due volte con PBS per rimuovere i residui di puromicina non incorporata. Le cellule sono state quindi lisate e sono stati raccolti i campioni proteici. Per l'analisi Western Blot dell'incorporazione della puromicina sono state utilizzate aliquote di 15 µg di proteine totali su un gel al 10%. È stato eseguito il Western Blot secondo il protocollo precedentemente descritto. La membrana è stata trattata con la soluzione bloccante del tipo BSA (bovin serum albumin) al 5% per 1 ora. La membrana è stata incubata per una notte a 4°C con l'anticorpo monoclonale primario di topo IgG2a anti-puromicina (Anti-Puromycin

Antibody, clone 12D10 – cod: MABE343 -, fonte biologica: topo, isotipo IgG2a da SIGMAALDRICH; clone 12D10, 1:5000) disciolto in TBST (tris-buffered saline contenente l'1% di BSA). Il giorno seguente, la membrana è stata lavata per 30 minuti in TBST ed è stata quindi incubata per 1 ora a temperatura ambiente BSA-TBST contenente l'anticorpo secondario anti-topo IgG Fc 2° coniugato con perossidasi di rafano (Perossidasi AffiniPure Goat Anti-Mouse IgG, Fc $\gamma$  sottoclasse 2° specifico – AB\_2338514; 1:50.000; Jackson ImmunoResearch Laboratories Inc., West Grove, PA, USA). La membrana è stata nuovamente lavata per 30 minuti in TBST e sviluppata su pellicola utilizzando il normale reagente di chemiluminescenza potenziata. Una volta catturata l'immagine appropriata, la membrana è stata colorata con Coomassie Blue per la normalizzazione dei risultati e le immagini sono analizzate con ImageJ.

## **IX. SEPARAZIONE DELLE EXTRAVESICIOLE**

Per isolare le EV dal resto del CM degli adipociti, è stata eseguita un'ultracentrifugazione. La prima centrifugazione è stata eseguita a 1.500 g per 20 minuti a 4°C e ha consentito di eliminare i frammenti cellulari. Successivamente, sono stati raccolti 5 ml di surnatante ed il resto è stato distribuito in quattro tubi da 8 ml per ciascuna condizione. La prima ultracentrifugazione è stata avviata a 100.000 g per 1 ora a 4°C. L'intero surnatante è stato raccolto per ciascuna condizione dai quattro tubi corrispondenti e definito medium senza EV (EV-depleted-media, dCM). Le EV sono state quindi sospese in 1 ml di PBS e raccolte in un'unica provetta per condizione prima della seconda ultracentrifugazione a 100.000 g per 1 ora a 4°C. Il PBS è stato rimosso e le EV sono state risospese in

100 µl di PBS per ciascuna condizione precedente e quindi congelate a -80°C (Figura 11).



**Figura 11.** Protocollo di ultracentrifugazione. Dopo una prima centrifugazione a 1500 g, viene recuperato il MC totale, segue una prima ultracentrifugazione a 100 000 g che ci permette di raccogliere il MC depleto. Infine, le EV sono state raccolte dopo la seconda ultracentrifugazione a 100 000 g. EV: vescicole extracellulari, PSB: tampone fosfato salino, MC: medium condizionato.

## X. CONTEGGIO E CARATTERIZZAZIONE DELLE EXTRAVESICOLE

Il rilevamento di impulsi resistivo sintonizzabile (Tunable Resistive Pulse Sensing, TRPS) è una tecnica in cui le particelle sospese in una soluzione

conduttiva passano attraverso a dei nanopori e producono impulsi resistivi. Il nanopore IZON, NP150 è un poro di 150  $\mu\text{m}$  e esso viene allungato manualmente (a 46,01 mm); il tratto è uno dei tre ingressi principali della misura insieme alla pressione e alla tensione. Il sistema di pressione ad aria ha una gamma intorno a 5 kPa e dà la velocità alle particelle. La tensione scelta (0,24 Volt) consente di avere un impulso elettrico contro il quale la maggior parte delle particelle resistono e quindi vengono riconosciute. Prima il campione è stato passato nella macchina TRPS denominata qNano (IZON); la calibrazione della dimensione e della concentrazione sono state effettuate grazie a CPC200 e CPC100 (perline con diametro da 200 a 100 nm, IZON) al fine di garantire la permeabilità dei nanopori. Successivamente, i veicoli elettrici sono stati diluiti a 1:5 in PBS contenente un tensioattivo (0,3% Tween 20) ed il volume finale utilizzato era di 35  $\mu\text{l}$  sopra il nanopore su qNano. Un ulteriore volume privo di EV di 75  $\mu\text{l}$  è stato utilizzato sotto il nanoporo per la migrazione delle particelle. È stata utilizzata anche la soluzione contenente PBS e Tween 20 allo 0,3% per lavare il nanoporo tra ogni campione. Infine, era necessario per l'analisi il passaggio di almeno 500 particelle attraverso il nanoporo. Gli impulsi elettrici emessi dalle particelle corrispondono alla loro dimensione e concentrazione e sono stati calcolati dal programma di controllo dello strumento IZON.

## **XI. VISUALIZZAZIONE DELLE EV TEM**

Il pellet contenente le EV è stato risospeso in 100  $\mu\text{l}$  di PBS sterile e tenuto alla temperatura di +4°C. 6  $\mu\text{l}$  del campione sono stati fatti assorbire per 1 minuto su di una griglia di rame ultrasottile rivestita di carbonio (CF200H-Cu-UL, Electron Microscopy Sciences). L'eccesso è stato rimosso con una asciugatura delicata. La griglia è stata posizionata su 1 goccia di soluzione UranyLess (Electron Microscopy Sciences) per 1 secondo, delicatamente asciugato per rimuovere l'eccesso e poi è stata aggiunta una seconda goccia per 30 secondi. L'eccesso è stato rimosso con una asciugatura delicata. La griglia è stata fatta asciugare all'aria. Le griglie sono state visualizzate con un TEM (Morgagni 268D, FEI Philips) a 80 kV.

## **XII. ANALISI STATISTICA**

I dati sono presentati come medie  $\pm$  deviazione standard (DS) per ogni condizione sperimentale. Un valore  $p < 0,05$  è stato utilizzato per determinare la significatività statistica. I dati sono presentati come media  $\pm$  SD da tre esperimenti indipendenti, fatta eccezione per le EV in cui sono stati analizzati due esperimenti indipendenti. Le differenze tra i gruppi sono state valutate mediante un test non parametrico, il test Kruskal-Wallis per campioni indipendenti con Bonferroni come analisi post-hoc. Tutte le analisi statistiche sono state eseguite utilizzando il pacchetto statistico SPSS.

## **RISULTATI**

### **I. MODIFICAZIONI MORFOLOGICHE DI MIOCITI C2C12 TRATTATI CON MEDIUM CONDIZIONATO DI ADIPOCITI 3T3L1.**

Nello studio *in vitro* la prima caratterizzazione delle cellule miocitarie C2C12 è stata effettuata mediante colorazione con ematossilina eosina per valutare le differenze morfologiche tra i miociti sottoposti a medium condizionato proveniente da adipociti in diverse condizioni colturali, in particolare, da adipociti maturi (PID10), da adipociti sottoposti a stress ossidativo (PID10 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>), da adipociti resi insulino-resistenti (PID10 IR) e da adipociti invecchiati *in vitro* (PID18).

Dal punto di vista morfologico è stato osservato che il diametro dei miotubi diminuiva significativamente rispetto al controllo nelle colture trattate con il medium degli adipociti invecchiati (PID18;  $p < 0,05$ ), adipociti maturi resi insulino-resistenti (PID10 IR;  $p < 0,05$ ) e sottoposti a stress ossidativo (PID10 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>;  $p < 0,05$ ) rispetto ai controlli. Nessuna differenza significativa si rilevava nel diametro di cellule C2C12 trattate con il MC di adipociti maturi a PID10 rispetto al controllo. La diminuzione dei diametri, indicatore di atrofia muscolare, si osservava in particolar modo nel trattamento con medium condizionati provenienti da adipociti

invecchiati o sottoposti a condizioni di stress (stress ossidativo, insulino-resistenza) **(Figura 12)**.

Nelle diverse condizioni sperimentali è stato quindi determinato l'indice di fusione, o indice di formazione dei miotubi, considerato un indicatore della capacità di differenziazione dei mioblasti. L'indice di fusione è risultato significativamente diminuito rispetto al controllo in cellule C2C12 dopo trattamento con il medium condizionato degli adipociti invecchiati (PID18;  $p < 0,05$ ), di adipociti maturi resi insulino-resistenti (P10 IR;  $p < 0,05$ ) e di adipociti maturi sottoposti a stress ossidativo (P10H2O2;  $p < 0,05$ ). Non vi erano differenze significative nell'indice di fusione tra il controllo e il trattamento con il medium di adipociti maturi (PID10) **(Figura 13)**.

## **II. VALUTAZIONE DELLE MODIFICAZIONI DELL'ESPRESSIONE GENICA IN MIOCITI C2C12 TRATTATI CON MEDIUM CONDIZIONATO DI ADIPOCITI 3T3L1.**

Per studiare le modificazioni funzionali dei miociti C2C12 trattati con il medium condizionato degli adipociti 3T3-L1 nelle diverse condizioni sperimentali è stata analizzata l'espressione dell'mRNA di diversi fattori coinvolti nel differenziamento muscolare (MyoD, MyHC-IIb), nell'atrofia muscolare (miostatina, Atrogin-1, MuRF-1) e nella fibrosi muscolare (CCN-2, COL1A1).

Per quanto riguarda l'espressione genica dei due principali marcatori di differenziazione miogenica (MyHC-IIb, MyoD), abbiamo osservato una tendenza verso una ridotta espressione della catena pesante della miosina (MyHC-IIb) e dell'espressione del gene MyoD dopo il trattamento con MC di adipociti invecchiati a PID 18 e anche nelle altre diverse condizioni sperimentali rispetto al controllo. Tuttavia, questa tendenza non ha raggiunto la significatività statistica **(Figura 14)**.

Le vie che regolano l'atrofia muscolare sono state esplorate mediante la valutazione dell'espressione genica degli atrofici Atrogin-1 e MuRF1, coinvolti nel catabolismo muscolare. Entrambi i geni sono stati modulati dopo i diversi trattamenti con mezzo condizionato da adipociti. L'espressione di Atrogin-1 è risultata significativamente aumentata solo nei miociti trattati con MC proveniente

da adipociti resi insulino-resistenti (PID10 IR;  $p < 0,05$ ) rispetto al controllo. La tendenza di Atrogin-1 ad aumentare, è stata osservata nei miociti trattati con MC di adipociti invecchiati (PID 18;  $p = 0,07$ ). Per quanto riguarda MuRF1, la sua espressione ha mostrato una tendenza ad aumentare, seppur in modo non significativo, quando i miociti vengono trattati con MC senescente o da adipociti stressati rispetto a quello di controllo (**Figura 15**).

L'espressione di CCN2 era significativamente aumentata nei miociti trattati col MC ottenuto da adipociti insulino-resistenti (PID 10 IR;  $p < 0,05$ ) rispetto ai controlli, mentre nelle altre condizioni sperimentali è stata osservata solo una tendenza all'aumento di questo gene. Per quanto riguarda l'espressione genica di COL1A1, nei miociti è stato riscontrato un lieve, anche se non significativo, aumento nelle condizioni trattate con MC proveniente da adipociti invecchiati (PID 18) e adipociti insulino-resistenti (PID 10 IR) rispetto ai controlli (**Figura 16**).

### **III. ANALISI MEDIANTE WB DELLA MIOSTATINA IN MIOCITI C2C12 TRATTATI CON MC DI ADIPOCITI 3T3L1.**

La miostatina è un fattore implicato nella regolazione della massa muscolare, determinandone l'atrofia attraverso l'attivazione delle vie cataboliche, l'inibizione della sintesi proteica e la compromissione dei mioblasti differenziazione, così come nella fibrosi muscolare. Abbiamo studiato la sua modulazione nei miociti nelle diverse condizioni sperimentali mediante analisi RT-PCR e WB. L'espressione genica della miostatina è aumentata significativamente nei miociti trattati con il medium di adipociti invecchiati (PID18;  $p < 0,05$ ) rispetto al controllo. È stato anche riscontrato un lieve aumento, anche se non significativo, dell'espressione della miostatina dopo trattamento con medium da adipociti in condizioni di stress ossidativo (PID10 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) e di insulino-resistenza (PID10 IR) rispetto ai controlli. Questi dati sono stati ulteriormente rafforzati dall'analisi WB della miostatina nelle cellule C2C12 trattate con terreno proveniente da adipociti nelle diverse condizioni sperimentali, osservando un aumento dell'espressione della miostatina nelle cellule C2C12 trattate con MC invecchiato (PID 18;  $p < 0,05$ ), con MC proveniente da adipociti stressati trattati con H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (PID 10 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>;  $p < 0,05$ )



e da adipociti insulino-resistenti (PID 10 IR;  $p < 0,01$ ) rispetto al controllo (**Figura 17**).

#### **IV. ANALISI DELLA SINTESI PROTEICA NEI MIOCITI C2C12 TRATTATI CON MC DI ADIPOCITI 3T3L1.**

Per misurare dinamicamente la sintesi proteica nei miociti C2C12 nelle diverse condizioni sperimentali, abbiamo utilizzato il test dell'incorporazione della puromicina con il protocollo SUnSET. Questo metodo ha rivelato una tendenziale riduzione della sintesi proteica in tutte le condizioni sperimentali rispetto ai controlli, quando i miociti veniva esposti ad un MC raccolto da adipociti invecchiati o stressati. Tuttavia, queste differenze non sono risultate statisticamente significative (**Figura 18**).

#### **V. CARATTERIZZAZIONE DELLE EXTRAVESICOLE.**

Dopo l'isolamento dal MC degli adipociti, le EV sono state caratterizzate col TRPS. I risultati hanno mostrato un diametro medio di circa 150 nm senza differenze significative tra i gruppi. La concentrazione di EV era di  $8,69E+09$  particelle/ml nel gruppo controllo e  $1,58E+10$  particelle/ml nel gruppo insulino-resistente ( $p = 0.16$ ) (**Figura 19**).

### **DISCUSSIONE**

Questo studio preliminare *in vitro* ha utilizzato un sistema sperimentale di co-coltura indiretta ed analizzato i cambiamenti funzionali dei miociti dopo l'esposizione a terreno di coltura proveniente da adipociti in diverse condizioni sperimentali, concentrandosi sugli effetti causati dagli adipociti invecchiati o disfunzionali sulle cellule muscolari. Inoltre, abbiamo analizzato le EV secreta da adipociti adulti ed adipociti insulino-resistenti. Abbiamo osservato che l'esposizione dei miociti al MC proveniente da adipociti invecchiati, insulino-

resistenti ed adipociti trattati con specie reattive dell'ossigeno, si associava ad una riduzione della differenziazione dei miociti, aumentata atrofia dei miotubi e ad un'attivazione della via della miostatina. Il nostro lavoro suggerisce anche un possibile ruolo di alcune vie pro-fibrotiche come CCN-2 nel cross-talk tra adipociti invecchiati e stressati e cellule muscolari.

Nel nostro modello *in vitro*, da un punto di vista morfologico, il cross-talk tra miociti e adipociti invecchiati era caratterizzato da un maggior grado di atrofia con riduzione del diametro dei miotubi e da un'alterazione della differenziazione dei miotubi, rispetto ai miociti di controllo. Studi precedenti hanno descritto una diminuzione del diametro e dell'indice di fusione dei mioblasti dopo co-coltura con adipociti maturi (143) o con adipociti prelevati dal VAT dei soggetti obesi (144). I nostri dati mostrano anche un possibile ruolo per gli adipociti anziani e disfunzionali nella patogenesi dell'atrofia delle cellule muscolari e mostrano che lo stress ossidativo o la resistenza all'insulina potrebbero contribuire all'avvio di questo processo.

Parallelamente a queste evidenze morfologiche, le cellule muscolari trattate con MC proveniente da adipociti invecchiati hanno mostrato una tendenziale riduzione dell'espressione dei geni del differenziamento miocellulare ed un aumento dell'espressione dei geni legati all'atrofia muscolare. Per quanto riguarda i geni correlati all'atrofia muscolare, si è visto un aumento dell'espressione di Atrogin-1 e di MuRF1 rispetto ai controlli, dopo il trattamento delle cellule muscolari con MC proveniente da adipociti disfunzionali. Questo aumento è risultato statisticamente significativo per Atrogin-1 nei miociti trattati con MC proveniente da adipociti insulino-resistenti e si è visto un andamento analogo nei miociti esposti a MC proveniente da adipociti invecchiati. Questi risultati sembrano essere particolarmente rilevanti dal momento che sia Atrogin-1 che MuRF sono delle E3 muscolo-specifiche-ubiquitina-ligasi note col nome di "atrogeni", marcatori di atrofia muscolare (145), che risultano attivate in diversi modelli di atrofia muscolare e sono coinvolte anche nel rimodellamento e nel metabolismo muscolare (146).

Poiché l'atrofia muscolare interferisce con l'espressione di molti fattori di trascrizione e con l'avanzare dell'età si assiste alla diminuzione della massa

muscolare che deriva non solo da un aumento del catabolismo proteico ma anche da una riduzione sintesi proteica, in un contesto di rigenerazione muscolare compromessa (147), nel nostro modello sperimentale abbiamo esaminato l'espressione dei geni del differenziamento miocellulare. Abbiamo osservato che, l'espressione sia di MyoD, un fattore di trascrizione muscolare coinvolto nella differenziazione muscolare, nella formazione di miotubi (148) e nella sintesi di proteine contrattili (149), nonché l'espressione dell'mRNA di MyHC-IIb, considerato un marcatore della differenziazione dei miociti, era ridotta, anche se non significativamente, dopo esposizione delle cellule muscolari al terreno proveniente da adipociti maturi, invecchiati e disfunzionali.

Nell'ambito dello studio dei meccanismi associati alla perdita di massa muscolare con l'invecchiamento, abbiamo valutato nel nostro modello sperimentale il livello di sintesi proteica nelle cellule muscolari mediante WB con metodo SUN-SET per. I risultati ottenuti nel nostro studio mostrano una riduzione dell'anabolismo muscolare e della capacità delle cellule muscolari di sintetizzare proteine, valutate nel saggio mediante l'incorporazione di puromicina. Quest'ultima risultava diminuita quando le cellule C2C12 venivano trattate col MC proveniente da adipociti invecchiati o stressati.

Questi risultati sono in linea con studi precedenti (150) che hanno riscontrato una riduzione nell'espressione di MyoD ed un aumento di Atrogin-1, dopo aver trattato i miotubi con una miscela pro-infiammatoria. Le nostre osservazioni sono concordi coi risultati ottenuti dall'analisi di co-culture di miociti trattati con MC proveniente da cellule adipose viscerali ottenute da pazienti obesi in cui si è visto che era presente un maggiore grado di atrofia muscolare ed una ridotta differenziazione rispetto ai miociti co-coltivati con SAT (144). Infatti, il VAT è noto per avere un maggiore profilo pro-infiammatorio rispetto al SAT (23), suggerendo che l'infiammazione potrebbe essere un meccanismo comune nel cross-talk tra miociti e gli adipociti senescenti e disfunzionali utilizzati nel nostro modello *in vitro*. In realtà, il nostro lavoro amplia i risultati precedenti perché non vi è, a nostra conoscenza, nessuno studio che nello specifico abbia valutato il ruolo delle cellule adipose invecchiate e senescenti nello sviluppo dell'atrofia muscolare. È noto che con l'invecchiamento, il TA bianco diventa disfunzionale, mostrando un aumentato

profilo pro-infiammatorio ed una maggiore infiltrazione di cellule infiammatorie (58). Nel nostro modello di invecchiamento *in vitro*, abbiamo già descritto in precedenti esperimenti un aumento significativo di IL-6 e una diminuzione adiponectina nelle cellule invecchiate (151) e che negli adipociti disfunzionali è aumentata l'espressione di alcuni geni associati alla senescenza come BCL-2, BAX e LITAF (152)(153).

Nel nostro modello sperimentale, uno dei risultati più rilevanti è stato l'aumentata espressione genica di miostatina, soprattutto nei miociti trattati con il MC proveniente da cellule adipose invecchiate rispetto ai controlli, suggerendo un potenziale legame tra adipociti senescenti ed atrofia muscolare. Inoltre, l'espressione genica di questa proteina è stata confermata anche dall'analisi WB che mostra un incremento statisticamente significativo del livello di miostatina nei miociti cresciuti nelle nostre condizioni sperimentali rispetto ai controlli. La miostatina è un fattore di crescita espresso nel muscolo scheletrico e nel TA bianco necessario per il mantenimento dell'integrità muscolare. Essa regola la massa muscolare, determina atrofia (154) ed influenza negativamente la differenziazione e la proliferazione dei mioblasti (155,156). La miostatina è coinvolta nel metabolismo del glucosio e la sua inibizione si associa a un miglioramento del metabolismo e della sensibilità al glucosio (157). La miostatina può anche diminuire la sintesi proteica nei miotubi differenziati (158) regolando la via di segnalazione Akt/mTOR/p70S6, che media sia la differenziazione che l'ipertrofia dei miotubi (159). Uno studio *in vitro* su C2C12 adulte ha mostrato che la miostatina potrebbe ridurre la sintesi proteica attraverso la via di mTORC (159) o bloccando la segnalazione eEF2K-eEF2 (160). Pertanto, i nostri risultati suggeriscono che gli adipociti senescenti potrebbero essere importanti modulatori dell'integrità muscolare ed in particolare della differenziazione e proliferazione muscolare anche attraverso la modulazione della miostatina.

La miostatina è anche nota come fattore in grado di promuovere la fibrosi aumentando la sintesi di componenti della matrice extracellulare nel muscolo (161). I nostri dati preliminari dimostrano un tendenziale aumento del biomarcatore di fibrosi del muscolo scheletrico CCN-2 dopo il trattamento delle C2C12 con MC proveniente da adipociti. Tuttavia, altre vie muscolari, oltre alla miostatina, stanno

emergendo come potenzialmente coinvolte nella fibrosi muscolare e nella disfunzione muscolare tipica dell'invecchiamento. È interessante notare che nel nostro studio abbiamo riscontrato un aumento significativo dell'espressione di CCN-2 dopo il trattamento dei miociti con terreno proveniente da adipociti insulino-resistenti. CCN-2 ha dimostrato di avere un notevole effetto pro-fibrotico, come conferma il fatto che la sua inibizione consente di migliorare il fenotipo dei muscoli fibrotici (162–164). CCN-2 è risultato anche essere aumentato in alcuni modelli di sarcopenia e potrebbe influenzare negativamente la rigenerazione muscolare (165). Pertanto, è possibile ipotizzare che il danno muscolare possa aumentare la produzione di TGF- $\beta$  che a sua volta attiva SMAD2/3, favorendo la trascrizione di CCN-2, fattore che favorisce l'espressione di COL1A1 attraverso un meccanismo autocrino o paracrino (166).

I risultati di questo lavoro mostrano nel loro insieme che gli adipociti invecchiati e disfunzionali possono contribuire allo sviluppo di una riduzione e disfunzione della massa muscolare età-correlata. Gli adipociti invecchiati potrebbero quindi rappresentare un potenziale bersaglio per ridurre gli effetti negativi sul muscolo esercitato dagli stessi adipociti senescenti e disfunzionali. Recentemente una nuova classe di composti, chiamati senolitici, sono stati oggetto di studio per eliminare selettivamente le cellule senescenti in diversi tessuti (167). Solo poche sostanze sono state testate per il TA bianco. Tra queste, si è visto che il polifenolo quercetina ha un effetto senolitico sul TA bianco, sia *in vitro* che *in vivo* (168,169). Nei topi sottoposti ad una dieta ricca di grassi con o senza integrazione con quercetina, si è visto che il composto ha ridotto i livelli di citochine infiammatorie e l'accumulo di macrofagi nel muscolo scheletrico e ridotto l'espressione di Atrogin-1 e MuRF1, proteggendo gli animali da una riduzione della massa muscolare (170). Anche se alcuni studi *in vitro* ipotizzano un'azione diretta della quercetina sulle cellule muscolari, non è da escludere che questa molecola possa avere effetti anche sull'infiltrazione del TA bianco nel muscolo con un'azione selettiva sugli adipociti senescenti.

In letteratura è crescente l'interesse nello studio delle EV come potenziali effettori del cross-talk inter-organo, per questo motivo in questo lavoro sia pure in maniera preliminare, sono state isolate e sono in via di caratterizzazione le EV. Nel

caso specifico della comunicazione inter-organo tra tessuto adiposo e muscolare, si è visto che l'esposizione cronica degli adipociti ad insulina, induce la loro insulino-resistenza, aumenta la secrezione di adipochine coinvolte nell'inflammageing come IL6 e di CCL5 e MCP-1 che avrebbero poi un ruolo attivo nel reclutamento dei macrofagi nel TA bianco. Inoltre, si è visto che l'insulino-resistenza viene trasmessa ai miotubi trattati con MC proveniente da adipociti insulino-resistenti (142). Si è visto che gli esosomi possono trasferire il loro contenuto proteico e lipidico tra cellule muscolari differenziate (171) e che le EV secrete dagli adipociti ipertrofici o insulino-resistenti possono promuovere l'atrofia e l'insulino-resistenza nei miociti sani (172). Uno studio *in vitro* su C2C12 e uno studio *in vivo* su campioni di tessuto muscolare prelevati dal muscolo tibiale dei topi hanno mostrato inoltre un ruolo delle EV sulla degenerazione acuta del muscolo scheletrico (173). Per quanto riguarda il nostro modello di studio, la coltura cellulare è un modello appropriato per studiare le funzioni delle EV in quanto la può essere analizzata in maniera specifica la loro secrezione da parte di un particolare organo o tessuto. Nei mammiferi, tutti i tessuti possono rilasciare EV e si è visto nel sangue c'è una quantità significativa di diversi tipi di EV provenienti da tessuti diversi (174).. Tuttavia, esistono dei limiti legati all'utilizzo di una coltura cellulare bidimensionale, legati alla sua ridotta capacità di crescita, al fatto che non è fisiologica né dinamico (175). Allo stato attuale, però, non esiste un modello cellulare in grado di riprodurre *in vitro* la fisiologia del tessuto adiposo *in vivo*, sia in termini di morfologia che di metabolismo (137). Si è visto, tuttavia, che la coltura *in vitro* di adipociti murini 3T3-L1 (175) e miociti C2C12 (176) utilizzando un gel di matrice extracellulare può ricreare una coltura tridimensionale in grado di compensare, in parte, i limiti della metodica.

Nei dati preliminari di isolamento e analisi delle EV dal MC di adipociti, non abbiamo riscontrato distinzione tra i diversi sottotipi di EV. Dalla letteratura, i risultati più recenti si basano su analisi eseguite sugli esosomi derivati dagli adipociti questo poiché gli adipociti secernono più esosomi rispetto alle microvescicole (177). Tuttavia, sia gli esosomi che le microvescicole sono stati osservati nelle persone obese (177).. La dimensione media delle EV riscontrata (150 nm) in questo studio è in linea con quella presente in letteratura (172). La

concentrazione di EV sembra essere più alta nel medium degli adipociti insulino-resistenti ma sono necessarie ulteriori repliche tecniche per confermare il dato, anche se in linea con la letteratura che mostra una aumentata secrezione di EV negli adipociti insulino-resistenti (177).

In conclusione, nell'interpretazione dei nostri risultati, dovrebbero essere riconosciuti alcuni limiti intrinseci nel modello adottato. Il TA ed il muscolo sono composti da diversi tipi cellulari, in particolare da adipociti e miociti, e la complessità del tessuto e le interazioni tra tutti i loro componenti non possono essere studiate solo attraverso modelli *in vitro*. Inoltre, la valutazione della fibrosi è difficile da eseguire *in vitro* e richiederebbe studi su animali e/o umani con l'utilizzo di campioni biotici. I dati di questo studio dovrebbero essere confermati con ulteriori analisi, possibilmente su colture di adipociti e miociti umani e attraverso la modulazione di alcune vie per supportare ulteriormente il ruolo dell'adipocita senescente nella fisiopatologia dell'invecchiamento muscolare.

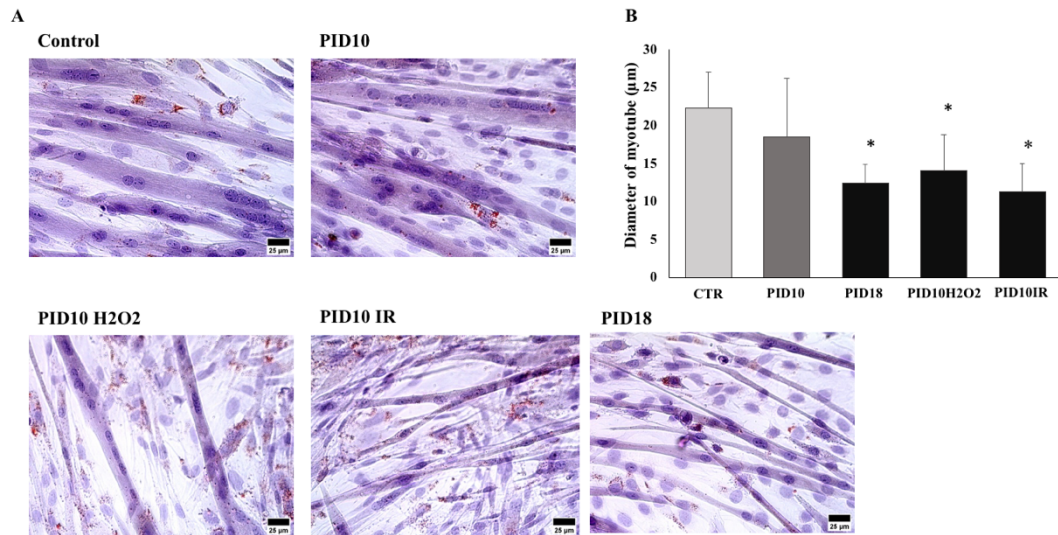
## CONCLUSIONI

Il nostro studio suggerisce che gli adipociti senescenti potrebbero essere coinvolti in una rete di comunicazione paracrina col tessuto muscolare, influenzandone negativamente il trofismo, la funzione e la capacità rigenerativa. L'infiammazione, il SASP e lo stress ossidativo, che caratterizzano gli adipociti invecchiati, potrebbero influenzare l'omeostasi dei miociti aumentando l'espressione della miostatina. Le EV secrete dagli adipociti potrebbero avere un ruolo rilevante nella comunicazione inter-organo tra AT e tessuto muscolare e potrebbero essere in grado di attivare l'inibizione della differenziazione, aumento della fibrosi e dell'atrofia muscolare. Sono necessari ulteriori studi per chiarire se la riduzione della massa, della qualità e delle prestazioni delle cellule muscolari correlata all'età e all'obesità possa essere arrestato dal trattamento del TA disfunzionale e se gli adipociti senescenti possano rappresentare, non solo gli effettori ma anche potenziali bersagli, per contrastare la disfunzione delle cellule muscolari. Comprendere la comunicazione tra TA e tessuto muscolare, potrebbe permetterci di identificare alcuni biomarcatori di malattie metaboliche come l'obesità-sarcopenica basati sull'insulino-resistenza e sulle sue conseguenze. Questi biomarcatori potrebbero aiutare a prevenire la sarcopenia.



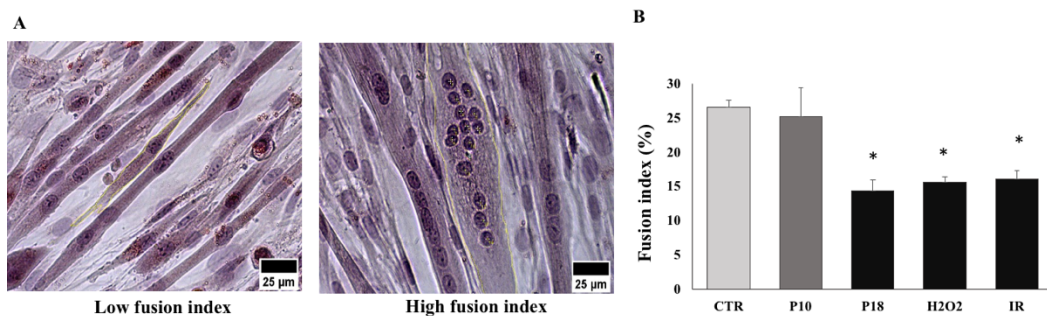
## FIGURE

**Figura 12.**



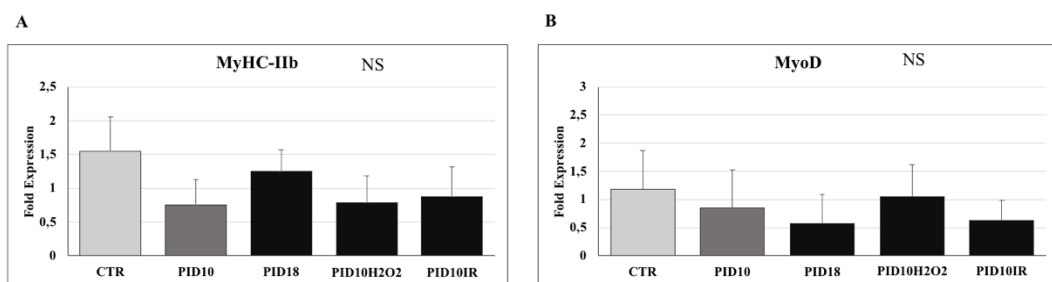
**Cambiamenti morfologici dei miotubi C2C12 dopo trattamento con mezzo condizionato (CM) raccolti da colture di adipociti nelle diverse condizioni sperimentali.** (A) Colorazione con ematosillina-eosina e colorazione con Oil-Red-O di miotubi C2C12 esposti al mezzo di controllo, CM da adipociti adulti (PID10), adipociti trattati con specie reattive dell'ossigeno (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>), insulino-resistenti adipociti (IR) e adipociti invecchiati (PID18) (barra della scala = 25 µm). (B) Diametro delle fibre dei miociti (µm) di C2C12 trattati con mezzo di controllo o CM da adipociti adulti (PID10), adipociti trattati con specie reattive dell'ossigeno (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>), adipociti insulino-resistenti (PIDIR) e adipociti invecchiati (PID18). I dati sono presentati come media ± SD da due esperimenti indipendenti. \*p < 0,05 rispetto al controllo. PID: giorno di post induzione.

**Figura 13.**



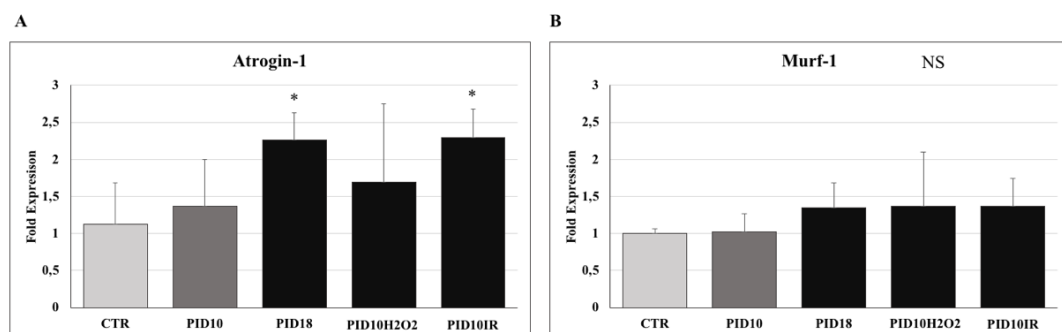
**Valutazione del grado di differenziazione in base all'indice di fusione in C2C12 trattato con medium condizionato (CM) da adipociti nelle diverse condizioni sperimentali. (A) Esplicativo di immagini con indice di fusione dei miotubi basso e alto (barra della scala = 25  $\mu$ m). (B) Indice di fusione di C2C12 trattate con CM da adipociti adulti (PID10), adipociti trattati con ossigeno reattivo specie (H2O2), adipociti insulino-resistenti (IR) e adipociti invecchiati (PID18). I dati sono presentati come media  $\pm$  DS da due esperimenti indipendenti. \* $p < 0,05$  rispetto al controllo. PID: giorno di post induzione.**

**Figura 14.**



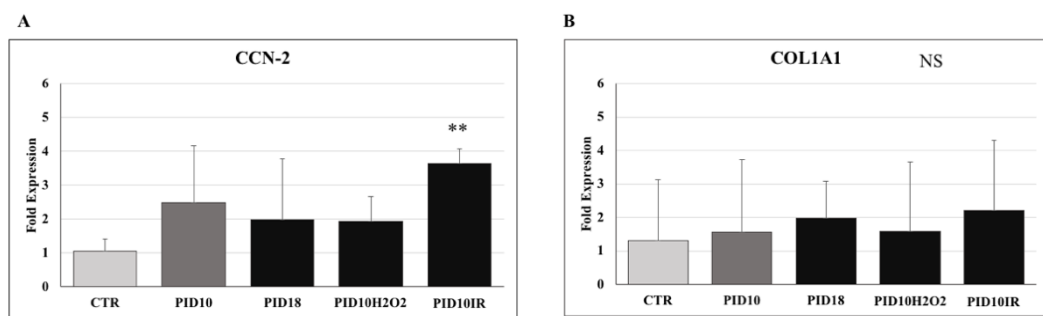
**Analisi dell'espressione genica mediante RT-PCR di alcuni geni che caratterizzano i miotubi maturi in C2C12 trattati con mezzo condizionato (CM) da adipociti nelle diverse condizioni sperimentali.** In questi miotubi, sono stati determinati l'espressione genica della catena pesante della miosina IIb (MyHC-IIb) (A) e di MyoD (B). Le cellule C2C12 sono state incubate con il mezzo di controllo o con CM da adipociti adulti (PID10), adipociti trattati con specie reattive dell'ossigeno (H2O2), adipociti insulino-resistenti (IR) e adipociti invecchiati (PID18). I dati sono presentati come media  $\pm$  DS da tre indipendenti esperimenti. PID: giorno di post induzione.

**Figura 15.**



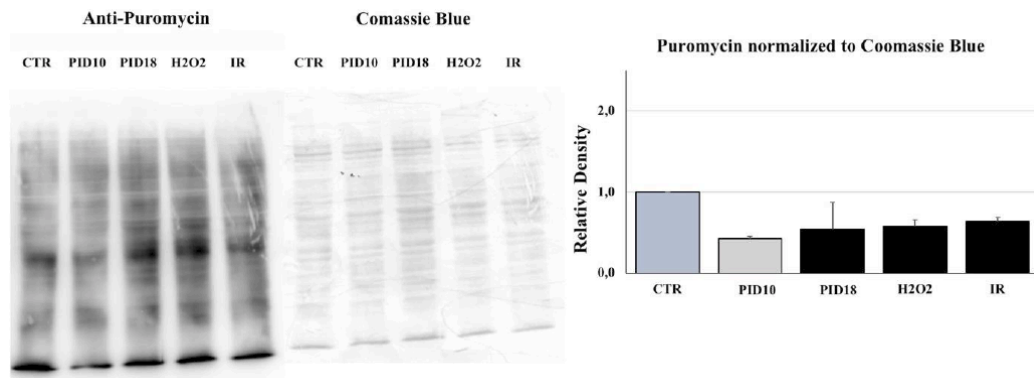
**Analisi dell'espressione genica mediante RT-PCR di alcuni geni coinvolti nell'atrofia muscolare in C2C12 trattati con mezzo condizionato (CM) da adipociti nelle diverse condizioni sperimentali.** In questi miotubi è stata determinata l'espressione genica di Atrogin-1 (A) e MuRF1 (B). C2C12 cellule sono state incubate con il mezzo di controllo o con CM da adipociti adulti (PID10), adipociti trattati con specie reattive dell'ossigeno (H2O2), adipociti insulino-resistenti (IR) e adipociti invecchiati (PID18). I dati sono presentati come media  $\pm$  DS da tre esperimenti indipendenti. \* $p < 0,05$  rispetto al controllo. PID: giorno di post induzione; MuRF1: Muscle RING Finger-1.

**Figura 16.**



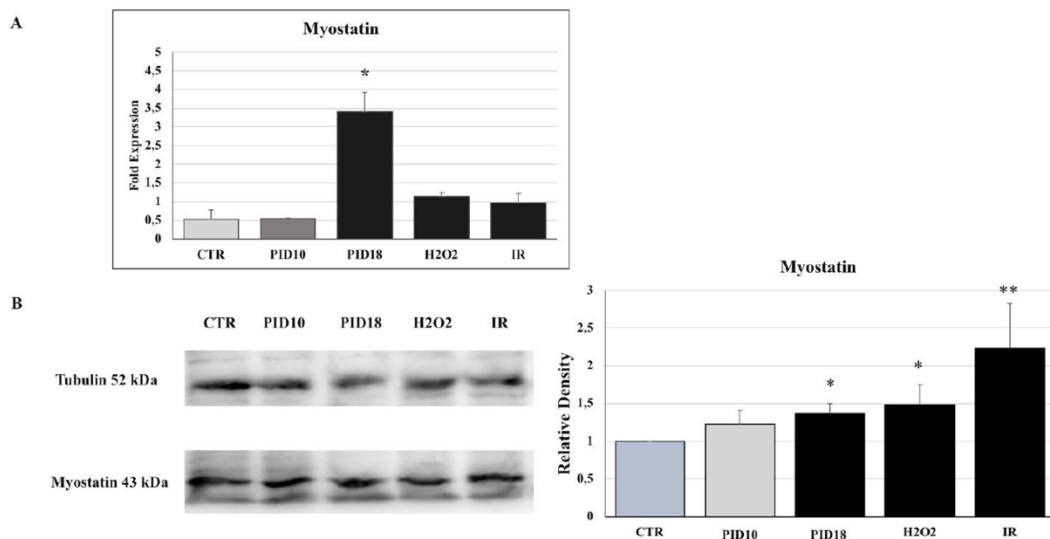
**Analisi dell'espressione genica mediante RT-PCR di alcuni geni coinvolti nella fibrosi muscolare in C2C12 trattate con mezzo condizionato (MC) da adipociti nelle diverse sperimentali condizioni.** In questi miotubi è stata determinata l'espressione genica CCN-2 (A) e COL1A1 (B). Le C2C12 sono state incubate con il mezzo di controllo o con MC da adipociti adulti (PID10), adipociti trattati con specie reattive dell'ossigeno (H2O2), adipociti insulino-resistenti (IR) e adipociti invecchiati (PID18). I dati sono presentati come media  $\pm$  DS da tre esperimenti indipendenti. \* $p < 0,05$  rispetto al PID di controllo: giorno di post induzione; CCN-2: fattore 2 della rete di comunicazione cellulare; COL1A: collagene tipo 1A.

**Figura 17.**



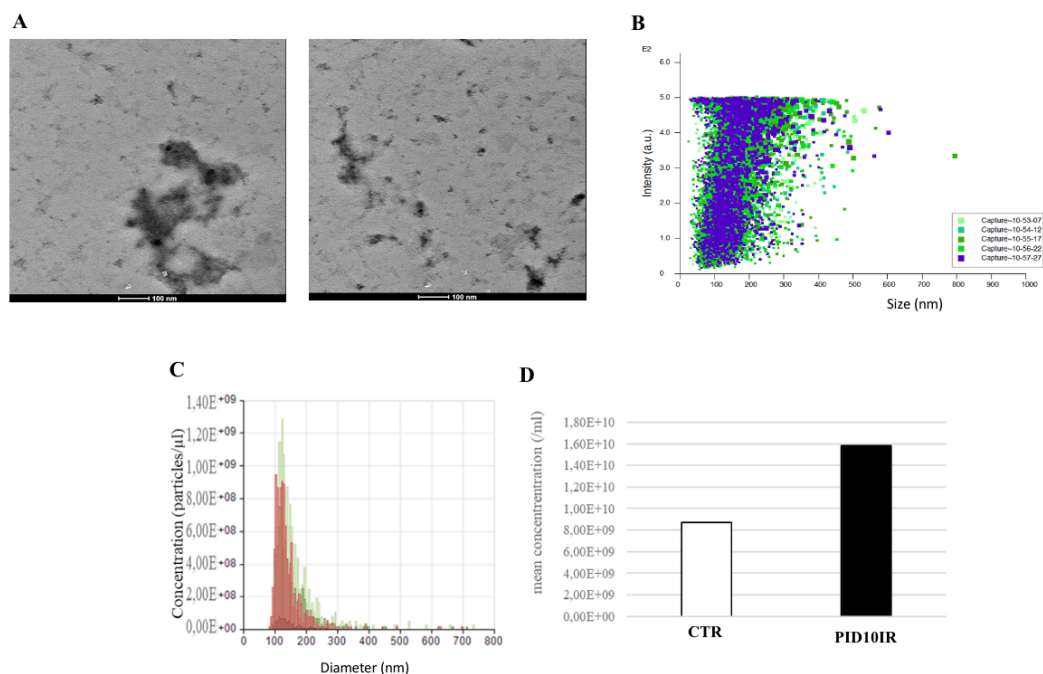
**Sintesi proteica valutata mediante incorporazione di puromicina in C2C12 trattata con mezzo condizionato (CM) da adipociti nelle diverse condizioni sperimentali.** C2C12 trattate con il mezzo di controllo o con CM da adipociti adulti (PID10), adipociti trattati con specie reattive dell'ossigeno (H2O2), adipociti insulino-resistenti (IR) e adipociti invecchiati (PID18), sono stati incubati con puromicina secondo il metodo SUnSET come descritto in Materiali e metodi. (A) Immagine rappresentativa dell'analisi WB per puromicina seguita da colorazione Coomassie Blue colorazione per verificare uguale carico di proteine nelle diverse condizioni sperimentali. (B) Quantificazione dei peptidi marcati con puromicina, dopo la normalizzazione con colorazione Coomassie Blue (C).

**Figura 18.**



**Analisi RT-PCR e Western Blot della miostatina in C2C12 trattate con mezzo condizionato (CM) da adipociti nelle diverse condizioni sperimentali.** Le cellule C2C12 erano incubate col mezzo di controllo o con CM da adipociti adulti (PID10), adipociti trattati con specie reattive dell'ossigeno (H2O2), adipociti insulino-resistenti (IR) e adipociti invecchiati (PID18). Espressione genica della miostatina. I dati sono presentati come media  $\pm$  DS da tre esperimenti indipendenti. **(B)** Immagino dal saggio western blotting dell'espressione della miostatina normalizzato su  $\beta$ -tubulina in C2C12 nelle diverse condizioni sperimentali **(A)**. \* $p < 0,05$  rispetto al controllo, \*\* $p < 0,01$  rispetto al controllo. PID: giorno di post induzione.

**Figura 19.**



**Caratterizzazione delle EV mediante TRPS.** **(A)** EV alla TEM distribuzione della loro intensità in funzione delle loro dimensioni (nm) **(B)**. **(C)** Dimensioni delle EV misurate attraverso TRPS. **(D)** Concentrazione media delle EV misurate mediante TRPS. I dati sono mostrati come  $\pm$  DS (n=2). \* $p < 0.05$  indica la significatività tra i due gruppi ottenuta dopo ANOVA ad una via.

## BIBLIOGRAFIA

1. Coin A, Sergi G, Inelmen EM, Enzi G. Pathophysiology of Body Composition Changes in Elderly People. In: Mantovani G, Anker SD, Inui A, Morley JE, Fanelli FR, Scévola D, et al., curatori. *Cachexia and Wasting: A Modern Approach* [Internet]. Milano: Springer Milan; 2006 [citato 8 agosto 2022]. p. 369–75. Disponibile su: [https://doi.org/10.1007/978-88-470-0552-5\\_36](https://doi.org/10.1007/978-88-470-0552-5_36)
2. López-Otín C, Blasco MA, Partridge L, Serrano M, Kroemer G. The Hallmarks of Aging. *Cell*. 6 giugno 2013;153(6):1194–217.
3. The Demography of Aging | SpringerLink [Internet]. [citato 9 agosto 2022]. Disponibile su: [https://link.springer.com/chapter/10.1007/978-94-007-5061-6\\_1](https://link.springer.com/chapter/10.1007/978-94-007-5061-6_1)
4. Park MH, Kim DH, Lee EK, Kim ND, Im DS, Lee J, et al. Age-related inflammation and insulin resistance: a review of their intricate interdependency. *Arch Pharm Res*. 1 dicembre 2014;37(12):1507–14.
5. Ghosh AK, Garg SK, Mau T, O'Brien M, Liu J, Yung R. Elevated Endoplasmic Reticulum Stress Response Contributes to Adipose Tissue Inflammation in Aging. *J Gerontol Ser A*. 1 novembre 2015;70(11):1320–9.
6. Camell CD, Sander J, Spadaro O, Lee A, Nguyen KY, Wing A, et al. Inflammasome-driven catecholamine catabolism in macrophages blunts lipolysis during ageing. *Nature*. ottobre 2017;550(7674):119–23.
7. Kuk JL, Saunders TJ, Davidson LE, Ross R. Age-related changes in total and regional fat distribution. *Ageing Res Rev*. 1 ottobre 2009;8(4):339–48.
8. Human Adipose Tissue Is a Source of Multipotent Stem Cells | *Molecular Biology of the Cell* [Internet]. [citato 8 agosto 2022]. Disponibile su: <https://www.molbiolcell.org/doi/full/10.1091/mbc.e02-02-0105>
9. Goldberg EL, Shchukina I, Youm YH, Ryu S, Tsusaka T, Young KC, et al. IL-33 causes thermogenic failure in aging by expanding dysfunctional adipose ILC2. *Cell Metab*. 2 novembre 2021;33(11):2277-2287.e5.
10. Trim W, Turner JE, Thompson D. Parallels in Immunometabolic Adipose Tissue Dysfunction with Ageing and Obesity. *Front Immunol* [Internet]. 2018 [citato 21 febbraio 2020];9. Disponibile su:

[https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fimmu.2018.00169/full?&field=&journalName=Frontiers\\_in\\_Immunology&id=330241](https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fimmu.2018.00169/full?&field=&journalName=Frontiers_in_Immunology&id=330241)

11. Starr ME, Hu Y, Stromberg AJ, Carmical JR, Wood TG, Evers BM, et al. Gene expression profile of mouse white adipose tissue during inflammatory stress: age-dependent upregulation of major procoagulant factors. *Aging Cell*. 2013;12(2):194–206.
12. Birch J, Gil J. Senescence and the SASP: many therapeutic avenues. *Genes Dev*. 12 gennaio 2020;34(23–24):1565–76.
13. Scheja L, Heeren J. The endocrine function of adipose tissues in health and cardiometabolic disease. *Nat Rev Endocrinol*. settembre 2019;15(9):507–24.
14. Physical Activity and Exercise in the Regulation of Human Adipose Tissue Physiology | *Physiological Reviews* [Internet]. [citato 8 agosto 2022]. Disponibile su: <https://journals.physiology.org/doi/full/10.1152/physrev.00012.2011?view=long&pmid=22298655>
15. Hassan WU, Greiser U, Wang W. Role of adipose-derived stem cells in wound healing. *Wound Repair Regen*. 2014;22(3):313–25.
16. Maeda K, Okubo K, Shimomura I, Mizuno K, Matsuzawa Y, Matsubara K. Analysis of an expression profile of genes in the human adipose tissue. *Gene*. 6 maggio 1997;190(2):227–35.
17. Ouchi N, Parker JL, Lugus JJ, Walsh K. Adipokines in inflammation and metabolic disease. *Nat Rev Immunol*. febbraio 2011;11(2):85–97.
18. Rosen ED, Spiegelman BM. What We Talk About When We Talk About Fat. *Cell*. 16 gennaio 2014;156(1):20–44.
19. Wronska A, Kmiec Z. Structural and biochemical characteristics of various white adipose tissue depots. *Acta Physiol*. 2012;205(2):194–208.
20. Fox CS, Massaro JM, Hoffmann U, Pou KM, Maurovich-Horvat P, Liu CY, et al. Abdominal visceral and subcutaneous adipose tissue compartments: association with metabolic risk factors in the Framingham Heart Study. *Circulation*. 3 luglio 2007;116(1):39–48.
21. Komolka K, Albrecht E, Wimmers K, Michal JJ, Maak S. Molecular Heterogeneities of Adipose Depots - Potential Effects on Adipose-Muscle Cross-Talk in Humans, Mice and Farm Animals. *J Genomics*. 20 gennaio 2014;2:31–44.

22. Macotela Y, Emanuelli B, Mori MA, Gesta S, Schulz TJ, Tseng YH, et al. Intrinsic Differences in Adipocyte Precursor Cells From Different White Fat Depots. *Diabetes*. luglio 2012;61(7):1691–9.
23. Alvehus M, Burén J, Sjöström M, Goedecke J, Olsson T. The Human Visceral Fat Depot Has a Unique Inflammatory Profile. *Obesity*. 2010;18(5):879–83.
24. Cinti S. Anatomy and physiology of the nutritional system. *Mol Aspects Med*. 1 agosto 2019;68:101–7.
25. Zoico E, Rubele S, De Caro A, Nori N, Mazzali G, Fantin F, et al. Brown and Beige Adipose Tissue and Aging. *Front Endocrinol [Internet]*. 20 giugno 2019 [citato 4 febbraio 2020];10. Disponibile su: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6595248/>
26. Cannon B, Nedergaard J. Brown adipose tissue: function and physiological significance. *Physiol Rev*. gennaio 2004;84(1):277–359.
27. Cinti S. The adipose organ at a glance. *Dis Model Mech*. 1 settembre 2012;5(5):588–94.
28. Ahima RS, Flier JS. Adipose tissue as an endocrine organ. *Trends Endocrinol Metab*. ottobre 2000;11(8):327–32.
29. Palmer AK, Kirkland JL. Aging and adipose tissue: potential interventions for diabetes and regenerative medicine. *Exp Gerontol*. 15 dicembre 2016;86:97–105.
30. Raguso CA, Kyle U, Kossovsky MP, Roynette C, Paoloni-Giacobino A, Hans D, et al. A 3-year longitudinal study on body composition changes in the elderly: Role of physical exercise. *Clin Nutr*. 1 agosto 2006;25(4):573–80.
31. Bazzocchi A, Diano D, Ponti F, Andreone A, Sassi C, Albisinni U, et al. Health and ageing: a cross-sectional study of body composition. *Clin Nutr Edinb Scotl*. agosto 2013;32(4):569–78.
32. Atlantis E, Martin SA, Haren MT, Taylor AW, Wittert GA, Florey Adelaide Male Aging Study. Lifestyle factors associated with age-related differences in body composition: the Florey Adelaide Male Aging Study. *Am J Clin Nutr*. luglio 2008;88(1):95–104.
33. Hughes VA, Roubenoff R, Wood M, Frontera WR, Evans WJ, Fiatarone



- Singh MA. Anthropometric assessment of 10-y changes in body composition in the elderly. *Am J Clin Nutr.* agosto 2004;80(2):475–82.
34. Jackson AS, Janssen I, Sui X, Church TS, Blair SN. Longitudinal changes in body composition associated with healthy ageing: men, aged 20-96 years. *Br J Nutr.* aprile 2012;107(7):1085–91.
35. Forbes GB. Longitudinal changes in adult fat-free mass: influence of body weight. *Am J Clin Nutr.* dicembre 1999;70(6):1025–31.
36. Goodpaster BH, Thaete FL, Simoneau JA, Kelley DE. Subcutaneous Abdominal Fat and Thigh Muscle Composition Predict Insulin Sensitivity Independently of Visceral Fat. *Diabetes.* 1 ottobre 1997;46(10):1579–85.
37. Schwartz RS, Shuman WP, Bradbury VL, Cain KC, Fellingham GW, Beard JC, et al. Body fat distribution in healthy young and older men. *J Gerontol.* novembre 1990;45(6):M181-185.
38. Mancuso P, Bouchard B. The Impact of Aging on Adipose Function and Adipokine Synthesis. *Front Endocrinol.* 2019;10:137.
39. Gavi S, Feiner JJ, Melendez MM, Mynarcik DC, Gelato MC, McNurlan MA. Limb Fat to Trunk Fat Ratio in Elderly Persons Is a Strong Determinant of Insulin Resistance and Adiponectin Levels. *J Gerontol Ser A.* 1 settembre 2007;62(9):997–1001.
40. Caso G, McNurlan MA, Mileva I, Zemlyak A, Mynarcik DC, Gelato MC. Peripheral fat loss and decline in adipogenesis in older humans. *Metabolism.* 1 marzo 2013;62(3):337–40.
41. Lakowa N, Trieu N, Flehmig G, Lohmann T, Schön MR, Dietrich A, et al. Telomere length differences between subcutaneous and visceral adipose tissue in humans. *Biochem Biophys Res Commun.* 13 febbraio 2015;457(3):426–32.
42. Manolopoulos KN, Karpe F, Frayn KN. Gluteofemoral body fat as a determinant of metabolic health. *Int J Obes* 2005. giugno 2010;34(6):949–59.
43. Schosserer M, Grillari J, Wolfrum C, Scheideler M. Age-Induced Changes in White, Brite, and Brown Adipose Depots: A Mini-Review. *Gerontology.* 2018;64(3):229–36.
44. Cartwright MJ, Tchkonina T, Kirkland JL. Aging in adipocytes: Potential impact of inherent, depot-specific mechanisms. *Exp Gerontol.* 1 giugno

2007;42(6):463–71.

45. Schipper BM, Marra KG, Zhang W, Donnenberg AD, Rubin JP. Regional Anatomic and Age Effects on Cell Function of Human Adipose-Derived Stem Cells. *Ann Plast Surg.* maggio 2008;60(5):538–44.

46. Kirkland JL, Tchkonina T, Pirtskhalava T, Han J, Karagiannides I. Adipogenesis and aging: does aging make fat go MAD? *Exp Gerontol.* 1 giugno 2002;37(6):757–67.

47. Zhu M, Kohan E, Bradley J, Hedrick M, Benhaim P, Zuk P. The effect of age on osteogenic, adipogenic and proliferative potential of female adipose-derived stem cells. *J Tissue Eng Regen Med.* 2009;3(4):290–301.

48. de Sá PM, Richard AJ, Hang H, Stephens JM. Transcriptional Regulation of Adipogenesis. In: *Comprehensive Physiology* [Internet]. John Wiley & Sons, Ltd; 2017 [citato 13 agosto 2022]. p. 635–74. Disponibile su: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1002/cphy.c160022>

49. Karagiannides I, Tchkonina T, Dobson DE, Stepan CM, Cummins P, Chan G, et al. Altered expression of C/EBP family members results in decreased adipogenesis with aging. *Am J Physiol - Regul Integr Comp Physiol.* 3 luglio 2001;280(6 49-6):R1772–80.

50. Dasuri K, Zhang L, Ebenezer P, Fernandez-Kim SO, Bruce-Keller AJ, Szweda LI, et al. Proteasome alterations during adipose differentiation and aging: links to impaired adipocyte differentiation and development of oxidative stress. *Free Radic Biol Med.* 1 novembre 2011;51(9):1727–35.

51. Karagiannides I, Thomou T, Tchkonina T, Pirtskhalava T, Kypreos KE, Cartwright A, et al. Increased CUG triplet repeat-binding protein-1 predisposes to impaired adipogenesis with aging. *J Biol Chem.* 11 agosto 2006;281(32):23025–33.

52. Tchkonina T, Pirtskhalava T, Thomou T, Cartwright MJ, Wise B, Karagiannides I, et al. Increased TNF $\alpha$  and CCAAT/enhancer-binding protein homologous protein with aging predispose preadipocytes to resist adipogenesis. *Am J Physiol-Endocrinol Metab.* 1 dicembre 2007;293(6):E1810–9.

53. Xu L, Ma X, Verma NK, Wang D, Gavrilova O, Proia RL, et al. Ablation of PPAR $\gamma$  in subcutaneous fat exacerbates age-associated obesity and metabolic

decline. *Aging Cell*. 2018;17(2):e12721.

54. Fei J, Tamski H, Cook C, Santanam N. MicroRNA Regulation of Adipose Derived Stem Cells in Aging Rats. *PLoS ONE* [Internet]. 14 marzo 2013 [citato 17 giugno 2020];8(3). Disponibile su: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3597632/>
55. Kim SM, Lun M, Wang M, Senyo SE, Guillermier C, Patwari P, et al. Loss of White Adipose Hyperplastic Potential Is Associated with Enhanced Susceptibility to Insulin Resistance. *Cell Metab*. 2 dicembre 2014;20(6):1049–58.
56. Guo W, Pirtskhalava T, Tchkonja T, Xie W, Thomou T, Han J, et al. Aging results in paradoxical susceptibility of fat cell progenitors to lipotoxicity. *Am J Physiol-Endocrinol Metab*. aprile 2007;292(4):E1041–51.
57. Hernandez-Segura A, Nehme J, Demaria M. Hallmarks of Cellular Senescence. *Trends Cell Biol*. 1 giugno 2018;28(6):436–53.
58. Tchkonja T, Morbeck DE, Zglinicki TV, Deursen JV, Lustgarten J, Scoble H, et al. Fat tissue, aging, and cellular senescence. *Aging Cell*. 2010;9(5):667–84.
59. de Magalhães JP, Passos JF. Stress, cell senescence and organismal ageing. *Mech Ageing Dev*. 1 marzo 2018;170:2–9.
60. Di Micco R, Krizhanovsky V, Baker D, d'Adda di Fagagna F. Cellular senescence in ageing: from mechanisms to therapeutic opportunities. *Nat Rev Mol Cell Biol*. febbraio 2021;22(2):75–95.
61. Calcinotto A, Kohli J, Zagato E, Pellegrini L, Demaria M, Alimonti A. Cellular Senescence: Aging, Cancer, and Injury. *Physiol Rev*. aprile 2019;99(2):1047–78.
62. Gire V, Wynford-Thomas D. Reinitiation of DNA Synthesis and Cell Division in Senescent Human Fibroblasts by Microinjection of Anti-p53 Antibodies. *Mol Cell Biol*. marzo 1998;18(3):1611–21.
63. Baar MP, Brandt RMC, Putavet DA, Klein JDD, Derks KWJ, Bourgeois BRM, et al. Targeted Apoptosis of Senescent Cells Restores Tissue Homeostasis in Response to Chemotoxicity and Aging. *Cell*. 23 marzo 2017;169(1):132-147.e16.
64. Freund A, Orjalo AV, Desprez PY, Campisi J. Inflammatory networks during cellular senescence: causes and consequences. *Trends Mol Med*. 1 maggio 2010;16(5):238–46.

65. Xu M, Palmer AK, Ding H, Weivoda MM, Pirtskhalava T, White TA, et al. Targeting senescent cells enhances adipogenesis and metabolic function in old age. *eLife*. 19 dicembre 2015;4:e12997.
66. Baker DJ, Wijshake T, Tchkonia T, LeBrasseur NK, Childs BG, van de Sluis B, et al. Clearance of p16 Ink4a -positive senescent cells delays ageing-associated disorders. *Nature*. novembre 2011;479(7372):232–6.
67. Acosta JC, O’Loughlen A, Banito A, Guijarro MV, Augert A, Raguz S, et al. Chemokine Signaling via the CXCR2 Receptor Reinforces Senescence. *Cell*. 13 giugno 2008;133(6):1006–18.
68. Zoico E, Nori N, Darra E, Tebon M, Rizzatti V, Policastro G, et al. Senolytic effects of quercetin in an in vitro model of pre-adipocytes and adipocytes induced senescence. *Sci Rep*. 1 dicembre 2021;11(1):23237.
69. Xu M, Tchkonia T, Ding H, Ogrodnik M, Lubbers ER, Pirtskhalava T, et al. JAK inhibition alleviates the cellular senescence-associated secretory phenotype and frailty in old age. *Proc Natl Acad Sci*. 17 novembre 2015;112(46):E6301–10.
70. Zhu Y, Armstrong JL, Tchkonia T, Kirkland JL. Cellular senescence and the senescent secretory phenotype in age-related chronic diseases. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care*. luglio 2014;17(4):324–8.
71. Smith U, Li Q, Rydén M, Spalding KL. Cellular senescence and its role in white adipose tissue. *Int J Obes* 2005. maggio 2021;45(5):934–43.
72. Chen GY, Nuñez G. Sterile inflammation: sensing and reacting to damage. *Nat Rev Immunol*. dicembre 2010;10(12):826–37.
73. Schaum N, Lehallier B, Hahn O, Pálovics R, Hosseinzadeh S, Lee SE, et al. Ageing hallmarks exhibit organ-specific temporal signatures. *Nature*. luglio 2020;583(7817):596–602.
74. Mack I, BelAiba RS, Djordjevic T, Görlach A, Hauner H, Bader BL. Functional analyses reveal the greater potency of preadipocytes compared with adipocytes as endothelial cell activator under normoxia, hypoxia, and TNF $\alpha$  exposure. *Am J Physiol-Endocrinol Metab*. settembre 2009;297(3):E735–48.
75. Starr ME, Evers BM, Saito H. Age-Associated Increase in Cytokine Production During Systemic Inflammation: Adipose Tissue as a Major Source of IL-6. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci*. 1 luglio 2009;64A(7):723–30.

76. Jerschow E, Anwar S, Barzilai N, Rosenstreich D. Macrophages Accumulation in Visceral and Subcutaneous Adipose Tissue Correlates with Age. *J Allergy Clin Immunol*. 1 gennaio 2007;119(1):S179.
77. Shook BA, Wasko RR, Mano O, Rutenberg-Schoenberg M, Rudolph MC, Zirak B, et al. Dermal Adipocyte Lipolysis and Myofibroblast Conversion Are Required for Efficient Skin Repair. *Cell Stem Cell*. 4 giugno 2020;26(6):880-895.e6.
78. Ghosh AK, Mau T, O'Brien M, Garg S, Yung R. Impaired autophagy activity is linked to elevated ER-stress and inflammation in aging adipose tissue. *Aging*. 24 ottobre 2016;8(10):2525–36.
79. Von Bank H, Kirsh C, Simcox J. Aging adipose: Depot location dictates age-associated expansion and dysfunction. *Ageing Res Rev*. 1 maggio 2021;67:101259.
80. Graja A, Garcia-Carrizo F, Jank AM, Gohlke S, Ambrosi TH, Jonas W, et al. Loss of periostin occurs in aging adipose tissue of mice and its genetic ablation impairs adipose tissue lipid metabolism. *Aging Cell*. 2018;17(5):e12810.
81. Khan T, Muise ES, Iyengar P, Wang ZV, Chandalia M, Abate N, et al. Metabolic Dysregulation and Adipose Tissue Fibrosis: Role of Collagen VI. *Mol Cell Biol*. 15 marzo 2009;29(6):1575–91.
82. Minamino T, Orimo M, Shimizu I, Kunieda T, Yokoyama M, Ito T, et al. A crucial role for adipose tissue p53 in the regulation of insulin resistance. *Nat Med*. settembre 2009;15(9):1082–7.
83. Serrano R, Villar M, Gallardo N, Carrascosa JM, Martinez C, Andrés A. The effect of aging on insulin signalling pathway is tissue dependent: Central role of adipose tissue in the insulin resistance of aging. *Mech Ageing Dev*. 1 marzo 2009;130(3):189–97.
84. Stienstra R, Joosten LAB, Koenen T, van Tits B, van Diepen JA, van den Berg SAA, et al. The inflammasome-mediated caspase-1 activation controls adipocyte differentiation and insulin sensitivity. *Cell Metab*. 1 dicembre 2010;12(6):593–605.
85. Ballak DB, Stienstra R, Tack CJ, Dinarello CA, van Diepen JA. IL-1 family members in the pathogenesis and treatment of metabolic disease: Focus on adipose

- tissue inflammation and insulin resistance. *Cytokine*. ottobre 2015;75(2):280–90.
86. Bapat SP, Myoung Suh J, Fang S, Liu S, Zhang Y, Cheng A, et al. Depletion of fat-resident Treg cells prevents age-associated insulin resistance. *Nature*. 3 dicembre 2015;528(7580):137–41.
87. Fasshauer M, Blüher M. Adipokines in health and disease. *Trends Pharmacol Sci*. luglio 2015;36(7):461–70.
88. Yu YH, Zhu H. Chronological changes in metabolism and functions of cultured adipocytes: a hypothesis for cell aging in mature adipocytes. *Am J Physiol-Endocrinol Metab*. 1 marzo 2004;286(3):E402–10.
89. Zoico E, Di Francesco V, Oliosio D, Fratta Pasini AM, Sepe A, Bosello O, et al. In vitro aging of 3T3-L1 mouse adipocytes leads to altered metabolism and response to inflammation. *Biogerontology*. febbraio 2010;11(1):111–22.
90. Hubbard RE, O'Mahony MS, Calver BL, Woodhouse KW. Nutrition, inflammation, and leptin levels in aging and frailty. *J Am Geriatr Soc*. febbraio 2008;56(2):279–84.
91. Balaskó M, Soós S, Székely M, Pétervári E. Leptin and aging: Review and questions with particular emphasis on its role in the central regulation of energy balance. *J Chem Neuroanat*. novembre 2014;61–62:248–55.
92. Gabriely I, Ma XH, Yang XM, Rossetti L, Barzilai N. Leptin resistance during aging is independent of fat mass. *Diabetes*. aprile 2002;51(4):1016–21.
93. Furukawa S, Fujita T, Shimabukuro M, Iwaki M, Yamada Y, Nakajima Y, et al. Increased oxidative stress in obesity and its impact on metabolic syndrome. *J Clin Invest*. dicembre 2004;114(12):1752–61.
94. Suganami T, Ogawa Y. Adipose tissue macrophages: their role in adipose tissue remodeling. *J Leukoc Biol*. 2010;88(1):33–9.
95. Findeisen HM, Pearson KJ, Gizard F, Zhao Y, Qing H, Jones KL, et al. Oxidative Stress Accumulates in Adipose Tissue during Aging and Inhibits Adipogenesis. *PLoS ONE* [Internet]. 14 aprile 2011 [citato 9 marzo 2020];6(4). Disponibile su: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3077372/>
96. Mori MA, Raghavan P, Thomou T, Boucher J, Robida-Stubbs S, Macotela Y, et al. Role of microRNA Processing in Adipose Tissue in Stress Defense and Longevity. *Cell Metab*. 5 settembre 2012;16(3):336–47.

97. Mori MA, Thomou T, Boucher J, Lee KY, Lallukka S, Kim JK, et al. Altered miRNA processing disrupts brown/white adipocyte determination and associates with lipodystrophy. *J Clin Invest.* agosto 2014;124(8):3339–51.
98. Frontera WR, Ochala J. Skeletal muscle: a brief review of structure and function. *Calcif Tissue Int.* marzo 2015;96(3):183–95.
99. Schiaffino S, Reggiani C. Fiber types in mammalian skeletal muscles. *Physiol Rev.* ottobre 2011;91(4):1447–531.
100. Lee JH, Jun HS. Role of Myokines in Regulating Skeletal Muscle Mass and Function. *Front Physiol.* 2019;10:42.
101. Aversa Z, Zhang X, Fielding RA, Lanza I, LeBrasseur NK. The clinical impact and biological mechanisms of skeletal muscle aging. *Bone.* ottobre 2019;127:26–36.
102. Gomes MJ, Martinez PF, Pagan LU, Damatto RL, Cezar MDM, Lima ARR, et al. Skeletal muscle aging: influence of oxidative stress and physical exercise. *Oncotarget.* 21 marzo 2017;8(12):20428–40.
103. Narici MV, Maganaris CN, Reeves ND, Capodaglio P. Effect of aging on human muscle architecture. *J Appl Physiol Bethesda Md* 1985. dicembre 2003;95(6):2229–34.
104. Thom JM, Morse CI, Birch KM, Narici MV. Influence of muscle architecture on the torque and power-velocity characteristics of young and elderly men. *Eur J Appl Physiol.* luglio 2007;100(5):613–9.
105. Cruz-Jentoft AJ, Bahat G, Bauer J, Boirie Y, Bruyère O, Cederholm T, et al. Sarcopenia: revised European consensus on definition and diagnosis. *Age Ageing.* 1 gennaio 2019;48(1):16–31.
106. von Haehling S, Morley JE, Anker SD. An overview of sarcopenia: facts and numbers on prevalence and clinical impact. *J Cachexia Sarcopenia Muscle.* dicembre 2010;1(2):129–33.
107. Borkan GA, Hults DE, Gerzof SG, Robbins AH, Silbert CK. Age changes in body composition revealed by computed tomography. *J Gerontol.* novembre 1983;38(6):673–7.
108. Walrand S, Guillet C, Salles J, Cano N, Boirie Y. Physiopathological mechanism of sarcopenia. *Clin Geriatr Med.* agosto 2011;27(3):365–85.

109. Donini LM, Busetto L, Bischoff SC, Cederholm T, Ballesteros-Pomar MD, Batsis JA, et al. Definition and Diagnostic Criteria for Sarcopenic Obesity: ESPEN and EASO Consensus Statement. *Obes Facts*. 2022;15(3):321–35.
110. Zamboni M, Mazzali G, Brunelli A, Saatchi T, Urbani S, Giani A, et al. The Role of Crosstalk between Adipose Cells and Myocytes in the Pathogenesis of Sarcopenic Obesity in the Elderly. *Cells*. 25 ottobre 2022;11(21):3361.
111. Nilwik R, Snijders T, Leenders M, Groen BBL, van Kranenburg J, Verdijk LB, et al. The decline in skeletal muscle mass with aging is mainly attributed to a reduction in type II muscle fiber size. *Exp Gerontol*. maggio 2013;48(5):492–8.
112. Lee WS, Cheung WH, Qin L, Tang N, Leung KS. Age-associated decrease of type IIA/B human skeletal muscle fibers. *Clin Orthop*. settembre 2006;450:231–7.
113. Cohen S, Nathan JA, Goldberg AL. Muscle wasting in disease: molecular mechanisms and promising therapies. *Nat Rev Drug Discov*. gennaio 2015;14(1):58–74.
114. Wilkes EA, Selby AL, Atherton PJ, Patel R, Rankin D, Smith K, et al. Blunting of insulin inhibition of proteolysis in legs of older subjects may contribute to age-related sarcopenia. *Am J Clin Nutr*. novembre 2009;90(5):1343–50.
115. McKinnell IW, Rudnicki MA. Molecular mechanisms of muscle atrophy. *Cell*. 29 dicembre 2004;119(7):907–10.
116. Marzetti E, Hwang JCY, Lees HA, Wohlgemuth SE, Dupont-Versteegden EE, Carter CS, et al. Mitochondrial death effectors: Relevance to sarcopenia and disuse muscle atrophy. *Biochim Biophys Acta*. marzo 2010;1800(3):235–44.
117. Imbesi R, D’Agata V, Musumeci G, Castrogiovanni P. [Skeletal muscle: from development to function]. *Clin Ter*. 2014;165(1):47–56.
118. Marzetti E, Calvani R, Cesari M, Buford TW, Lorenzi M, Behnke BJ, et al. Mitochondrial dysfunction and sarcopenia of aging: from signaling pathways to clinical trials. *Int J Biochem Cell Biol*. ottobre 2013;45(10):2288–301.
119. Morgan JE, Partridge TA. Muscle satellite cells. *Int J Biochem Cell Biol*. agosto 2003;35(8):1151–6.
120. Verdijk LB, Snijders T, Drost M, Delhaas T, Kadi F, van Loon LJC. Satellite cells in human skeletal muscle; from birth to old age. *Age Dordr Neth*.



aprile 2014;36(2):545–7.

121. Biressi S, Miyabara EH, Gopinath SD, M. Carlig PM, Rando TA. A Wnt-TGF $\beta$ 2 axis induces a fibrogenic program in muscle stem cells from dystrophic mice. *Sci Transl Med.* 17 dicembre 2014;6(267):267ra176-267ra176.

122. Beggs ML, Nagarajan R, Taylor-Jones JM, Nolen G, MacNicol M, Peterson CA. Alterations in the TGF $\beta$  signaling pathway in myogenic progenitors with age. *Aging Cell.* 2004;3(6):353–61.

123. Kragstrup TW, Kjaer M, Mackey AL. Structural, biochemical, cellular, and functional changes in skeletal muscle extracellular matrix with aging. *Scand J Med Sci Sports.* 2011;21(6):749–57.

124. Delbono O. Neural control of aging skeletal muscle. *Aging Cell.* febbraio 2003;2(1):21–9.

125. Clark BC, Taylor JL, Hong SL, Law TD, Russ DW. Weaker Seniors Exhibit Motor Cortex Hypoexcitability and Impairments in Voluntary Activation. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci.* settembre 2015;70(9):1112–9.

126. Drey M, Grösch C, Neuwirth C, Bauer JM, Sieber CC. The Motor Unit Number Index (MUNIX) in sarcopenic patients. *Exp Gerontol.* aprile 2013;48(4):381–4.

127. van Niel G, Carter DRF, Clayton A, Lambert DW, Raposo G, Vader P. Challenges and directions in studying cell–cell communication by extracellular vesicles. *Nat Rev Mol Cell Biol.* maggio 2022;23(5):369–82.

128. György B, Szabó TG, Pásztói M, Pál Z, Misják P, Aradi B, et al. Membrane vesicles, current state-of-the-art: emerging role of extracellular vesicles. *Cell Mol Life Sci CMLS.* agosto 2011;68(16):2667–88.

129. Théry C, Witwer KW, Aikawa E, Alcaraz MJ, Anderson JD, Andriantsitohaina R, et al. Minimal information for studies of extracellular vesicles 2018 (MISEV2018): a position statement of the International Society for Extracellular Vesicles and update of the MISEV2014 guidelines. *J Extracell Vesicles.* 2018;7(1):1535750.

130. Abels ER, Breakefield XO. Introduction to Extracellular Vesicles: Biogenesis, RNA Cargo Selection, Content, Release, and Uptake. *Cell Mol Neurobiol.* aprile 2016;36(3):301–12.

131. Huang-Doran I, Zhang CY, Vidal-Puig A. Extracellular Vesicles: Novel Mediators of Cell Communication In Metabolic Disease. *Trends Endocrinol Metab TEM*. gennaio 2017;28(1):3–18.
132. Xu X, Lai Y, Hua ZC. Apoptosis and apoptotic body: disease message and therapeutic target potentials. *Biosci Rep*. 31 gennaio 2019;39(1):BSR20180992.
133. Akbar N, Azzimato V, Choudhury RP, Aouadi M. Extracellular vesicles in metabolic disease. *Diabetologia*. dicembre 2019;62(12):2179–87.
134. Liangsupree T, Multia E, Riekkola ML. Modern isolation and separation techniques for extracellular vesicles. *J Chromatogr A*. 11 gennaio 2021;1636:461773.
135. Momen-Heravi F, Balaj L, Alian S, Tigges J, Toxavidis V, Ericsson M, et al. Alternative methods for characterization of extracellular vesicles. *Front Physiol*. 2012;3:354.
136. Wilhelmsen A, Tsintzas K, Jones SW. Recent advances and future avenues in understanding the role of adipose tissue cross talk in mediating skeletal muscle mass and function with ageing. *GeroScience*. 1 febbraio 2021;43(1):85–110.
137. Le Lay S, Rome S, Loyer X, Nieto L. Adipocyte-derived extracellular vesicles in health and diseases: Nano-packages with vast biological properties. *FASEB BioAdvances*. 2021;3(6):407–19.
138. Severinsen MCK, Pedersen BK. Muscle–Organ Crosstalk: The Emerging Roles of Myokines. *Endocr Rev*. 1 agosto 2020;41(4):594–609.
139. Huang Z, Xu A. Adipose Extracellular Vesicles in Intercellular and Inter-Organ Crosstalk in Metabolic Health and Diseases. *Front Immunol [Internet]*. 2021 [citato 15 agosto 2022];12. Disponibile su: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fimmu.2021.608680>
140. Marcelin G, Chua S. Contributions Of Adipocyte Lipid Metabolism To Body Fat Content And Implications For The Treatment Of Obesity. *Curr Opin Pharmacol*. ottobre 2010;10(5):588–93.
141. Zoico E, Policastro G, Rizzatti V, Nori N, Darra E, Rossi AP, et al. Mechanisms of adipose tissue extracellular matrix alterations in an in vitro model of adipocytes hypoxia and aging. *Mech Ageing Dev*. 1 dicembre 2020;192:111374.
142. Pinel A, Rigaudière JP, Jouve C, Capel F. Modulation of Insulin Resistance

and the Adipocyte-Skeletal Muscle Cell Cross-Talk by LCn-3PUFA. *Int J Mol Sci.* settembre 2018;19(9):2778.

143. Dietze D, Koenen M, Röhrig K, Horikoshi H, Hauner H, Eckel J. Impairment of Insulin Signaling in Human Skeletal Muscle Cells by Co-Culture With Human Adipocytes. *Diabetes.* 1 agosto 2002;51(8):2369–76.

144. Pellegrinelli V, Rouault C, Rodriguez-Cuenca S, Albert V, Edom-Vovard F, Vidal-Puig A, et al. Human Adipocytes Induce Inflammation and Atrophy in Muscle Cells During Obesity. *Diabetes.* settembre 2015;64(9):3121–34.

145. Bodine SC, Baehr LM. Skeletal muscle atrophy and the E3 ubiquitin ligases MuRF1 and MAFbx/atrogen-1. *Am J Physiol-Endocrinol Metab.* 5 agosto 2014;307(6):E469–84.

146. Foletta VC, White LJ, Larsen AE, Léger B, Russell AP. The role and regulation of MAFbx/atrogen-1 and MuRF1 in skeletal muscle atrophy. *Pflug Arch - Eur J Physiol.* 1 marzo 2011;461(3):325–35.

147. Morley JE, Baumgartner RN, Roubenoff R, Mayer J, Nair KS. Sarcopenia. *J Lab Clin Med.* 1 aprile 2001;137(4):231–43.

148. Agarwal M, Sharma A, Kumar P, Kumar A, Bharadwaj A, Saini M, et al. Myosin heavy chain-embryonic regulates skeletal muscle differentiation during mammalian development. *Development [Internet].* 6 aprile 2020 [citato 1 agosto 2021];147(7). Disponibile su: <https://doi.org/10.1242/dev.184507>

149. Zammit PS. Function of the myogenic regulatory factors Myf5, MyoD, Myogenin and MRF4 in skeletal muscle, satellite cells and regenerative myogenesis. *Semin Cell Dev Biol.* 1 dicembre 2017;72:19–32.

150. Kim H, Jang M, Park R, Jo D, Choi I, Choe J, et al. Conessine Treatment Reduces Dexamethasone-Induced Muscle Atrophy by Regulating MuRF1 and Atrogen-1 Expression. *J Microbiol Biotechnol.* 2018;28(4):520–6.

151. Zoico E, Rizzatti V, Policastro G, Tebon M, Darra E, Rossi AP, et al. In vitro model of chronological aging of adipocytes: Interrelationships with hypoxia and oxidation. *Exp Gerontol.* 1 luglio 2019;121:81–90.

152. Zoico E, Rossi A, Di Francesco V, Sepe A, Oliosio D, Pizzini F, et al. Adipose Tissue Infiltration in Skeletal Muscle of Healthy Elderly Men: Relationships With Body Composition, Insulin Resistance, and Inflammation at the

- Systemic and Tissue Level. *J Gerontol Ser A*. 1 marzo 2010;65A(3):295–9.
153. Zoico E, Rizzatti V, Policastro G, Tebon M, Darra E, Rossi AP, et al. In vitro model of chronological aging of adipocytes: Interrelationships with hypoxia and oxidation. *Exp Gerontol*. 1 luglio 2019;121:81–90.
154. Lee SJ. Regulation of Muscle Mass by Myostatin. *Annu Rev Cell Dev Biol*. 2004;20(1):61–86.
155. Langley B, Thomas M, Bishop A, Sharma M, Gilmour S, Kambadur R. Myostatin Inhibits Myoblast Differentiation by Down-regulating MyoD Expression\*. *J Biol Chem*. 20 dicembre 2002;277(51):49831–40.
156. Ríos R, Carneiro I, Arce VM, Devesa J. Myostatin is an inhibitor of myogenic differentiation. *Am J Physiol-Cell Physiol*. 1 maggio 2002;282(5):C993–9.
157. Guo T, Jou W, Chanturiya T, Portas J, Gavrilova O, McPherron AC. Myostatin Inhibition in Muscle, but Not Adipose Tissue, Decreases Fat Mass and Improves Insulin Sensitivity. *PLOS ONE*. 19 marzo 2009;4(3):e4937.
158. Taylor WE, Bhasin S, Artaza J, Byhower F, Azam M, Willard DH, et al. Myostatin inhibits cell proliferation and protein synthesis in C2C12 muscle cells. *Am J Physiol-Endocrinol Metab*. 1 febbraio 2001;280(2):E221–8.
159. Trendelenburg AU, Meyer A, Rohner D, Boyle J, Hatakeyama S, Glass DJ. Myostatin reduces Akt/TORC1/p70S6K signaling, inhibiting myoblast differentiation and myotube size. *Am J Physiol-Cell Physiol*. 1 giugno 2009;296(6):C1258–70.
160. Ji R, Akashi H, Drosatos K, Liao X, Jiang H, Kennel PJ, et al. Increased de novo ceramide synthesis and accumulation in failing myocardium. *JCI Insight* [Internet]. [citato 16 maggio 2020];2(9). Disponibile su: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5414571/>
161. Bo Li Z, Zhang J, Wagner KR. Inhibition of myostatin reverses muscle fibrosis through apoptosis. *J Cell Sci*. 1 settembre 2012;125(17):3957–65.
162. Gonzalez D, Brandan E. CTGF/CCN2 from Skeletal Muscle to Nervous System: Impact on Neurodegenerative Diseases. *Mol Neurobiol*. 1 agosto 2019;56(8):5911–6.
163. Morales MG, Cabrera D, Céspedes C, Vio CP, Vazquez Y, Brandan E, et

- al. Inhibition of the angiotensin-converting enzyme decreases skeletal muscle fibrosis in dystrophic mice by a diminution in the expression and activity of connective tissue growth factor (CTGF/CCN-2). *Cell Tissue Res.* 1 luglio 2013;353(1):173–87.
164. Rebolledo DL, González D, Faundez-Contreras J, Contreras O, Vio CP, Murphy-Ullrich JE, et al. Denervation-induced skeletal muscle fibrosis is mediated by CTGF/CCN2 independently of TGF- $\beta$ . *Matrix Biol.* 1 settembre 2019;82:20–37.
165. Nishida T, Kubota S, Aoyama E, Janune D, Lyons KM, Takigawa M. CCN family protein 2 (CCN2) promotes the early differentiation, but inhibits the terminal differentiation of skeletal myoblasts. *J Biochem (Tokyo).* 1 febbraio 2015;157(2):91–100.
166. Córdova G, Rochard A, Riquelme-Guzmán C, Cofré C, Scherman D, Bigey P, et al. SMAD3 and SP1/SP3 Transcription Factors Collaborate to Regulate Connective Tissue Growth Factor Gene Expression in Myoblasts in Response to Transforming Growth Factor  $\beta$ . *J Cell Biochem.* 2015;116(9):1880–7.
167. Xu M, Pirtskhalava T, Farr JN, Weigand BM, Palmer AK, Weivoda MM, et al. Senolytics improve physical function and increase lifespan in old age. *Nat Med.* 1 agosto 2018;24(8):1246–56.
168. Kobori M, Takahashi Y, Sakurai M, Akimoto Y, Tsushida T, Oike H, et al. Quercetin suppresses immune cell accumulation and improves mitochondrial gene expression in adipose tissue of diet-induced obese mice. *Mol Nutr Food Res.* 2016;60(2):300–12.
169. Yang JY, Della-Fera MA, Rayalam S, Ambati S, Hartzell DL, Park HJ, et al. Enhanced inhibition of adipogenesis and induction of apoptosis in 3T3-L1 adipocytes with combinations of resveratrol and quercetin. *Life Sci.* 2008;82(19):1032–9.
170. Le NH, Kim CS, Park T, Park JHY, Sung MK, Lee DG, et al. Quercetin Protects against Obesity-Induced Skeletal Muscle Inflammation and Atrophy. *Mediators Inflamm.* 28 dicembre 2014;2014:e834294.
171. Aswad H, Forterre A, Wiklander OPB, Vial G, Danty-Berger E, Jalabert A, et al. Exosomes participate in the alteration of muscle homeostasis during lipid-

- induced insulin resistance in mice. *Diabetologia*. ottobre 2014;57(10):2155–64.
172. Camino T, Lago-Baameiro N, Bravo SB, Sueiro A, Couto I, Santos F, et al. Vesicles Shed by Pathological Murine Adipocytes Spread Pathology: Characterization and Functional Role of Insulin Resistant/Hypertrophied Adiposomes. *Int J Mol Sci*. 24 marzo 2020;21(6):E2252.
173. Mitchell R, Mellows B, Sheard J, Antonioli M, Kretz O, Chambers D, et al. Secretome of adipose-derived mesenchymal stem cells promotes skeletal muscle regeneration through synergistic action of extracellular vesicle cargo and soluble proteins. *Stem Cell Res Ther*. 5 aprile 2019;10(1):116.
174. Aswad H, Jalabert A, Rome S. Depleting extracellular vesicles from fetal bovine serum alters proliferation and differentiation of skeletal muscle cells in vitro. *BMC Biotechnol*. 2 aprile 2016;16:32.
175. Josan C, Kakar S, Raha S. Matrigel® enhances 3T3-L1 cell differentiation. *Adipocyte*. dicembre 2021;10(1):361–77.
176. Denes LT, Riley LA, Mijares JR, Arboleda JD, McKee K, Esser KA, et al. Culturing C2C12 myotubes on micromolded gelatin hydrogels accelerates myotube maturation. *Skelet Muscle*. 7 giugno 2019;9(1):17.
177. Durcin M, Fleury A, Taillebois E, Hilairet G, Krupova Z, Henry C, et al. Characterisation of adipocyte-derived extracellular vesicle subtypes identifies distinct protein and lipid signatures for large and small extracellular vesicles. *J Extracell Vesicles*. 2017;6(1):1305677.