

UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI VERONA
DIPARTIMENTO DI MEDICINA
SCUOLA DI DOTTORATO DI SCIENZE DELLA VITA E DELLA SALUTE

DOTTORATO DI RICERCA IN
SCIENZE BIOMEDICHE CLINICHE E SPERIMENTALI

XXXII ciclo

S.S.D. MED/09

Con il contributo della Fondazione Cariverona

ALTERATA REGOLAZIONE DEI COMPONENTI DELLA MATRICE EXTRACEL-
LULARE (ECM) E DELLE CAVEOLE NEGLI ADIPOCITI INVECCHIATI: STUDIO
IN VITRO ED EX VIVO.

Coordinatore: Prof. Giovanni Targher

Tutor: Prof. Mauro Zamboni

Correlatore: Dott.ssa Elena Zoico

Dottoranda: Gabriella Policastro

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.

SOMMARIO

L'invecchiamento si associa a disfunzione del tessuto adiposo con alterata secrezione di citochine e chemochine proinfiammatorie ed un aumento del fenotipo secretorio associato alla senescenza (SASP). È stato dimostrato che l'aumento dell'espressione dei collagene I-VI da parte degli adipociti ipertrofici e disfunzionali contribuisce ad aumentare la fibrosi della matrice extracellulare (ECM), peggiorando la disfunzione degli adipociti stessi. L'invecchiamento, inoltre, si associa ad ipossia tissutale ed è noto che anche l'ipossia stessa può determinare lo sviluppo della fibrosi in diversi tessuti. Inoltre, in altri tipi di cellule (come monociti e cellule epiteliali polmonari) è stato descritto che l'espressione ridotta della caveolina 1 può essere collegata ad uno stato infiammatorio, ad un aumento della deposizione di collagene ed alla fibrosi. Pertanto, lo scopo di questo studio è stato quello di valutare i marker di fibrosi e delle caveole in un modello sperimentale in vitro d'invecchiamento degli adipociti in condizioni standard e dopo stimolo ipossico. Inoltre, abbiamo cercato di studiare la relazione "fibrosi-caveole" in campioni di tessuto adiposo epicardico (EAT) di soggetti con e senza aterosclerosi coronarica (CAD e non CAD).

Nel nostro modello sperimentale in vitro sono stati studiati adipociti 3T3-L1 maturi (PID 10) e invecchiati (PID 18); inoltre come modello di invecchiamento precoce sono stati studiati gli effetti di uno stimolo ipossico severo in adipociti maturi a PID 10. È stato riscontrato, mediante il saggio della β -Galattosidasi ed analisi Western blot, un aumento significativo del numero di cellule senescenti, un aumento della proteina p53 e una diminuzione della proteina SIRT 1 sia negli adipociti maturi 3T3L1 sottoposti a condizione d'ipossia (adipociti HYPO PID 10) sia negli adipociti 3T3L1 invecchiati (adipociti PID 18). Inoltre, l'area degli adipociti e il contenuto lipidico medio, analizzati mediante colorazione Oil Red O, aumentavano durante l'invecchiamento mentre in condizioni ipossiche diminuivano significativamente. Gli adipociti PID 10 HYPO e gli adipociti PID 18 mostravano anche un accumulo significativamente maggiore di ROS intracellulari rispetto ai relativi controlli ($p < 0,001$). Inoltre, mediante analisi Real-Time si è visto che l'espressione dei geni che codificano per l'adiponectina e la Caveolina1 era ridotta mentre l'espressione di geni codificanti per citochine proinfiammatorie (IL 6) e per componenti

ECM (coll1a1, col6a3, laminin4a, MMP11) risultava aumentata in adipociti invecchiati ed in adipociti maturi sottoposti ad ipossia. L'analisi in immunofluorescenza ha mostrato un aumento del collagene VIa3 ed una contemporanea significativa riduzione di Cav1 durante l'invecchiamento degli adipociti ed in condizioni d'ipossia. Inoltre, le analisi di Western Blot hanno dimostrato parallelamente alla riduzione di Cav 1, una maggior attivazione di ERK Pathway in assenza di alcuna modulazione per PI3k / AKT Pathway. Infine, nei campioni di EAT di soggetti coronaropatici e non si osservava, dopo analisi immunoistochimica e dopo colorazione tricromica Masson, un aumento della fibrosi stromale, un aumento dei nuclei HIF1 α positivi ed una riduzione significativa ($p < 0,01$) dell'espressione di Cav1 nell'EAT dei pazienti CAD rispetto a non CAD.

In conclusione, dato che i nostri risultati sull'analisi del tessuto adiposo epicardico umano confermano i dati nel modello in vitro e mostrano una associazione tra Caveolina1, fibrosi stromale e invecchiamento, il nostro modello in vitro d'invecchiamento fisiologico e d'invecchiamento precoce degli adipociti potrebbe essere potenzialmente utile per testare gli effetti di diversi approcci terapeutici finalizzati alla riduzione della disfunzione del tessuto adiposo ed alla riduzione dei processi profibrotici e pro-infiammatori mediante l'up-regolazione delle caveole, portando così ad un miglioramento in termini di salute e della vita.

ABSTRACT

Aging is associated with dysfunction of adipose tissue with altered secretion of cytokines and proinflammatory chemokines and an increase in the secretory phenotype associated with senescence (SASP). It has been shown that the increase of collagen I-VI expression by hypertrophic and dysfunctional adipocytes contributes to increasing the fibrosis of the extracellular matrix (ECM), worsening the dysfunction of the adipocytes themselves. Aging is also associated with hypoxic tissues and it is known that hypoxia itself can also determine the development of fibrosis in different tissues. Furthermore, in other cell types (such as monocytes and pulmonary epithelial cells) it has been described that reduced expression of caveolin 1 can be linked to an inflammatory state, increase in collagen deposition and fibrosis. Therefore, the aim of this study was to evaluate fibrosis and caveolae markers in an in vitro model of aging adipocyte cultured in standard conditions and after hypoxic stimulation. Furthermore, we tried to study the "fibrosis-caveole" relationship in epicardial adipose tissue (EAT) samples of subjects with and without coronary atherosclerosis (CAD and not-CAD).

In our in vitro model, 3T3-L1 mature (PID 10) and aged (PID 18) adipocytes have been studied; furthermore, as a premature aging model, the effects of a severe hypoxic stimulus in mature PID 10 adipocytes have been studied. A significant increase in the number of senescent cells, an increase in p53 protein and a decrease in SIRT protein 1 in both 3T3L1 mature adipocytes under hypoxic condition (PID 10 HYPO adipocytes) and aged 3T3L1 adipocyte (PID 18 adipocytes) were detected by the β -Galactosidase assay and Western blot analysis. Furthermore, area of adipocytes and the average lipid content, analyzed by Oil Red O staining, increased during aging while in hypoxic conditions they decreased significantly. PID 10 HYPO adipocytes and PID 18 adipocytes also showed a significantly greater accumulation of intracellular ROSs than the related controls ($p < 0.001$). Furthermore, it was found, by Real-Time analysis, that the expression of the genes coding for adiponectin and Caveolin1 was reduced while the expression of genes coding for proinflammatory cytokines (IL 6) and for ECM components (coll1a1, col6a3, laminin4a, MMP11) was increased in aged adipocytes and in mature adipocytes sub-

jected to hypoxia. The immunofluorescence analysis showed an increase in collagen VIa3 and a simultaneous significant reduction of Cav1 during aging of adipocyte and in hypoxic conditions. Furthermore, the Western Blot results demonstrated, following the reduction of Cav 1, a greater activation of ERK Pathway in the absence of any modulation for PI3k / AKT Pathway. Finally, it was found, using immunohistochemical analysis and Masson's trichrome staining, a significant reduction ($p < 0.01$) of the Cav1 expression, an increase of HIF1 α positive and an increase in stromal fibrosis in EAT samples of CAD patients compared to not-CAD patients. In conclusion, given that our results on the analysis of human epicardial adipose tissue confirm the data obtained with the in vitro model and show an association between Ca-veolina1, stromal fibrosis and aging, our in vitro model of physiological aging and premature aging adipocytes could be potentially useful for testing the effects of different therapeutic approaches aimed at reducing adipose tissue dysfunction and reducing pro-fibrotic and pro-inflammatory processes through the regulation of caveolae, thus leading to a improvement in terms of health and life.

INDICE

| | |
|---|----|
| 1. <u>INTRODUZIONE</u> | 10 |
| 1.1 <i>L'invecchiamento</i> | 10 |
| 1.2 <i>Il tessuto adiposo e l'invecchiamento</i> | 11 |
| 1.2.1 <i>Il legame tra invecchiamento ed obesità</i> | 13 |
| 1.2.2 <i>Il ruolo di SIRT1 nell'invecchiamento del tessuto adiposo</i> | 13 |
| 1.2.3 <i>Il tessuto adiposo invecchiato e l'ipossia</i> | 14 |
| 1.3 <i>La Matrice Extracellulare (ECM) degli adipociti</i> | 15 |
| 1.4 <i>La fibrosi del tessuto adiposo</i> | 17 |
| 1.4.1 <i>Il ruolo di HIF1α nello sviluppo della fibrosi</i> | 18 |
| 1.5 <i>Il tessuto adiposo epicardico (EAT) ed il legame con le Coronaropatie</i> | 19 |
| 1.5.1 <i>Anatomia e fisiologia dell'EAT</i> | 20 |
| 1.5.2 <i>Il ruolo dell'EAT nell'Aterosclerosi Coronarica (CAD)</i> | 21 |
| 1.5.3 <i>L'EAT e la fibrosi</i> | 21 |
| 1.6 <i>Le Caveole</i> | 22 |
| 1.6.1 <i>Le Caveoline e le Cavine</i> | 23 |
| 1.6.2 <i>Ruolo delle Caveoline e delle Cavine nelle patologie umane</i> | 23 |
| 1.6.3 <i>La Caveolina 1</i> | 24 |

| | | |
|---------|---|----|
| 1.6.4 | <i>Ruolo della Caveolina 1 nelle patologie umane</i> | 26 |
| 1.6.4.1 | <i>Trasformazione cellulare e tumorigenesi</i> | 26 |
| 1.6.4.2 | <i>Metabolismo del glucosio, segnalazione d'isulina e diabete</i> | 27 |
| 1.6.4.3 | <i>Infiammazione</i> | 28 |
| 1.6.4.4 | <i>Fibrosi</i> | 29 |
| 2. | <u>SCOPO DELLA TESI</u> | 30 |
| 3. | <u>MATERIALI E METODI</u> | 31 |
| 3.1 | <i>Colture cellulari</i> | 31 |
| 3.2 | <i>Induzione ipossia severa</i> | 31 |
| 3.3 | <i>Colorazione Oil Red O</i> | 32 |
| 3.4 | <i>Analisi dei Radicali liberi dell'Ossigeno (ROS)</i> | 32 |
| 3.5 | <i>Analisi della Senescenza</i> | 33 |
| 3.6 | <i>Analisi Immunofluorescenza</i> | 33 |
| 3.7 | <i>Estrazione dell'RNA, sintesi del cDNA e Real Time PCR</i> | 34 |
| 3.8 | <i>Analisi delle proteine mediante Western blot</i> | 35 |
| 3.9 | <i>Soggetti inclusi nello studio</i> | 36 |
| 3.10 | <i>Variabili antropometriche</i> | 36 |
| 3.11 | <i>Campioni di Tessuto Adiposo Epicardico (EAT)</i> | 36 |

| | | |
|------|--|----|
| 3.12 | <i>Analisi Immunoistochimica</i> | 36 |
| 3.13 | <i>Colorazione tricromica Masson per l'analisi della fibrosi</i> | 37 |
| 3.14 | <i>Analisi statistica</i> | 37 |
| 4. | <u>RISULTATI</u> | 38 |
| 5. | <u>DISCUSSIONE</u> | 46 |
| 6. | <u>CONCLUSIONI</u> | 53 |
| 7. | <u>BIBLIOGRAFIA</u> | 54 |

1. INTRODUZIONE

1.1 L'INVECCHIAMENTO:

L'invecchiamento è un processo fisiologico caratterizzato da un graduale declino funzionale a livello molecolare, cellulare, tissutale e di organismo nel suo complesso. Esso si verifica in modo eterogeneo nei diversi organi, causando un progressivo deterioramento che alla fine provoca disfunzione tissutale. Di conseguenza, l'età è un fattore di rischio per molte malattie come le malattie cardiovascolari, la demenza, l'osteoporosi, l'artrosi, il cancro, il diabete di tipo 2, la fibrosi polmonare idiopatica ed il glaucoma.

Nonostante questi legami con le patologie umane, la comprensione di processi d'invecchiamento rimane limitata. Sebbene le sue cause biologiche rimangano in gran parte sconosciute, negli ultimi decenni, gli studi hanno identificato tratti cellulari e molecolari comuni associati all'invecchiamento[1]. L'identificazione dei cosiddetti “segni distintivi dell'invecchiamento” ha contribuito a concettualizzare la ricerca sull'invecchiamento e ha suggerito la prospettiva allettante di sviluppare trattamenti volti a ritardare o prevenire l'insorgenza delle patologie età-correlate.

I segni distintivi dell'invecchiamento possono essere suddivisi in tre categorie: (1) segni primari, ovvero le cause del danno associato all'età; (2) segni antagonisti, ovvero le risposte al danno; e (3) segni integrativi, ovvero le conseguenze delle risposte. La senescenza, una risposta cellulare che limita la proliferazione di cellule invecchiate o danneggiate [2], appartiene alla classe dei segni antagonisti. Sebbene svolga un ruolo fisiologico durante il normale sviluppo e sia necessaria per l'omeostasi dei tessuti, essa costituisce una risposta allo stress innescato da insulti associati all'invecchiamento come l'instabilità genomica e l'accorciamento dei telomeri, considerati segni primari d'invecchiamento. Esiste anche un legame intimo tra senescenza e gli altri segni antagonisti dell'invecchiamento. Ad esempio, le cellule senescenti mostrano una riduzione della mitofagia, con conseguente funzione mitocondriale difettosa, che può contribuire alla disfunzione metabolica legata all'età [3].

Inoltre, la senescenza influenza anche i segni dell'invecchiamento integrativo: Ad esempio, le cellule staminali ematopoietiche (HSC) hanno la funzione di rinnovare

il sistema sanguigno. Le HSC mostrano una ridotta percentuale di successo dopo trapianto quando provenienti da pazienti anziani [4]. Questo declino è correlato all'aumento del numero di HSC senescenti, alla riduzione dell'immunità, alla diminuzione del numero di cellule B e T naive ed alla riduzione dell'attività delle cellule Natural Killer. Il declino delle cellule staminali somatiche non si limita solo ai tessuti ad alto turnover. Le cellule staminali neurali (NSC) hanno una funzionalità ridotta, con limitata capacità di neurogenesi con l'avanzare dell'età. Ciò è contrassegnato da una duplice riduzione del numero di NSC e da una ridotta proliferazione, che si correla con una maggiore espressione dei marcatori di senescenza nelle regioni in cui risiedono le NSC [5]. Inoltre, anche le cellule staminali mesenchimali ed i loro discendenti, le cellule satelliti, i condrociti, gli adipociti e gli osteoclasti, mostrano una ridotta capacità di auto-rinnovarsi con l'età che si correla con l'aumento dei livelli di marcatori di senescenza. Ciò può avere un impatto su patologie associate all'età come la sarcopenia, la cachessia, l'osteoporosi e l'osteoartrite.

Infine, un'altra delle caratteristiche dell'invecchiamento è la comunicazione intracellulare alterata. In particolare, l'infiammazione cronica a basso grado è una condizione caratterizzante per molte patologie età-correlate cronico degenerative. Questo ruolo dannoso dell'infiammazione è supportato dal fatto che alcuni marker infiammatori come l'interleuchina-1 (IL-1) e l'interleuchina-6 (IL-6) sono stati scoperti essere anche marker prognostici di malattie come il diabete di tipo 2 e l'aterosclerosi [6]. Le risposte infiammatorie sono uno dei maggiori effetti estrinseci dell'aumentata presenza di cellule senescenti nei tessuti invecchiati. Infatti, è stato dimostrato che queste cellule acquisiscono uno specifico fenotipo, recentemente definito come SASP (Senescence-Associated Secretory Phenotype), per cui secernono mediatori dell'infiammazione, vasopressori, metalloproteasi di membrana e ROS, responsabili di danno alle cellule vicine, rimodellamento tissutale e richiamo di cellule immunitarie [7].

1.2 IL TESSUTO ADIPOSO E L'INVECCHIAMENTO:

L'organo adiposo, presente in tutti i mammiferi, si configura come un complesso organo endocrino-metabolico. Oltre agli adipociti, esso contiene tessuto connettivo,

tessuto nervoso, cellule stromo-vascolari e cellule immunitarie. Insieme, questi componenti funzionano come un'unità integrata. Infatti, il tessuto adiposo è noto per esprimere e secernere una varietà di peptidi bioattivi, noti come adipochine, che agiscono sia a livello locale (autocrino / paracrino) che sistemico (endocrino). Oltre a questi segnali efferenti, il tessuto adiposo esprime numerosi recettori che gli consentono di rispondere ai segnali afferenti dei sistemi ormonali tradizionali e del sistema nervoso centrale (SNC). Pertanto, oltre al programma biologico necessario per immagazzinare e rilasciare energia, il tessuto adiposo contiene i meccanismi metabolici per consentire la comunicazione con organi distanti tra cui l'SNC. Attraverso questa rete interattiva, il tessuto adiposo è coinvolto nel coordinamento di una varietà di processi biologici tra cui il metabolismo energetico, la funzione neuroendocrina e la funzione immunitaria [8].

Dunque, se si considera che il tessuto adiposo è l'organo endocrino più rappresentato nell'uomo e che svolge numerose funzioni non solo di tipo endocrino, ma anche metabolico ed immunomodulatorio, le sue modificazioni con l'invecchiamento possono giocare un ruolo cruciale nei processi d'invecchiamento. La comprensione delle interazioni tra invecchiamento e tessuto adiposo è, quindi, importante per comprendere le basi fisiopatologiche delle malattie metaboliche e cronico-degenerative età correlate. L'invecchiamento si associa ad importanti modificazioni del tessuto adiposo che diventa disfunzionale con ridotta funzione dei preadipociti, una incrementata secrezione di citochine e chemochine pro-infiammatorie, un aumento dell'infiltrazione di cellule immunitarie ed un numero elevato di cellule senescenti con fenotipo secretorio SASP. Questa disfunzione del tessuto adiposo legata all'età porta ad una resistenza insulinica locale e sistemica, all'infiammazione cronica e ad una redistribuzione del tessuto adiposo nell'organismo con riduzione del grasso sottocutaneo, aumento del grasso viscerale e deposizione di grasso ectopico soprattutto nei muscoli, nel fegato e nel midollo osseo [9]. Dunque, il tessuto adiposo disfunzionale o in eccesso, nel caso di soggetti obesi, sembra accelerare l'insorgenza di numerose patologie correlate all'età (quali il diabete, l'aterosclerosi e la fragilità), mentre gli interventi che ritardano o limitano il ricambio di tessuto adiposo, la sua redistribuzione o disfunzione sono associati a una maggiore durata della salute e alla massima durata della vita [10].

1.2.1 Il legame tra l'invecchiamento ed obesità:

È noto che il rischio di obesità aumenta con l'età. A loro volta, i disturbi metabolici correlati all'obesità possono accelerare il tasso di invecchiamento sistemico e tissutale e portare alla mortalità precoce. Entrambe le condizioni, obesità ed invecchiamento, sono associate ad aumentato rischio di malattie cardiovascolari, diabete, dislipidemia, ipertensione e mortalità. Condividono inoltre un'associazione con infiammazione di basso grado, insulino-resistenza, aumento dei livelli di proteine chemiotattiche e pro-coagulanti a livello di tessuto locale e sistemico, nonché la summenzionata deposizione di lipidi ectopici con successiva lipotossicità [11]. Dunque, una condizione fisiologica, l'invecchiamento, ed uno stato patologico, l'obesità, potrebbero condividere diversi meccanismi causali comuni che, a loro volta, potrebbero essere in gran parte collegati a un tessuto adiposo disfunzionale. Tuttavia, la conoscenza dei meccanismi molecolari attraverso i quali l'obesità possa favorire una senescenza accelerata rimane solo parziale. Alcuni studi in letteratura indicano che l'accumulo di tessuto adiposo disfunzionale possa determinare ipoespressione della Sirtuin 1 (SIRT1), infiammazione e cambiamenti epigenetici, che potrebbero essere alla base del legame tra invecchiamento ed obesità. Pertanto, comprendere l'interazione tra l'invecchiamento accelerato correlato all'obesità e la disfunzione del tessuto adiposo è fondamentale per ottenere informazioni sul processo di invecchiamento in generale, nonché sulla fisiopatologia dell'obesità e di altre condizioni ad esse correlate [10].

1.2.2 Il ruolo di SIRT 1 nell'invecchiamento del Tessuto Adiposo:

Il declino con l'età di SIRT1, una nicotinamide adenina dinucleotide (NAD⁺) deacetilasi, evolutivamente altamente conservata nei mammiferi [12], potrebbe svolgere un ruolo fondamentale anche nella disfunzione del tessuto adiposo come in altre condizioni croniche associate al normale processo di invecchiamento. In virtù della deacetilazione di numerosi substrati (come il recettore-1 α attivato dal proliferatore di perossisoma (PGC-1 α), la FOXO3, la proteina tumorale p53 e la proteina NF- κ B), SIRT1 è in grado di modulare la funzione mitocondriale, l'apoptosi e l'infiammazione. Inoltre svolge un ruolo importante nel metabolismo degli

adipociti. Negli adipociti bianchi, SIRT1 aumenta la mobilizzazione del grasso reprimendo l'attività trascrizionale del recettore- γ attivato dal proliferatore del perossisoma (PPAR- γ) e protegge le cellule dalla resistenza all'insulina indotta dal fattore di necrosi tumorale (TNF) [13]. SIRT1 agisce anche come un modulatore dipendente dai nutrienti dell'infiammazione associata all'obesità nel tessuto adiposo. Un precedente studio ha mostrato una relazione inversa tra i livelli di SIRT1 nel tessuto adiposo e l'infiammazione in questo tessuto [14], cosicché la soppressione di SIRT1 determinava infiammazione ed infiltrazione macrofagica, mentre la sua sovraespressione inibiva tali processi, suggerendo per SIRT1 un ruolo chiave nella regolazione del contenuto di macrofagi del tessuto adiposo in condizioni di obesità e sovralimentazione [15]. Inoltre, l'invecchiamento è anche caratterizzato da uno stato pseudo-ipossico che porta al declino del NAD⁺ e alla bassa attività di SIRT1 [16], in particolare a livello ipotalamico, che a sua volta promuove la resistenza alla leptina e una maggiore adiposità, mentre la restrizione calorica e l'esercizio fisico stimolano l'attività SIRT1 [17].

1.2.3 Il tessuto adiposo invecchiato e l'ipossia:

L'ipossia viene definita come la riduzione o la mancanza di ossigeno ad organi, tessuti o cellule. Questa diminuzione di tensione di ossigeno può essere dovuta ad un apporto ridotto di ossigeno determinato da insufficiente rete di vasi sanguigni, difetto dei vasi sanguigni ed anemia) o ad un aumento del consumo di ossigeno rispetto alla fornitura (causato da un tasso superiore di proliferazione cellulare). L'ipossia può essere fisiologica o patologica, come nei tumori solidi, nell'artrite reumatoide, nell'aterosclerosi, ecc. Ogni tipo di tessuto e di cellula ha una diversa capacità di adattarsi a questa nuova condizione [18].

È noto che lo stress ossidativo e l'ipossia si verificano in una varietà di tessuti durante l'invecchiamento [19] [20], anche se, in passato, non era stato definito se questi eventi si verificassero anche nei depositi di grasso sottocutaneo e viscerale durante l'invecchiamento. È stato dimostrato che sia lo stress ossidativo che l'ipossia si verificano nel tessuto adiposo in risposta all'obesità indotta dalla dieta e nei modelli genetici dell'obesità. In entrambi questi modelli, sia l'ipossia che lo stress ossidativo sono collegati all'alterata funzione adiposa e alla malattia metabolica [21]

[22]. In uno studio di Zhang, L., et al 2011, è stato osservato, per la prima volta, che entrambi questi eventi si verificano nell'invecchiamento del tessuto adiposo e che esiste probabilmente un'ipossia molto localizzata e acuta che si verifica sia nel tessuto adiposo sottocutaneo che in quello viscerale. Questi risultati sembrano quindi suggerire il potenziale aumento, durante l'invecchiamento del tessuto adiposo, dell'ipossia e dello stress ossidativo in grado poi a loro volta di modulare la funzione adiposa [23].

1.3 LA MATRICE EXTRACELLULARE (ECM) DEGLI ADIPOCITI:

Il tessuto adiposo è istologicamente classificato come un tipo di tessuto connettivo lasso e, come tale, il collagene contribuisce considerevolmente alla massa non cellulare di questo tessuto. Almeno in parte, questo collagene è prodotto dagli adipociti, ma possono anche contribuire ad esso le cellule della frazione stromo-vascolare rappresentata dai preadipociti, dalle cellule endoteliali, dai monociti / macrofagi e da una popolazione di cellule staminali multipotenti. Ogni adipocita è circondato da una densa ECM denominata lamina basale che contiene, come componente principale, il collagene di tipo IV [24].

E' stato dimostrato che la differenziazione dei preadipociti in adipociti maturi in grado di immagazzinare grasso è accompagnata da cambiamenti specifici della ECM. La ECM del tessuto adiposo sembra avere caratteristiche simili, in termini di composizione proteica, a quelle di altri tipi di tessuti. È la quantità relativa in cui tali proteine sono presenti che determina la specificità cellulare della ECM. Inoltre, questa composizione è legata alla fase di sviluppo, differenziazione ed alla vitalità degli adipociti. Le due principali classi di proteine ECM sono rappresentate dai proteoglicani e dalle proteine fibrose. I primi studi sulla composizione proteica dell'ECM hanno utilizzato tecniche immunologiche. In questo modo, Aratani e Kitagawa hanno dimostrato la presenza di collagene IV, complessi di laminina e nidogeno (entactina) nell'ECM degli adipociti di topo 3T3-L1 [25]. Nei preadipociti intramuscolari bovini differenziati (BIP), Nakajima et al. hanno mostrato la presenza dei collageni di tipo I-VI, laminina e fibronectina, mentre sulla base della colorazione si è riscontrata una ridotta proporzione di collagene di tipo II [26]. Grazie a numerosi studi di microarray sugli adipociti, complessivamente, 20 subunità

di 12 diversi tipi di collagene sono state identificate in cellule di roditori, mentre le subunità dei collagene II, XI e XXIII non sono state trovate negli adipociti viscerali umani. Ciò potrebbe suggerire differenze per i depositi di grasso tra le specie. Tuttavia, l'incapacità di rilevare una proteina non può essere presa come prova della sua assenza, perché la possibilità di rilevazione dipende dalle caratteristiche biochimiche di una proteina, dalle condizioni sperimentali e dalle tecniche di proteomica impiegate. Rispetto ad altri componenti della ECM, il collagene di tipo VI (formato da tre subunità, $\alpha 1$ (VI), $\alpha 2$ (VI) e $\alpha 3$ (VI), necessarie per la formazione stabile di questo tipo di collagene) sembra essere più specifico per gli adipociti e ci sono prove del suo contributo nella patogenesi dell'obesità. È stato dimostrato che il collagene di tipo VI è in grado di legarsi fortemente al collagene di tipo IV, un componente importante della membrana basale. Entrambi i collagene sono classificati come tipi non fibrillari e la loro interazione media l'ancoraggio della membrana basale alle cellule. È stato anche dimostrato che il collagene VI interagisce con altre proteine della matrice come proteoglicani e fibronectina [23].

Inoltre c'è un costante turnover della ECM anche nelle cellule mature e sembra che gli adipociti spendano molta energia metabolica per il mantenimento della loro ECM. Il grado relativamente elevato di sostituzione di collagene negli adipociti maturi suggerisce che l'ECM è sotto costante ricambio che è mediato da enzimi che promuovono la costruzione della ECM da un lato ed enzimi coinvolti nella sua degradazione dall'altro. Di conseguenza, negli adipociti maturi, si raggiunge un equilibrio tra questi processi, mentre durante la differenziazione dei preadipociti questo equilibrio si sposta verso i fattori pro-sintetici. Gli enzimi pro-sintetici rientrano in due classi: gli enzimi intracellulari coinvolti nella trasformazione di precursori delle proteine ECM e gli inibitori extracellulari degli enzimi di degradazione. Gli enzimi degradanti appartengono a uno dei due sistemi: il sistema fibrinolitico e le metalloproteasi della matrice (MMP). Una delle principali funzioni del tessuto adiposo è il temporaneo immagazzinamento di energia sotto forma di grassi quali i trigliceridi. In caso di un bilancio energetico positivo, i preadipociti differenziano in adipociti maturi con importanti modificazioni della forma cellulare grazie ai cambiamenti che avvengono nella ECM. Negli individui obesi molti adipociti sono ipertrofici e

a questo incremento di dimensioni dell'adipocita dovrebbero corrispondere consensuali modificazioni anche a carico della ECM. E' stato ipotizzato che esista un limite all'ipertrofia degli adipociti e che questo limite sia determinato dalla capacità della cellula di mantenere l'ECM in una condizione tale da proteggere la cellula dalla rottura e mantenerne la struttura. Tuttavia alcuni autori hanno ipotizzato che l'ipertrofia degli adipociti impedisca un adeguato apporto di ossigeno alle cellule creando uno stato d'ipossia tissutale [27] La mancanza di ossigeno è sufficiente ad indurre l'apoptosi di alcune cellule, con la conseguente attrazione dei macrofagi e generazione di uno stato di infiammazione nel tessuto che può far parte della patogenesi di molte malattie correlate all'obesità come il diabete di tipo II. Non si sa molto circa le conseguenze dell'ipossia, ma la ECM può essere coinvolta [24].

1.4 LA FIBROSI DEL TESSUTO ADIPOSO:

Una conseguenza patologica comune alla disregolazione dell'ECM viene definita fibrosi ed è considerata una caratteristica del danno cronico ai tessuti. La fibrosi deriva da uno squilibrio tra l'eccessiva sintesi dei componenti fibrillari, come il collagene I, III e VI, ed una perdita di degradazione di queste proteine [28]. In particolare, è stata osservata un'associazione tra eccessiva deposizione di collagene nel tessuto adiposo e danno infiammatorio del tessuto con infiltrazione di neutrofili, linfociti e macrofagi. Pertanto, esiste un legame tra rimodellamento dell'ECM, sviluppo della fibrosi e la patogenesi dell'infiammazione cronica nel tessuto adiposo [28] [29].

A differenza dell'esistenza della fibrosi in diversi tessuti come l'epidermide, il parenchima polmonare, epatico o renale, l'esistenza della fibrosi nel tessuto adiposo inizialmente non è stata pienamente riconosciuta. Tuttavia, è stato dimostrato, da vari studi sperimentali, che la fibrosi è un segno distintivo di un tessuto adiposo metabolicamente disfunzionale e può essere presente in varie condizioni fisiopatologiche come l'invecchiamento, l'obesità e la lipodistrofia.

L'impatto patologico della rigidità dell'ECM, della conseguente fibrosi e della disfunzione metabolica associata a condizioni come l'obesità è stato studiato in modo approfondito negli ultimi anni [30] [31].

In uno studio di Khan, T. et al. (2009) è stato dimostrato che in circostanze normali, il tessuto adiposo è un tessuto connettivo di bassa densità ed elevata plasticità. Tuttavia, durante la progressione verso una condizione d'obesità, il contenuto di fibre connettive del tessuto adiposo aumenta drammaticamente, a causa di una sovra-regolazione di diversi tipi di collagene. All'aumentare del contenuto di collagene, aumenta anche la rigidità complessiva del tessuto adiposo, contribuendo probabilmente ad un aumento della sua resistenza meccanica. Dunque, nel tessuto adiposo, la fibrosi sembra essere iniziata in risposta all'ipertrofia degli adipociti, determinata da un accumulo di goccioline lipidiche negli adipociti esistenti. Questa espansione cellulare sembra costituire "l'insulto" iniziale, in risposta alla quale viene innescata la sovra-regolazione dei componenti della matrice extracellulare [32].

Interessanti sono anche alcuni studi recentemente condotti in pazienti obesi sottoposti a chirurgia bariatrica. Nei campioni di tessuto adiposo sottocutaneo di soggetti obesi prelevato a distanza di tre mesi dalla chirurgia bariatrica non si riscontrava una riduzione significativa della fibrosi interstiziale, nonostante una significativa down-regolazione dei geni correlati alle risposte infiammatorie e immunitarie e ampie variazioni nell'espressione dei geni coinvolti nel rimodellamento dell'ECM. I risultati di questo studio portano a teorizzare la possibilità di una irreversibilità della fibrosi interstiziale nel WAT, in maniera analoga a quanto descritto in altri tessuti come nel fegato [33].

Il ruolo, invece, della fibrosi nell'ambito della disfunzione del tessuto adiposo età correlata non è stato sinora ben caratterizzato [29]. In uno studio di Donato et al 2014, gli autori hanno dimostrato, per la prima volta, un aumento della fibrosi del tessuto adiposo con l'invecchiamento. Questo aumento associato all'età della fibrosi del tessuto adiposo viscerale potrebbe contribuire all'aumento osservato nell'accumulo di lipidi epatici con conseguente disfunzione sistemica [34].

1.4.1 Il ruolo di HIF1 α nello sviluppo della fibrosi

Diversi studi precedentemente pubblicati hanno dimostrato che l'ipossia è un importante fattore per l'induzione dell'ECM che può influire sullo sviluppo della fibrosi. In uno studio di Halberg N et al. 2009, condotto per studiare l'influenza dell'ipossia locale sullo sviluppo della fibrosi, sono stati utilizzati topi transgenici (HIF1

transgenic ob/ob mice), che esprimevano costitutivamente HIF-1 α attivo (Hypoxia-inducible factor 1-alpha). E' stato dimostrato che l'HIF1 α non si associava ad un'efficace risposta pro-angiogenica nel tessuto adiposo. Invece, la sua presenza, induceva un programma trascrizionale alternativo, che comportava principalmente una maggior sintesi dei componenti dell'ECM (aumento nell'espressione di diversi geni dell'ECM quali col1a1, col3a1, col4a1, col6a1, col18a1, elastina, lumican), portando infine allo sviluppo della fibrosi [35]. E' stato dimostrato che HIF1 α può anche indurre un cambiamento nello stato redox cellulare, che a sua volta può influenzare gli enzimi coinvolti nella reticolazione e stabilizzazione del collagene, come la lisil ossidasi (LOX) e la prolil-4-idrossilasi [24].

Di recente, è stato ulteriormente dimostrato che questa risposta fibrotica nel tessuto adiposo di soggetti obesi può essere efficacemente prevenuta mediante l'utilizzo di un inibitore chimico dell'HIF1 α (PX-478) o mediante sovra-espressione di un mutante HIF1 α negativo dominante [28]. L'inibizione di HIF1 α è associata a miglioramenti metabolici, anche in presenza di un regime alimentare ricco di grassi. In conclusione, questi dati evidenziano ulteriormente il ruolo cruciale di HIF1 α nella risposta fibrotica del tessuto adiposo e come essa rappresenti un aspetto importante della disfunzione del tessuto adiposo associata all'obesità.

1.5 IL TESSUTO ADIPOSO EPICARDICO ED IL LEGAME CON LE CORONAROPATIE

Il tessuto adiposo epicardico umano (EAT) è un tipo di tessuto adiposo viscerale localizzato in stretta prossimità delle camere cardiache. Non è stato studiato in modo approfondito come il tessuto adiposo addominale viscerale ed il tessuto adiposo addominale sottocutaneo. Come altri tipi di tessuto adiposo bianco, l'EAT potrebbe svolgere un ruolo sia come deposito per lo stoccaggio dei lipidi, sia come organo endocrino in grado di secernere ormoni, sia come tessuto infiammatorio secernente citochine e chemochine. La sua vicinanza alla tonaca avventizia delle arterie coronarie (Figura 1) ed al miocardio sottostante suggerisce la possibilità che questo tessuto possa svolgere un ruolo nella patogenesi dell'aterosclerosi coronarica (CAD), essa stessa una malattia infiammatoria cronica, e della cardiomiopatia (OCM) [36].

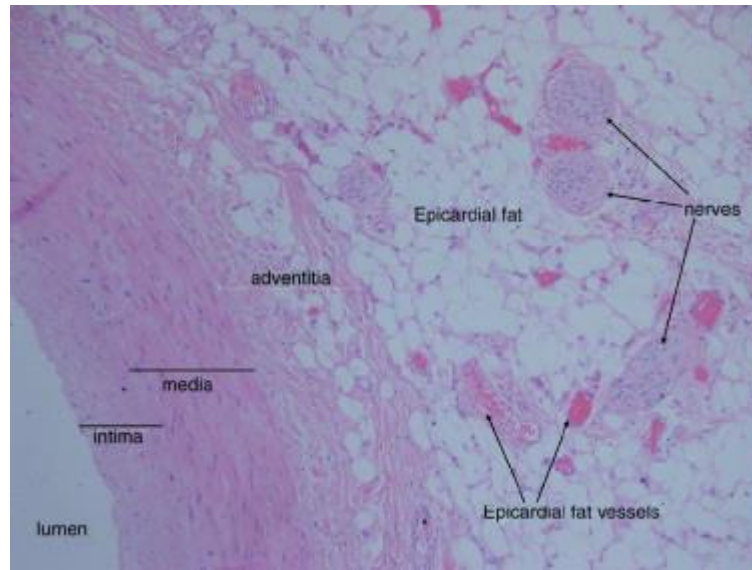


Figura 1: Istologia dell'arteria coronaria destra e del grasso epicardico periadventiziale. Colorazione ematossilina- eosina di una sezione di autopsia trasversale dell'arteria coronaria destra di un paziente con cardiopatia ipertensiva.

1.5.1 Anatomia e fisiologia dell'EAT

L'epicardio o strato viscerale del pericardio è costituito da una popolazione di cellule mesoteliali che migrano sulla superficie del cuore dall'area del setto trasverso (la fonte embriologica del diaframma). Il grasso epicardico, mesenterico e omentale condividono tutti la stessa origine dal mesoderma splancopleurico associato all'intestino. Nell'adulto sano, il grasso epicardico è concentrato nelle scanalature atrio-ventricolari e interventricolari e lungo i rami principali delle arterie coronarie e, in misura minore, attorno agli atri, sopra la parete libera del ventricolo destro e sopra l'apice del ventricolo sinistro.

La lipolisi e la lipogenesi non sono state misurate direttamente nel grasso epicardico umano. Sulla base di tassi di lipolisi e lipogenesi circa 2 volte più alti nel grasso epicardico di cavia (Guinea-pig) rispetto ad altri depositi di grasso, Marchington et al. hanno proposto che EAT serva a catturare e conservare gli acidi grassi liberi intravascolari (FFA) per proteggere i cardiomiociti dall'esposizione ad eccessive concentrazioni di FFA in condizioni di aumentato apporto energetico. In altre condizioni, invece, l'EAT può rilasciare FFA come fonte di ATP immediata per il miocardio durante i periodi di aumentato fabbisogno [36].

1.5.2 Il ruolo di EAT in CAD

L'aterosclerosi coronarica (CAD) è la principale causa di mortalità nella popolazione degli Stati Uniti (uno su sei decessi) e in generale dei paesi occidentali. CAD è una patologia età correlata con una prevalenza del 3,1% nei pazienti di età inferiore ai 50 anni contro il 12,3% nei pazienti di età superiore ai 50 anni. La stenosi dell'arteria coronarica dovuta a placche aterosclerotiche provoca una ridotta perfusione e ischemia miocardica. La rottura della placca è un evento catastrofico che provoca la completa occlusione arteriosa e, entro circa 20 minuti, l'insorgenza della morte progressiva delle cellule cardiache [infarto del miocardio (MI)] a causa della deprivazione di ossigeno [37].

Diversi studi clinici sono stati condotti studiando il ruolo di EAT causa nella patogenesi di CAD. Alcuni studi recenti hanno dimostrato che il tasso di lipolisi e la secrezione di citochine pro-infiammatorie sono più alti nell'EAT rispetto al tessuto adiposo sottocutaneo e omentale. Sebbene l'EAT rappresenti solo l'1% della massa grassa totale, alcuni lavori hanno dimostrato che la quantità di EAT è associata a vari fattori di rischio cardiometabolico, indipendentemente dall'adiposità viscerale intra-addominale. Questi risultati suggeriscono che l'EAT possa influenzare indirettamente lo sviluppo dell'aterosclerosi coronarica attraverso i suoi effetti dismetabolici sistemici [38].

1.5.3 Il tessuto adiposo epicardico e la fibrosi

E' stato dimostrato che la quantità di EAT è aumentata nei pazienti con fibrillazione atriale cronica o con dilatazione atriale. La relazione tra EAT e la gravità dell'aritmia potrebbe essere spiegata dalla secrezione di adipochine secrete da EAT che potrebbero contribuire al rimodellamento strutturale del miocardio atriale con fibrosi. Questa ipotesi è stata testata per la prima volta utilizzando un modello ex vivo di organo coltura atriale di ratto, che ha permesso lo studio degli effetti dei secretomi del tessuto adiposo umano sul miocardio indipendentemente dai fattori di comorbilità. In seguito, in un altro studio, sono stati utilizzati campioni di EAT ottenuti da prelievo inter e atrio-ventricolare di pazienti sottoposti a cardiocirurgia per bypass coronarico o sostituzione della valvola aortica. I risultati ottenuti hanno dimostrato che il medium condizionato da EAT umano, ma non da SAT, induceva

una marcata fibrosi del miocardio atriale. Inoltre, i medium condizionati da EAT hanno favorito la trasformazione dei fibroblasti in miofibroblasti in grado di produrre componenti della matrice extracellulare [39].

1.6 LE CAVEOLE:

Le caveole sono piccole invaginazioni a forma di fiasco della membrana plasmatica, del diametro di 50-100 nm, che si trovano maggiormente rappresentate nelle cellule endoteliali, nei miotubi e negli adipociti. Esse svolgono ruoli chiave in una varietà di funzioni cellulari, tra cui principalmente la trasduzione del segnale; è stato dimostrato infatti che numerose molecole di segnalazione come la tirosina chinasi della famiglia Src, i recettori accoppiati con proteine G, i membri del pathway Ras/MAPK e l'ossido nitrico sintasi, risiedono all'interno delle caveole. La localizzazione di queste proteine nelle caveole comporta un'interazione diretta con il dominio di scaffold della caveolina-1 o -3, a seconda del tipo cellulare. Questa interazione è spesso rappresentata da un'inibizione in modo da tener sotto controllo l'attività di una data molecola di segnalazione fino a quando non viene rilasciata in presenza di uno stimolo appropriato [40]; Altre funzioni attribuite alle caveole sono rappresentate dalla regolazione dell'omeostasi del colesterolo, dal trasporto di nutrienti dentro e fuori le cellule [ad esempio, l'attivazione del recettore dell'insulina stimola la traslocazione del trasportatore di glucosio GLUT4 nelle caveole negli adipociti], oltre che dall'ingresso cellulare di alcuni patogeni e tossine [ad esempio, virus simian 40, tossina del colera, albumina] [41]. Inoltre, vengono considerate come sottoinsiemi dei cosiddetti domini "lipid raft o zattere lipidiche", microdomini specializzati della membrana plasmatica arricchiti in steroli e glicosfingolipidi che compartimentalizzano processi cellulari, da cui però le caveole si differenziano per la presenza della proteina Caveolina come marcatore molecolare. Infatti, la formazione delle caveole è principalmente guidata dall'assemblaggio di un "mantello citoplasmatico" costituito da Caveoline oligomeriche, una famiglia di 3 proteine altamente correlate tra loro [caveolina 1 (Cav1), caveolina 2 (Cav2), e caveolina (3 Cav3)].

1.6.1 Le Caveoline e le Cavine:

Le proteine Cav 1 e Cav 3 sono necessarie e sufficienti per la formazione delle caveole nella maggior parte dei tessuti e dei muscoli striati, rispettivamente. La proteina Cav 2, invece, si associa alla Cav 1 negli etero-oligomeri e non forma in modo indipendente caveole. Le Caveoline presentano quattro domini: 1) un dominio ammino-terminale NH₂, che include un sito di fosforilazione (Cav1Y14) e siti di ubiquitinazione nella Cav1 e siti di SUMOilazione nella Cav3; 2) un dominio α -elica (CSD) implicato nelle interazioni proteina-proteina, nell'oligomerizzazione e nell'inibizione delle proteine di segnalazione, con una sequenza consenso / riconoscimento del colesterolo (CRAC) e ubiquitinazione o SUMOilazione; 3) un dominio di membrana che interagisce con i lipidi della membrana plasmatica attraverso un motivo atipico elica-turn-elica che espone al citoplasma i siti ammino e carbossi terminale delle Caveoline; e 4) un dominio carbossi terminale COOH con tre cisteine palmitoilate coinvolte nell'oligomerizzazione, nel legame con le proteine e nella stabilità del Cav [41].

Le Cavine sono delle proteine accessorie che aiutano le Caveoline oligomerizzate a formare le caveole. Sono state identificate quattro isoforme di cavina: Cavin1 [noto anche come polimerasi I o fattore di rilascio della trascrizione (PTRF)], Cavin2 [proteina di risposta alla deprivazione sierica (SDPR)], Cavin3 [prodotto genico correlato al fattore di risposta alla deprivazione sierica che si lega alla Chinasi C (SRBC)] e Cavin4 [nota anche come proteina coiled-coil per i muscoli (MURC)]. Le cavine omo ed etero-trimerizzano con due proteine Cavin1 e una Cavin1, Cavin2 o Cavin3 tramite un dominio α -elicoidale; si legano alle membrane delle caveole attraverso residui basici sui domini elicoidali ed aiutano le caveoline nella curvatura della membrana che forma le caveole [42].

1.6.2 Ruolo delle Caveoline e delle cavine nelle patologie umane:

La recente generazione di topi knock-out per caveolina (- / -) ha permesso di valutare il significato di ciascuna caveolina nel contesto dell'intera fisiologia animale, offrendo allo stesso tempo nuovi e preziosi modelli per lo studio delle malattie umane. Forse uno dei risultati più sorprendenti riguardanti questi modelli animali è che tutti i topi carenti di caveolina (Cav-1 null, Cav-2 null, Cav-3 null e Cav-1/3

topi knockout) sono vitali e fertili. Ciò è notevole, se si considerano le diverse funzioni delle caveoline e la loro diffusa distribuzione nei tessuti. Inoltre, l'analisi ultrastrutturale di topi knockout Cav1/3 ha confermato una completa perdita di caveole nei tessuti non muscolari e muscolari striati, rispettivamente, confermando così il ruolo essenziale di queste proteine nella biogenesi caveolare. Tuttavia, nei topi mancanti di Cav-2, le caveole risultano ancora morfologicamente identificabili. Mentre finora questi topi hanno fornito modelli animali unici in cui studiare i ruoli fisiologici delle proteine delle caveole, il loro potenziale come modelli di patologia umana si sta realizzando solo recentemente [43].

Si è osservato che i topi mancanti di Caveolina1 e di Caveolina-2, soffrono di grave disfunzione vascolare e difetti polmonari e sviluppano lipodistrofia con un fenotipo metabolico che non può essere annullato dalla ri-espressione endoteliale della caveolina, indicando un'importante funzione delle caveole degli adipociti. È stata descritta una forma di diabete lipodistrofico in pazienti con mutazioni non senso per caveolina-1. Un'altra svolta recente è derivata dall'identificazione delle caveine, come la proteina cavin-1/(PTRF) necessaria per la formazione delle caveole. L'invalidazione del gene PTRF / cavin-1 nei topi ha portato all'assenza di caveole con fenotipo lipodistrofico paragonabile a quello osservato nei topi knockout per la caveolina-1. Allo stesso modo, le mutazioni di PTRF / cavin-1 sono state identificate nei pazienti umani che soffrono di sindromi lipodistrofiche accoppiate a distrofia muscolare [44].

1.6.3 La Caveolina 1:

A differenza delle caveole che sono state identificate come invaginazioni della membrana plasmatica già nel 1950 grazie all'utilizzo della microscopia elettronica, la Caveolina1 fu inizialmente identificata come una fosfoproteina di 22kDa substrato della Src chinasi e solo successivamente fu osservata nelle caveole. Cav 1 fu anche osservata nell'apparato del Golgi e questa localizzazione fece pensare ad un suo ruolo come trasportatore della rete trans Golgi. Cav1 è stata quindi rapidamente caratterizzata come una proteina responsabile della regolazione della segnalazione cellulare. Esistono due isoforme di questa proteina, denominate α e β ; la isoforma α è costituita da 178 amminoacidi (24kDa) mentre, dato che la traduzione della

isoforma β ha inizio da un sito di iniziazione alternativo a livello della metionina 32, l'isoforma β (21kDa) risulta così essere una proteina più piccola di 3 kDa rispetto alla α .

Per quanto riguarda, in generale, la struttura di Cav1, essa presenta una forma a forcina con le estremità ammino e carbossi terminale entrambe citosoliche separate da un segmento idrofobico (residui 102-134) inserito nella membrana [45]. Cav1 possiede due principali domini funzionali: un sito di fosforilazione a livello della tirosina 14 ed un dominio di oligomerizzazione che contiene anche un dominio di scaffold. Per quanto riguarda il primo dominio funzionale, Cav1 α (ma non Cav1 β mancante dei primi 32 amminoacidi) è fosforilato sulla tirosina 14 (Y14) dalla Src chinasi così come dalle chinasi Fyn, Yes e c-Abl. Questa fosforilazione può avvenire cronicamente oppure puntualmente in risposta al trattamento con fattori di crescita o all'attivazione dell'integrina. Cav1 viene anche fosforilata al livello della serina 80, fosforilazione che serve a regolare la proteina stessa ed il traffico del colesterolo [46]. Per quanto riguarda, invece, il dominio di oligomerizzazione, Cav1 oligomerizza attraverso i residui amminoacidici 1-101; gli oligomeri possono anche includere la proteina Cav2 ed interagire con il citoscheletro di actina attraverso la Filamin A. Questa regione contiene il dominio di scaffold (residui 82-101) il quale è coinvolto nell'interazione tra Cav1 ed altre proteine quali le proteine Src, le proteine G, le fosfolipasi, la protein chinasi A, la protein chinasi C, l'adenilato ciclasi, l'ossido nitrico sintasi e le proteine della famiglia Ras GTPasi. Inoltre questo dominio, insieme all'estremità carbossi terminale, è responsabile della localizzazione di Cav1 a livello della membrana plasmatica. Infine, Cav1 è palmitoilata sulle cisteine 133, 143 e 156, modificazione richiesta per il legame con il colesterolo ed il trasporto alla caveola e per l'interazione con la Src portando alla fosforilazione a livello della tirosina 14.

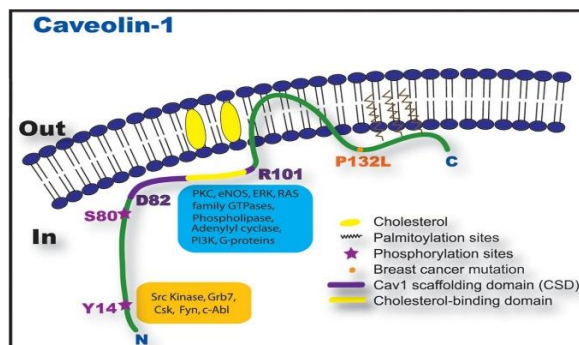


Figura 2: Topologia di Cav1 nella membrana: Entrambe le regioni ammino e carbossi terminali di Cav1 sono citosoliche. L'inserimento di Cav1 nelle membrane è orchestrato da un dominio intramembrana "a forcina" incorporato nel doppio strato di membrana, ma anche da tre gruppi palmitoici nella regione carbossi terminale di Cav1 che si inseriscono nel doppio strato di fosfolipidi. Una mutazione recentemente scoperta nei tumori al seno nella posizione 132 (P132L) è stata localizzata vicino ai siti di palmitoilazione. Due principali siti di fosforilazione sono stati localizzati nelle posizioni Ser80 e Tyr14. La fosforilazione di Ser80 è stata coinvolta nella secrezione di Cav1. La fosforilazione di Tyr14, mediante tirosina chinasi Src, Fyn o Abl, è stata collegata a vari fenomeni cellulari tra cui meccano-trasduzione, trasduzione del segnale, endocitosi, migrazione cellulare e dinamica di adesione focale. Il dominio CSD è una regione altamente conservata che comprende una regione situata tra D82 e R101 (in giallo). Questa regione di Cav1 contiene una sequenza di aminoacidi che interagisce con il colesterolo attraverso residui idrofobici conservati.

Inoltre, è interessante notare che sebbene sia una proteina integrale di membrana, la Caveolina-1 è stata identificata in numerose altre localizzazioni cellulari, inclusi mitocondri (cellule epiteliali delle vie aeree ed epatociti), lume delle vescicole secretorie (cellule sierose del pancreas e ghiandole salivari), citoplasma (cellule muscolari scheletriche e cheratinociti). La sua distribuzione tra le varie localizzazioni cellulari, quindi, sembra essere dipendente soprattutto dal tipo cellulare investigato. Non sono noti i meccanismi che determinano lo spostamento intracellulare di Caveolina-1 tra i vari compartimenti e i suoi ruoli nelle differenti localizzazioni [47].

1.6.4 Ruolo della Caveolina 1 nelle patologie umane:

1.6.4.1 Trasformazione cellulare e tumorigenesi

La Caveolina-1 è stata inizialmente identificata come substrato principale per la fosforilazione della tirosina nei fibroblasti embrionali di pollo trasformati dal virus del sarcoma di Rous, suggerendo che potrebbe essere un bersaglio per l'inattivazione durante l'oncogenesi. Pertanto è stato proposto che la caveolina-1 agisca come una proteina soppressore del tumore, inibendo l'attività di segnalazione funzionale di diversi protooncogeni e di conseguenza interrompendo il processo di trasformazione cellulare. Numerosi studi di follow-up progettati per testare questa ipotesi

hanno fornito moltissime prove che suggeriscono che la caveolina-1 possa effettivamente possedere capacità di soppressione del tumore. Ad esempio, l'mRNA della caveolina-1 e l'espressione proteica sono sotto-regolati nelle cellule NIH-3T3 trasformate con diversi oncogeni attivati, come v-Abl, Bcr-Abl e H-Ras (G12V). La capacità di queste cellule trasformate di crescere nel soft agar, segno distintivo di trasformazione cellulare, è stata trovata essere inversamente correlata con i livelli della caveolina-1. La reintroduzione della caveolina-1 sotto il controllo di un promotore inducibile è stata sufficiente per inibire la crescita di queste cellule, ripristinando così il loro fenotipo trasformato. Inoltre, alcuni studi hanno identificato simili riduzioni dei livelli di proteina caveolina-1 e mRNA nelle linee cellulari di carcinoma mammario. A ulteriore supporto di un ruolo di caveolina-1 come soppressore del tumore, è stato dimostrato che la sotto-regolazione mirata della caveolina-1 usando un approccio anti-senso basato su vettori ha portato alla trasformazione delle cellule NIH-3T3, migliorando la loro crescita e iperattivando la cascata della proteina chinasi attivata da mitogeno (MAP) Ras-p42 / 44. Quando iniettate in topi nudi, queste cellule NIH-3T3 che esprimono il costrutto antisenso della caveolina-1 erano in grado di formare grandi tumori, rispetto alle cellule NIH-3T3 prive del vettore [48].

In contrasto, diversi studi indicano per Caveolina-1 una attività di promotore della crescita ed un effetto anti-apoptotico. Infatti, in linee cellulari di carcinoma della prostata la riduzione di espressione di Caveolina-1 tramite oligonucleotidi antisenso ristabilisce la sensibilità all'apoptosi [48]. Inoltre, in cellule di mieloma l'inibizione della fosforilazione di Caveolina-1 o la distruzione delle caveole tramite agenti in grado di sequestrare il colesterolo, è in grado di bloccare il segnale indotto da IL-6 e da IGF-1 tramite inibizione della via di segnale della PI3K/AKT [49].

1.6.4.2 Metabolismo del glucosio, segnalazione di insulina e diabete

Il diabete di tipo II è una malattia metabolica geneticamente eterogenea caratterizzata da iperglicemia cronica e anomalie nel metabolismo lipidico che affliggono quasi il 5% della popolazione del mondo occidentale. Poco dopo la loro scoperta iniziale, le caveoline e le caveole sono state implicate nei meccanismi di segna-

zione dell'insulina. L'interesse iniziale per le caveole come siti per il segnale insulinico proveniva da studi ultrastrutturali sugli adipociti di ratto, che mostravano che l'insulina si localizzava all'interno delle caveole. Ulteriori studi hanno dimostrato che gli adipociti sono altamente ricchi di caveole e che sia il livello di mRNA che i livelli di proteina della caveolina 1 aumentano di oltre 25 volte durante la differenziazione dei fibroblasti di topo 3T3-L1 in adipociti, fenomeno questo insulino-dipendente, che suggerisce un ruolo per questi microdomini anche nella segnalazione dell'insulina [50]. Oltre a questi risultati, diversi ricercatori hanno utilizzato analisi biochimiche per valutare il contributo della caveolina / caveole alla segnalazione dell'insulina. Poiché le caveole sono altamente arricchite di colesterolo, agenti come la metilciclodestrina (MCD), che legano e sequestrano il colesterolo di membrana, possono essere utilizzati per intaccare in modo reversibile le caveole ed interrompere la segnalazione attraverso questi microdomini. Con l'uso di questa metodologia, è stato dimostrato che gli adipociti di ratto trattati con MCD hanno una risposta significativamente ridotta alla stimolazione insulinica [51].

Forse i dati più convincenti sul ruolo della caveolina-1 nella segnalazione dell'insulina e nel diabete sono arrivati con la generazione di topi knock-out per il gene Cav-1 (topi Cav1 null). Questi topi non presentavano un fenotipo chiaramente diabetico, ma erano resistenti all'obesità indotta dalla dieta ed svilupparono progressiva atrofia del tessuto adiposo. Tuttavia, quando questi topi venivano sottoposti a una dieta ricca di grassi per 9 mesi, svilupparono iper-insulinemia postprandiale. Inoltre, quando topi cav-1 null giovani venivano sottoposti ad un test di tolleranza all'insulina (ITT), questi mostravano un assorbimento di glucosio notevolmente ridotto rispetto agli animali di controllo. Questi disordini metabolici sono simili a quelli osservati negli individui prediabetici nella popolazione umana, suggerendo che la caveolina-1 possa svolgere un ruolo nella segnalazione dell'insulina in vivo [40].

1.6.4.3 Infiammazione

È noto che la Caveolina-1 è in grado di interagire direttamente e di inibire l'attività dell'ossido nitrico sintasi endoteliale (eNOS) sequestrando l'enzima all'interno delle caveole con conseguente soppressione della risposta infiammatoria. Infatti, in assenza di Caveolina-1, eNOS non risponde ai segnali regolatori negativi e la sua

attività rimane elevata con conseguente aumento costitutivo dei livelli plasmatici di ossido nitrico (NO) [52]. Inoltre, altri studi indicano che le proprietà immunomodulatorie della Caveolina1 possono derivare anche dalla sua capacità di regolazione delle citochine sia tramite interazione diretta, sia tramite modulazione dei loro recettori. Numerosi recettori citochinici, infatti, sono stati localizzati nelle caveole quali quello per IL-2, IL-6, IFN- α , IFN- γ e TNF- α . Il ruolo protettivo esercitato dalla Caveolina-1 nelle infiammazioni sembra inoltre derivare dalla sua capacità di sopprimere la produzione di citochine proinfiammatorie (TNF- α ed IL-6) e di aumentare quella di citochine antinfiammatorie (IL-10) [53].

1.6.4.4 Fibrosi

La rilevanza della caveolina-1 nelle malattie fibrotiche è già stata riconosciuta nei primi studi con modelli animali. Nella fibrosi polmonare indotta da radiazioni in ratti e suini è stata osservata una down-regolazione della caveolin-1 nelle cellule epiteliali polmonari prima dell'induzione della fibrosi. Successivamente, questa down-regolazione della caveolina-1 è stata osservata anche nella fibrosi polmonare indotta dalla bleomicina. Coerentemente, i topi knockout per caveolina-1 hanno presentato una compromissione della guarigione delle ferite e profonde alterazioni della morfologia polmonare, con ridotti spazi alveolari, aumento dell'ispessimento delle pareti, fibrosi e ipercellularità. Inoltre, è stata segnalata una marcata riduzione della caveolina-1 nei tessuti affetti in diverse malattie fibrotiche umane, come la fibrosi polmonare idiopatica (IPF), la sclerodermia, la fibrosi cardiaca, le cicatrici cheloidi e la sclerosi sistemica. Inoltre, è stato dimostrato in modelli animali che la reintroduzione della caveolina-1 riduce drasticamente i cambiamenti fibrotici tissutali. Allo stesso modo, il pretrattamento con peptide CSD o caveolina-1- adenovirus è in grado di prevenire i cambiamenti caratteristici indotti da agenti fibrotici come bleomicina o TGF- β 1 [54-56].

2. SCOPO DELLA TESI

Lo scopo di questa tesi è stato quello di valutare in vitro le modificazioni dei componenti dell'ECM e delle caveole in condizioni d'invecchiamento degli adipociti e d'ipossia severa. E' stato pertanto utilizzato un modello d'invecchiamento in vitro di adipociti 3T3L1 in cui sono stati valutati sotto il profilo morfologico, immunocitochimico e funzionale adipociti 3T3-L1 "maturi" (post-induction day PID 10), ed adipociti "invecchiati" (PID 18) in condizioni standard (normossia) ed in presenza di stimolo ipossico.

Inoltre, si è cercato di traslare i risultati dell'esperimento in vitro in un modello in vivo con lo studio di campioni di tessuto adiposo epicardico di soggetti con e senza aterosclerosi coronarica (CAD e non CAD) sottoposti a intervento cardochirurgico in elezione.

3. MATERIALI E METODI

3.1 Colture cellulari

Le cellule 3T3-L1 (ECACC Sigma-Aldrich) sono state coltivate a 37 ° C in CO₂ al 5% in terreno di coltura DMEM / GlutaMAX (Gibco), contenente FBS 10% e 1% di soluzione antimicotica antibiotica (SIGMA). All'80% di confluenza, le cellule 3T3-L1 sono state staccate utilizzando tripsina / EDTA (Gibco) e seminate in 6 pozzetti (Becton Dickinson) contenenti un vetrino presterilizzato (Menzel-glaser Thermo Scientific). Al raggiungimento della confluenza, le cellule sono state indotte a differenziarsi in DMEM / F12 contenente 10% FBS, 1% di soluzione antimicotica antibiotica, 0,2 mM di IBMX, 10 µM di rosiglitazone, 1 µM di desametasone, 1,72 µM di insulina per 3 giorni. Dopo 72 ore di post-induzione (PID3) il terreno è stato sostituito con un medium di mantenimento degli adipociti (AMM), composto da DMEM / F12 arricchito con FBS al 10%, 1% di soluzione antimicotica antibiotica, insulina 1,72µM (Sigma), in cui le cellule sono stati coltivati per 2 giorni (PID5). Al PID5, le cellule sono state coltivate con medium di mantenimento degli adipociti (AMM) ma contenente una concentrazione fisiologica di insulina per altri 13 giorni.

La vitalità cellulare è stata determinata mediante colorazione con tripan blu.

Gli adipociti PID10 sono stati definiti come “adipociti maturi” mentre a PID18 sono stati definiti “adipociti invecchiati”, in accordo con studi precedenti [57] [58, 59].

3.2 Induzione ipossia severa

Al fine di indurre ipossia severa, gli adipociti 3T3-L1 differenziati, a PID9 sono stati incubati in un incubatore multigas (RUSKINN C300, RUSKINN Technology Ltd) in atmosfera di 1% O₂, 94% N₂, 5% CO₂, a 37 ° C per 24 h. Le cellule di controllo sono state incubate in atmosfera standard al 21% di O₂ e al 5% di CO₂ a 37 ° C. Le analisi sono state eseguite a PID10 (PID 10 CTR e PID10 HYPO).

3.3 Colorazione Oil Red O

Dopo il lavaggio con il tampone fosfato salino (PBS) 0,1 M pH 7,4, le colture cellulari sono state fissate per 10 minuti con formalina neutra al 10%. Le cellule sono state lavate con acqua bidistillata e successivamente colorate con una soluzione pronta all'uso di Oil Red O filtrata (Bio Optica, Milano) per 20 minuti a temperatura ambiente. Quindi, le cellule sono state lavate con acqua bidistillata e colorate con una soluzione pronta per l'uso di ematoxilina di Mayer (Bio-Optica, Milano) per 1 minuto a temperatura ambiente e quindi lavate di nuovo con acqua bidistillata. I vetrini sono stati montati con Aqueous Mount Quick Medium (Bio Optica, Milano). Le cellule sono state osservate al microscopio EVOS FL Auto Cell Imaging System (Thermofisher Scientific, USA) a 200x e 400x di ingrandimento. Le immagini sono state analizzate utilizzando il software ImageJ versione 1.51n (NIH, Bethesda, MD, USA) per contare le celle entro 10 campi rappresentativi (ingrandimento 200x, numero di celle espresse su mm²) e per calcolare l'area di 50 cellule scelte casualmente (200x ingrandimento, area espressa in μm²).

3.4 Analisi dei Radicali liberi dell'Ossigeno (ROS)

La generazione intracellulare di ROS è stata rilevata utilizzando il kit di rilevamento Image-iT™ LIVE Green Reactive Oxygen Species (ROS) (Thermo Fisher Scientific, USA). Una volta che le cellule sono state trattate secondo le diverse condizioni sperimentali, sono state lavate una volta con 1 ml di HBSS / Ca / Mg preriscaldato e sono state incubate con 25 μM carboxy-H2DCFDA per 30 minuti a 37 ° C, al riparo dalla luce. Durante gli ultimi 5 minuti di incubazione, Hoechst 33342 è stato aggiunto ad una concentrazione finale di 1,0 μM alla soluzione di colorazione carboxy -H2DCFDA. Quindi, le cellule sono state lavate delicatamente tre volte in HBSS / Ca / Mg preriscaldato ed i vetrini montati con Antifade Mounting Medium - Prolong Fluorescence (Boster Biological Technology, Valley Ave in Pleasanton). Le cellule sono state osservate al microscopio EVOS FL Auto Cell Imaging System (Thermofisher Scientific, USA) a 200x e 400x di ingrandimento. Le immagini sono state analizzate con il software ImageJ versione 1.51n (NIH, Bethesda, MD, USA): la media dell'intensità della fluorescenza è stata calcolata su 50 cellule positive per i ROS a 200x d'ingrandimento. Il background è stato ottenuto misurando l'intensità

della fluorescenza nelle regioni al di fuori delle cellule. La fluorescenza cellulare totale è stata calcolata sottraendo il background dalla densità integrata (CTCF= ID-background) (Zoico 2017).

3.5 Analisi della senescenza

Le cellule senescenti sono state rilevate utilizzando un kit di rilevazione della senescenza (Abcam, Cambridge). In breve, le cellule sono state coltivate in una piastra a sei pozzetti direttamente su un vetrino e dopo la fine del periodo di trattamento specifico, le cellule sono state lavate delicatamente con 2 ml di PBS per ciascun vetrino e fissate con 1 ml di soluzione di fissaggio per 10 minuti a temperatura ambiente. Successivamente le cellule sono state lavate per due volte con 2 ml di PBS ed è stato aggiunto alla piastra 1 ml di soluzione colorante specifica per la β -galattosidasi. La piastra è stata incubata per 5 ore a 37 ° C protetta dalla luce. Per evitare qualsiasi effetto dalla CO₂, essa è stata chiusa con parafilm. Trascorso il tempo d'incubazione, le cellule sono state quindi lavate una volta con 1 ml di PBS e sono state controcolorate con nuclear fast red per la colorazione dei nuclei. Successivamente, le cellule sono state osservate al microscopio EVOS FL Auto Cell Imaging System (Thermofisher Scientific, USA) a 200x di ingrandimento ed è stata calcolata la percentuale di cellule β -galattosidasi positive sul totale delle cellule. Le immagini sono state analizzate con il software ImageJ versione 1.51n (NIH, Bethesda, MD, USA) e sono stati considerati 10 campi SA- β -gal-positivi scelti casualmente.

3.6 Analisi immunofluorescenza

Dopo il lavaggio con PBS (1X) pH 7,4, le cellule sono state fissate per 15 minuti con formalina neutra al 10%. Quindi, le cellule sono state lavate tre volte in PBS (1X) per 5 minuti. Solo per rilevare gli antigeni della membrana plasmatica, le cellule sono state permeabilizzate trattando per 10 minuti con PBT (0,1% Triton X-100 o 1% Triton X-100 10% in PBS 1X) e quindi sono state lavate tre volte in PBS (1X) per 5 minuti.

Le cellule sono state bloccate per 1 ora in antibody blocking buffer (siero di capra al 10%, BSA 1% in PBT) e sono state incubate per tutta la notte a 4 ° C con anticorpo anti-Caveolina-1 di coniglio (1:400, Cell signaling) ed anticorpo anti-collagene VIa3 (1: 400, OriGene Technologies). Successivamente, le cellule sono state lavate in Triton X-100 allo 0,1% in PBS 1 × tre volte per 5 minuti e incubate per 30 minuti a temperatura ambiente con anticorpo secondario coniugato con IgG DyLight 488 (1: 100, Bethyl Laboratories Inc). I nuclei sono stati colorati per 5 minuti a temperatura ambiente con 4', 6-diamidino-2-fenilindolo pronto per l'uso (Boster-Bio, Pleasanton, California, USA). Infine, le cellule sono state osservate al microscopio Confocale invertito Leica TCS SP5 AOBS. Le immagini sono state analizzate utilizzando il software ImageJ versione 1.51n (NIH, Bethesda, MD, USA): l'intensità di fluorescenza media per il trattamento è stata calcolata su 50 cellule positive per Caveolina-1 con ingrandimento di 400 ×, calcolando la densità integrata (ID). Il background è stato ottenuto misurando l'intensità della fluorescenza delle regioni esterne alle cellule. La fluorescenza cellulare corretta (CTCF) è stata quindi determinata sottraendo il background dall'ID (CTCF = ID - background)

3.7 Estrazione dell'RNA, sintesi del cDNA e Real Time PCR

L'RNA è stato estratto da 350µl di lisato cellulare di 3T3-L1 usando il Mini kit RNeasy® di Qiagen come precedentemente descritto (Zoico 2016). La retro trascrizione del cDNA è stata eseguita utilizzando il kit First Strand cDNA Synthesis (Origene) secondo il seguente protocollo: 5 minuti a 22 ° C, 30 minuti a 42 ° C e 5 minuti a 85 ° C in un termociclatore Ep Gradient S thermal cycler (Eppendorf). La PCR in tempo reale (RT-PCR) è stata eseguita con un sistema in tempo reale CFX96 utilizzando un SsoAdvanced™ Universal SYBR® Green Supermix (Bio-Rad), secondo il protocollo del produttore. In breve, l'amplificazione della PCR è stata eseguita in un volume totale di 20 µl, amplificando 25 ng di cDNA, per 40 cicli nelle seguenti condizioni sperimentali: 5 secondi a 95 °C e 30 secondi a 60 °C. Le coppie di primers utilizzate sono state disegnate per l'amplificazione di un amplicone esone-esone di 150 bp. per ADIPOQ (FW, 5' ggagatgcaggctcttctgg-3'; RW, 5'-cgaatgggtacattgggaac-3 '), IL-6 (FW, 5'- agacaaagccagagtcctca-3 '; RW, 5'-gagcattggaaattgggta-3'), COL1α1 (QT00162204)); Col6a3, Lamini4a (FW, 5'-aaaatg-

gagctgttcggtgt-3'; RW, 5'-tccgggtggtatttcgtaagc-3'), Cav1 (FW, 5'- aacatctacaagcc-caacaacaagg-3'; RW 5'- ggttctgcaatcacatcttcaaagtc-3') e MMP-11 (QT00099729) erano primer QuantiTect (Qiagen);

I livelli di espressione sono stati normalizzati utilizzando come controllo interno il gene β -Actina (FW, 5'-ctttgcagctccttcggtgc-3'; RW, 5'-accattcccaccatcacac-3'). I livelli di espressione relativa sono stati calcolati usando la formula $2^{-\Delta\Delta Ct}$. Ciascuna analisi è stata condotta in duplicato.

3.8 Analisi delle proteine mediante Western Blot

Le cellule 3T3-L1 sono state lisate in tampone di lisi freddo contenente 25mM Tris•HCl pH 7.6, 150mM NaCl, 1% NP-40, 1% sodium deoxycholate, 0.1% SDS addizionato con cocktail di inibitori di proteasi e fosfatasi (PPC 1010, Sigma) in acqua bidistillata. I lisati sono stati centrifugati a 20.000 xg per 20 minuti. E' stato raccolto il surnatante e le sue concentrazioni proteiche sono state determinate con il metodo descritto da Bradford (1976). Una concentrazione complessiva di proteina pari a 25 ng per ciascun campione è stata caricata su gel di poliacrilammide SDS al 7,5% o al 12% a seconda del peso molecolare della proteina da rilevare. L'elettroforesi è stata eseguita a 100 V utilizzando il running buffer al 0,1% di SDS. Le proteine sono state blottate su una membrana PVDF (Immobilon P, Millipore, Bedford MA). Le membrane sono state bloccate con BSA al 5% in TBS-T (TBS contenente 0,1% (v / v) Tween 20) per 1 ora in agitazione a temperatura ambiente e successivamente incubate per tutta la notte a 4°C in agitazione con gli anticorpi primari (p53, β -Actin, α tubulin, Sirt 1, p-ERk, HIF1alpha, Cav1, Cell Signaling). Dopo il lavaggio, la membrana è stata ulteriormente incubata con un anticorpo secondario coniugato con HRP (anti-coniglio e anti-topo, Cell Signaling) per 1 ora e, dopo il lavaggio, la membrana è stata sviluppata utilizzando un sistema di rilevazione chemiluminescente (ECL Select™ western Blotting Detection Reagent GE healthcare). I complessi antigene-anticorpo che hanno reagito con i substrati, sono stati rivelati mediante ImageQuant Las 4000 mini, GE healthcare.

3.9 Soggetti inclusi nello studio

Sono stati inclusi nello studio 12 soggetti maschi sottoposti a chirurgia cardiaca elettiva per innesto di bypass coronarico (CAD, n = 6) o per sostituzione valvolare aortica (non CAD, n = 6). I principali dati clinici sono stati raccolti in modo prospettico per ciascun paziente arruolato con una percentuale di diabetici identica nei due gruppi (nel gruppo CAD e non CAD, 3 pazienti). I pazienti con malattie epatiche, renali o neoplastiche sono stati esclusi dallo studio, così come i soggetti con una perdita di peso superiore al 3% nei 6 mesi precedenti; inoltre, nessun soggetto praticava attività fisica regolare. Sono stati reclutati solo pazienti di sesso maschile in considerazione dell'esistenza di un dimorfismo sessuale nella funzione e nelle caratteristiche del tessuto adiposo [60]. Lo studio è stato approvato dal Comitato Etico dell'Università di Verona.

3.10 Variabili antropometriche

Il peso e l'altezza sono stati determinati in tutti i soggetti e l'indice di massa corporea (BMI) è stato calcolato come peso in chilogrammi diviso per altezza in metri quadrati.

3.11 Campioni di tessuto adiposo epicardico

In sala operatoria, sono stati ottenuti campioni del tessuto adiposo epicardico (EAT) entro 1 ora dall'induzione dell'anestesia. I campioni sono stati quindi conservati per effettuare successivamente l'analisi immunoistochimica e la colorazione tricromica Masson.

3.12 Analisi immunoistochimica

L'EAT, subito dopo il prelievo, è stato fissato mediante paraformaldeide al 4% in tampone fosfato 0,1 M, pH 7,4 e mantenuto in fissativo per tutta la notte a 4 ° C.

Le biopsie sono state quindi disidratate, chiarificate in Xilene e incluse in paraffina. Sezioni seriali spesse 5µm sono state ottenute mediante taglio al microtomo e colorate con ematossilina ed eosina per valutare la morfologia prima dell'analisi immunoistochimica.

Sono stati utilizzati anticorpo primario di coniglio anti CAV1 (1:800; Cell Signaling), anticorpo primario di coniglio anti HIF1 α (1:500; Bethyl) ed anticorpo secondario SignalStain Boost immunohistochemical analysis detection reagent HRP Rabbit (ready to use; Cell Signaling). Un controllo negativo è stato condotto utilizzando solo l'anticorpo secondario.

Diaminobenzidina cloridrato (DAB, VectorLaboratories) è stata utilizzata per la rivelazione del segnale.

Brevemente, le sezioni sono state deparaffinate e sottoposte a calore per lo smascheramento dell'antigene. L'attività della perossidasi endogena e legami aspecifici sono stati bloccati mediante incubazione con perossido di idrogeno al 3% e siero non immunitario, rispettivamente. I vetrini sono stati quindi incubati con anticorpo primario per 16 ore a 4 ° C, seguito da incubazione con l'anticorpo secondario per 30 minuti a temperatura ambiente. La diaminobenzidina cloridrato è stata utilizzata come cromogeno per visualizzare l'attività della perossidasi. Le sezioni sono state controcolorate con ematossilina e montati in fase organica con Entellan.

3.13 Colorazione tricromica Masson per l'analisi della fibrosi

La fibrosi nei campioni di EAT in esame è stata valutata tramite colorazione tricromica Masson che prevede una colorazione nucleare (con ematossilina ferrica di Weigert) e una colorazione del connettivo (con blu di anilina). I nuclei si colorano in nero; citoplasma, cheratina, fibre muscolari, granuli acidofili in rosso; collagene, muco, granuli basofili in blu; gli eritrociti in giallo.

Il tessuto incluso in paraffina è stato tagliato al microtomo in sezioni di 5 μ m, lasciate over / night a 37°C, deparaffinate e reidratate. E' stato quindi utilizzato kit con Blu di anilina (BioOptica, MassonTricromica Kit). Per la valutazione del grado di fibrosi, le intere sezioni di EAT sono state analizzate su immagini a 100x di ingrandimento utilizzando il Software ImageJ 1,52q version.

3.14 Analisi statistica

I dati sono stati presentati come media \pm deviazione standard nelle diverse condizioni sperimentali.

Le variabili che non mostravano una distribuzione normale sono state trasformate in logaritmo prima delle analisi. Le differenze tra i gruppi sono state valutate mediante analisi ANOVA. È stato calcolato il p-value per determinare la significatività statistica. Tutte le analisi statistiche sono state eseguite utilizzando il pacchetto statistico SPSS.

4. RISULTATI

Nel nostro modello sperimentale *in vitro* sono stati studiati adipociti 3T3-L1 maturi (PID 10) e invecchiati (PID 18) come da protocollo recentemente pubblicato dal nostro gruppo di ricerca (Zoico et al 2019). Come modello di invecchiamento precoce sono stati studiati inoltre gli effetti di uno stimolo ipossico severo in adipociti maturi a PID 10. Nella nostra coltura *in vitro*, lo stimolo ipossico ha determinato sovra-espressione della proteina HIF1 α , a confermare l'instaurarsi di un ambiente ipossico con le condizioni sperimentali prescelte (Figura 3).

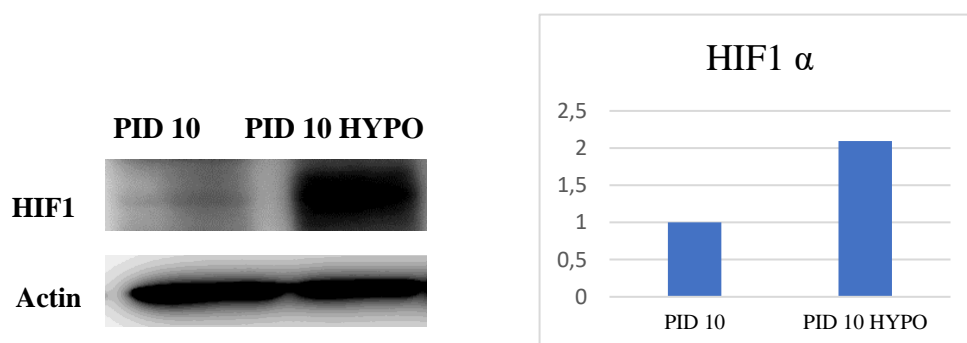


Figura 3: Analisi Western Blot della proteina HIF1 α e della proteina β -Actina, usata come normalizzatore, in adipociti “maturi” PID 10 sottoposti a condizione d’ipossia severa e di normossia.

Come conseguenza dell'ambiente ipossico, il numero degli adipociti in senescenza risultava aumentato rispetto al relativo controllo, confermando lo stimolo ipossico come possibile modello di invecchiamento precoce (Figura 4 A, B). Questo risultato veniva quindi confermato anche dall'analisi Western Blot in cui la proteina p-53

risultava aumentata mentre la proteina SIRT 1 diminuita negli adipociti sottoposti a stimolo ipossico (adipociti PID 10 HYPO) (Figura 4 C, D). Anche negli adipociti invecchiati (adipociti PID 18) si verificava analogamente un aumento del numero di cellule senescenti, un aumento della proteina p53 ed una diminuzione della proteina SIRT 1 rispetto agli adipociti maturi (Figura 4 E, F).

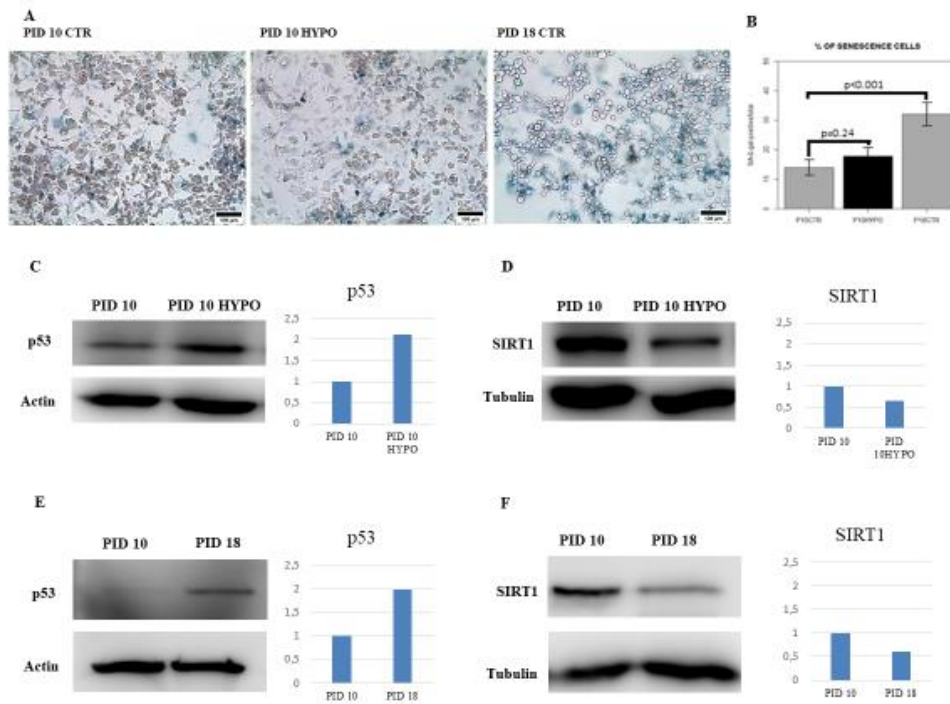


Figura 4: A) Analisi della senescenza cellulare mediante il saggio della β -Galattosidasi in adipociti “maturi” PID 10 sottoposti a condizione d’ipossia severa e di normossia ed in adipociti “invecchiati” PID 18; B) Grafico della percentuale di cellule senescenti (media \pm DS); C, D, E, F) Analisi Western Blot delle proteine p53 e SIRT 1 in adipociti “maturi” PID 10 sottoposti a condizione d’ipossia severa e di normossia ed in adipociti “invecchiati” PID 18. Le proteine β -Actina ed α -Tubulina sono state usate come normalizzatori. Post induction day = PID

Per quanto riguarda la morfologia degli adipociti nelle diverse condizioni di coltura, l’area degli adipociti ed il contenuto lipidico medio sono risultati aumentati durante l’invecchiamento mentre in condizioni ipossiche diminuivano in modo significativo. Infine, il numero di adipociti maturi tendeva a diminuire, anche se non in modo significativo, da PID10 a PID18 e a PID 10 in condizioni di ipossia (Figura 5).

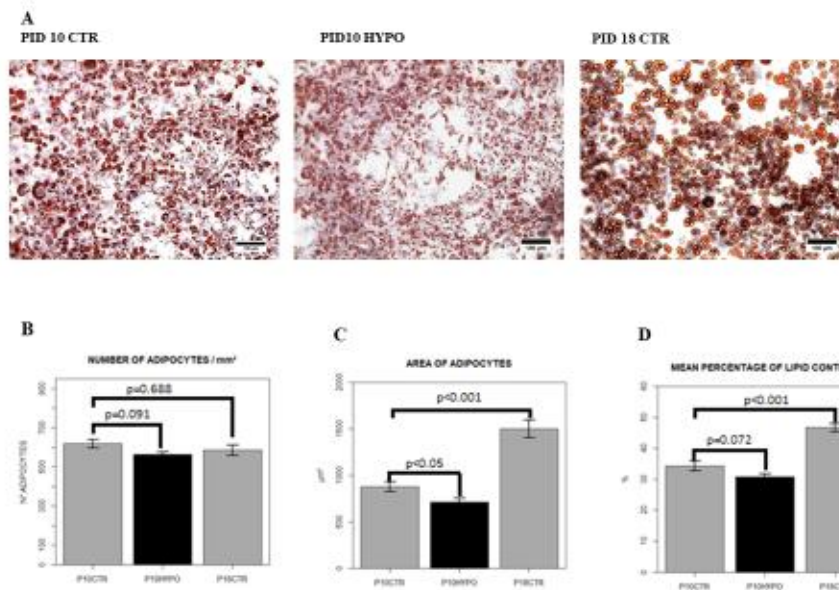


Figura 5: A) colorazione Oil Red O e controcolorazione con Ematossilina: immagini significative degli adipociti maturi a PID10 e a PID18 cresciuti in condizioni standard (PID10 CTR e PID18 CTR) e in condizione di ipossia severa (PID10 HYPO) (scale bar=100μm); B) area C) numero degli adipociti maturi e D) percentuale media del contenuto lipidico a PID10 e a PID18 in condizioni standard (PID10CTR e PID18CTR) ed in condizione di ipossia severa (PID10HYPO) (media ± DS). Post induction day = PID.

Gli adipociti 3T3-L1 maturi sottoposti ad ipossia (adipociti PID 10 HYPO) ed in minor misura anche gli adipociti invecchiati (PID 18) presentavano un accumulo significativamente maggiore di ROS intracellulari rispetto al relativo controllo ($p < 0,001$) (Figura 6).

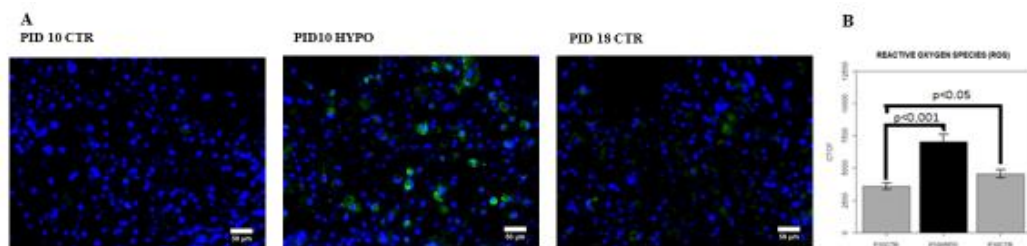


Figura 6: A) analisi di immunofluorescenza (IF) per i ROS intracellulari: immagini significative degli adipociti maturi a PID10 e a PID18 cresciuti in condizioni standard (PID10 CTR e PID18 CTR) ed in condizione di ipossia severa (PID10 HYPO) (scale bar=50μm); B) accumulo di ROS intracellulari a PID10 e a PID18 in colture cresciute in condizioni standard (PID10CTR e PID18CTR) ed in condizione di ipossia severa (PID10HYPO) (media ± DS). Post induction day = PID.

Sono quindi state valutate le espressioni di alcuni geni adipocitari e della ECM nelle diverse condizioni sperimentali. Durante l'invecchiamento degli adipociti, l'espressione del gene dell'adiponectina e della Caveolina1 risulta ridotta mentre l'espres-

sione dei geni codificanti per le citochine pro-infiammatorie (IL 6) e per i componenti ECM (col1a1, col6a3, laminin4a, MMP11) risulta aumentata. Analogamente dopo ipossia severa a PID 10, si riscontra un aumento dei geni pro-infiammatori e codificanti per alcune componenti dell'ECM con tendenziale diminuzione dell'espressione del gene della Caveolina1 rispetto al relativo controllo (Figura 7).

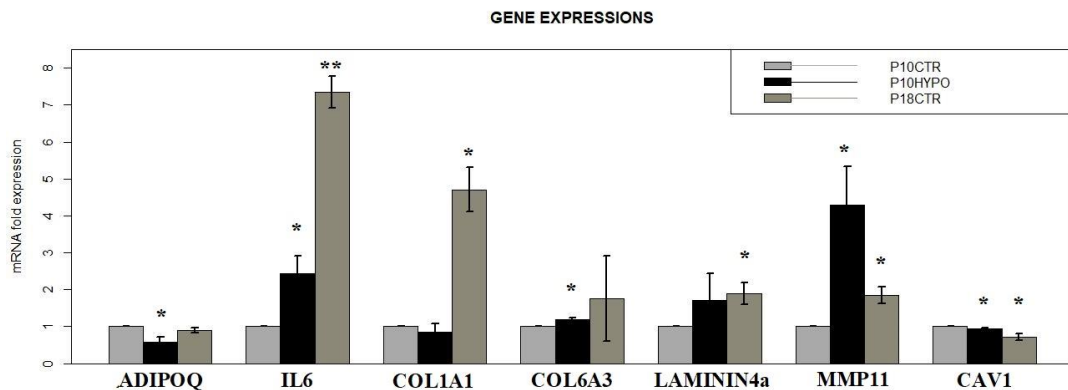


Figura 7: Analisi dell'espressione genica di adiponectina, IL-6, Col1a1, Col6a3, Lamini4a, MMP11, Caveolina-1 in adipociti PID10 "maturi" coltivati in in condizioni standard e sottoposti ad ipossia severa e in adipociti PID18 "invecchiati". I livelli di espressione sono stati normalizzati usando il gene β -actina come controllo interno I livelli di espressione relativa sono stati calcolati usando la formula $2^{-\Delta\Delta Ct}$.

Mediante immunofluorescenza è stata valutata la presenza di collagene VI-a3 nelle diverse condizioni sperimentali. Nel modello sperimentale in vitro si verificava un significativo aumento del segnale per collagene VI-a3 in condizioni ipossiche a PID10 nonché a PID 18 rispetto al controllo ($p < 0,05$ e $p < 0,001$ rispettivamente (Figura 8).

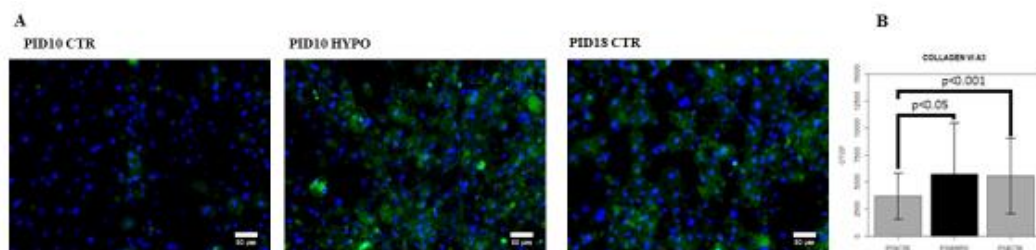


Figura 8: Collagen VI-a3 IF: A) immagini significative di adipociti maturi a PID10 in condizioni standard (PID10 CTR), in condizioni di ipossia severa (PID10 HYPO) ed a PID18 in condizioni standard (PID18 CTR) (scale bar=50 μ m); B) grafico di espressione di Collagen VI-a3 (media \pm deviazione standard).

Parallelamente inoltre, sempre mediante immunofluorescenza, si rilevava una diminuzione della proteina Cav 1 in condizioni ipossiche al PID 10 e in maniera ancora più marcata in adipociti invecchiati in condizioni standard a PID 18 (Figura 9).

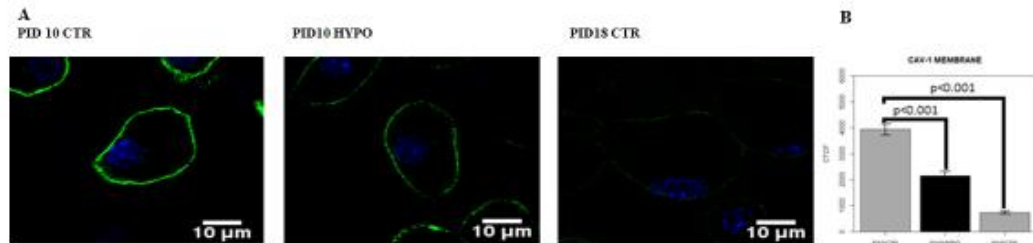


Figura 9: Cav-1 IF: A) immagini significative di adipociti maturi a PID10 in condizioni standard (PID10 CTR), in condizioni d'ipossia severa (PID10 HYPO) ed a PID18 in condizioni standard (PID18 CTR) (scale bar = 10µm); B) grafico di espressione di Cav-1 (media ± deviazione standard).

Nel nostro modello sperimentale dopo stimolo ipossico o in condizioni di invecchiamento cellulare si assisteva quindi a un incremento del collagene in parallelo a una down-regolazione di Cav 1. Cav-1 regola direttamente ed indirettamente i processi fibrotici in vari tessuti [61] (Figura 10).

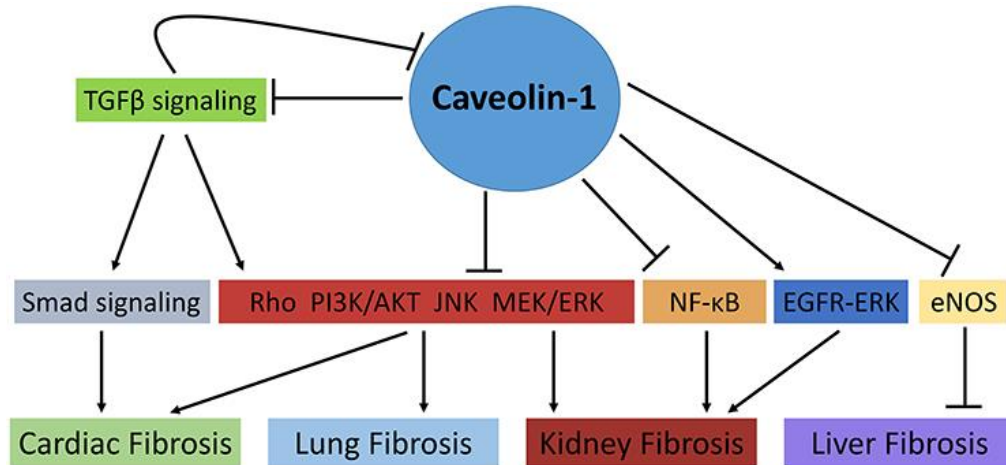


Figura 10: Ruolo di Caveolina-1 nei meccanismi di segnalazione cellulare coinvolti nella fibrosi: Nella fibrosi cardiaca e polmonare, Cav-1 previene la deposizione di collagene, proliferazione dei fibroblasti e segnalazione di TGFβ attraverso la regolazione negativa delle vie di segnalazione Smad e non Smad come GTPase simile a Rho, PI3K / AKT, MAPK (MEK / ERK) e JNK. Allo stesso modo, nella fibrosi renale, Cav-1 modula i processi fibrotici attraverso le vie sopra menzionate e la segnalazione NF-KB. Di nota, la segnalazione TGFβ può anche mediare l'espressione di Cav-1 tramite l'attivazione di vie di segnalazione non SMAD. Al contrario, Cav-1 ha dimostrato di promuovere la fibrosi renale prolungando la segnalazione di EGFR-ERK. Inoltre, nella fibrosi epatica, Cav-1 promuove la cirrosi epatica attraverso la regolazione negativa di eNOS (↓ attivazione; ⊥ inibizione).

Per identificare una possibile via di segnalazione molecolare regolata da Cav 1 nel nostro modello di coltura degli adipociti, è stata effettuata un'analisi Western Blot per le proteine Cav-1, p-ERK e p-AKT in tutte le condizioni sperimentali studiate. I nostri risultati sembrano indicare come, in seguito alla diminuzione di Cav 1, l'ERK Pathway sia più attivo mentre PI3k/AKT Pathway non venga modulato (Figura 11).

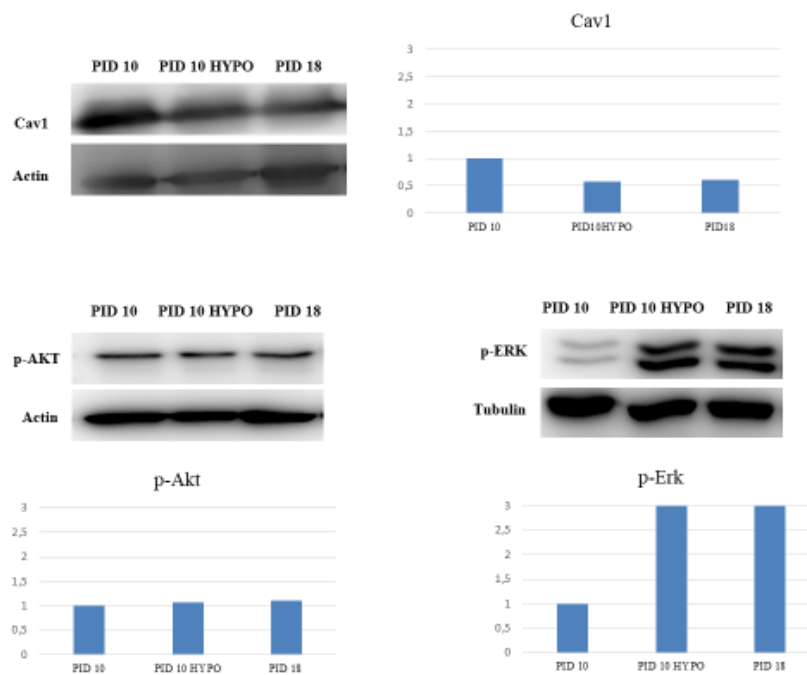


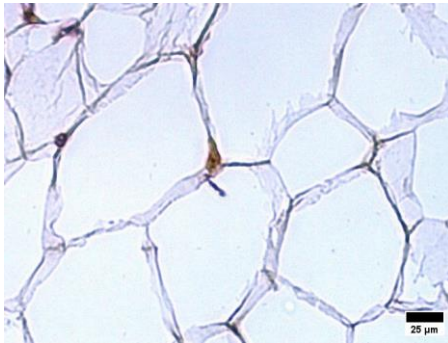
Figura 11: Analisi Western Blot delle proteine Cav1, p-ERK, p-AKT in adipociti “maturi” PID 10 in condizioni standard e dopo ipossia severa ed in adipociti “invecchiati” PID 18 coltivati in condizioni standard. Le proteine β -Actina ed α -Tubulina sono state usate come normalizzatori.

Nella seconda parte della tesi vengono presentati alcuni dati preliminari ottenuti dallo studio traslazionale nell'uomo dei medesimi pathways identificati in vitro. Poiché la malattia coronarica (CHD) rappresenta un modello di ipossia tissutale ed è tra le patologie più diffuse specialmente in età avanzata, si è cercato di studiare la relazione “fibrosi-caveole” in campioni di tessuto adiposo epicardico (EAT) di soggetti con e senza malattia ischemica cronica cardiaca (CAD e non CAD). I risultati preliminari, in un piccolo campione di soggetti, mostravano un aumento dei nuclei

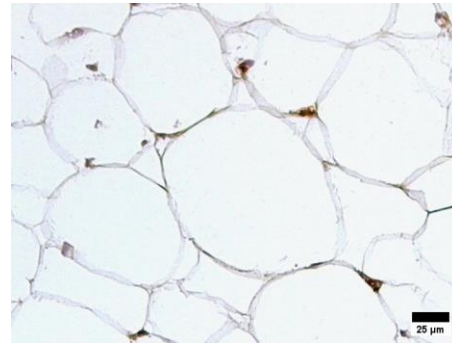
HIF1 α positivi (Figura 12, A, B) ed un aumento della fibrosi del tessuto adiposo epicardico di pazienti CAD rispetto a pazienti non CAD (figura 13 A, B). Quando veniva valutata mediante immunistoichimica la presenza di Cav 1 questa risultava ridotta in modo significativo nei pazienti coronaropatici rispetto ai controlli (Figura 14 A, B).

A

NON CAD



CAD



B

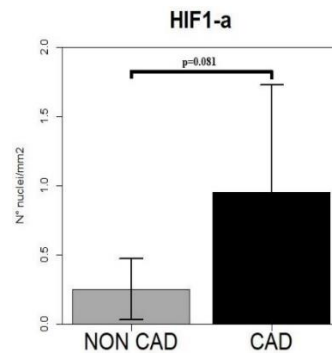
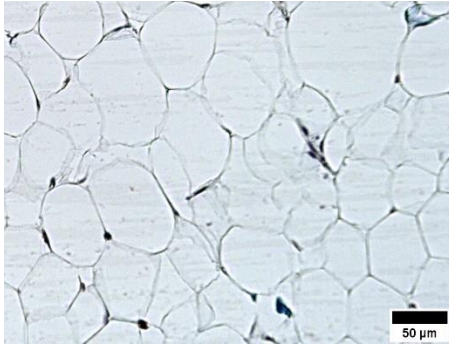


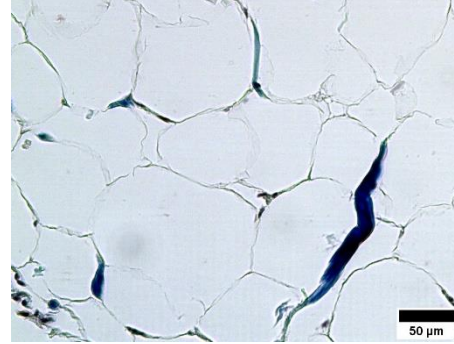
Figura 12: immagini significative (A) e grafico (B) del numero dei nuclei HIF1 α positivi in non-CAD e CAD EAT. CAD = pazienti coronaropatici (affetti da coronary artery disease), non CAD = pazienti non coronaropatici (non affetti da coronary artery disease).

A

NON CAD



CAD



B

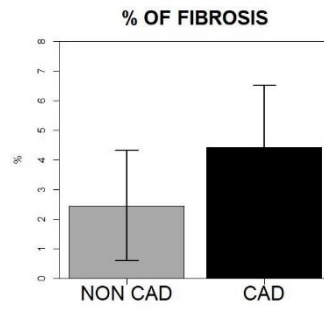
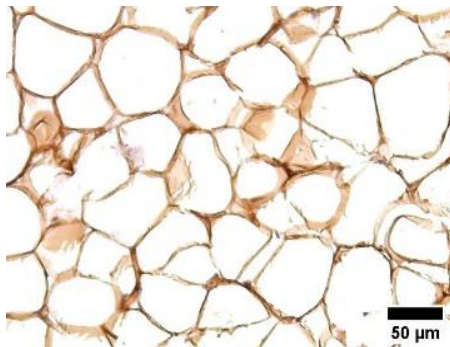


Figura 13: immagini significative (A) e grafico (B) della % di fibrosi in non-CAD e CAD EAT. CAD = pazienti coronaropatici (affetti da coronary artery disease), non CAD = pazienti non coronaropatici (non affetti da coronary artery disease).

A

NON CAD



CAD



B

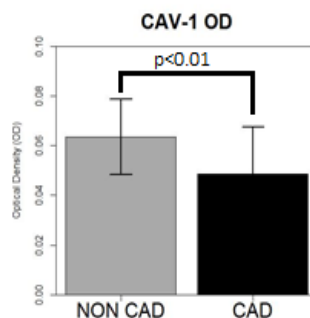


Figura 14: immagini significative (A) e grafico (B) dell'espressione di CAV-1 in non-CAD e CAD EAT. CAD = pazienti coronaropatici (affetti da coronary artery disease), non CAD = pazienti non coronaropatici (non affetti da coronary artery disease).

5. DISCUSSIONE

L'avanzare dell'età si associa a disfunzione del tessuto adiposo, caratterizzata da una ridotta funzionalità dei preadipociti, da aumentata secrezione di citochine pro-infiammatorie e chemochine, da un'aumentata infiltrazione delle cellule immunitarie, ed infine, dall'aumento della senescenza cellulare con fenotipo secretorio associato alla senescenza (SASP) [62].

Il tessuto adiposo è noto per essere un sito di considerevole accumulo di cellule senescenti, nel contesto sia dell'obesità che dell'invecchiamento [63]. I nostri risultati riguardo ad un progressivo aumento, con l'invecchiamento in coltura, della colorazione SA- β -Gal, noto marker dell'invecchiamento cellulare, confermano le precedenti osservazioni ottenute in altri tipi di colture di cellule adipose e nel modello animale [64], nonché nelle cellule stromali di donatori umani anziani [65].

Molti meccanismi diversi sono stati suggeriti alla base dell'aumento degli adipociti senescenti nel tessuto adiposo. Il processo di senescenza è caratterizzato dall'attivazione di due pathway: quello di p53 e quello di pRB [66]. I nostri dati confermano l'attivazione della via p53-p21 nel nostro modello in vitro di invecchiamento degli adipociti valutata mediante analisi Western Blot. Inoltre, gli adipociti che invecchiano sono caratterizzati da una diminuzione dell'espressione di SIRT-1, che è noto per downregolare l'espressione di p53 e p21, contribuendo ulteriormente alla senescenza persistente.

Nel nostro modello in vitro il processo di senescenza degli adipociti è caratterizzato da continui significativi cambiamenti morfologici. Infatti, gli adipociti senescenti presentano un fenotipo ingrandito con un'area maggiore rispetto agli adipociti di controllo, nonché un aumento del contenuto lipidico e questo è in linea con i precedenti dati in vitro [57] [59]. Inoltre, gli adipociti senescenti sono caratterizzati da un nucleo periferico più piccolo e da una grande goccia lipidica centrale circondata da altre più piccole, che riflettono i cambiamenti della cellula stessa nella capacità di immagazzinamento dei lipidi, in linea con i risultati di precedenti studi in vitro [57, 59, 67]. Nel nostro modello è stato riscontrato un cambiamento significativo anche nel profilo funzionale e metabolico degli adipociti senescenti che presentano un profilo infiammatorio più sostenuto rispetto alle cellule più giovani, come dimostrato da una maggiore espressione dei livelli di mRNA di IL-6 accompagnati da una tendenza ad una minore espressione dei livelli di mRNA dell'adiponectina. Questi dati confermano alcuni studi precedentemente pubblicati che supportano il fatto che vi sia un'importante riprogrammazione funzionale e metabolica in corso negli adipociti con l'invecchiamento [57, 58]. In effetti, gli adipociti senescenti possono rappresentare un'importante fonte di molte citochine e chemochine pro-infiammatorie, che possono alterare la produzione dei componenti della matrice extracellulare, modificare le proteasi e promuovere la produzione di specie reattive dell'ossigeno (ROS), creando così un circolo vizioso che va ad implementare ulteriormente i processi di senescenza.

La maggiore produzione e accumulo di ROS intracellulari sono state a lungo considerate un segno distintivo dei processi di invecchiamento in diversi tipi di tessuto. Tuttavia, solo pochi sono i dati pubblicati in letteratura riguardanti il tessuto adiposo. Gu et al. hanno osservato un aumento dei livelli di ROS intracellulari in colture a lungo termine di cellule staminali mesenchimali del cordone ombelicale umano rispetto a quelle giovani [68]. Un aumento della produzione totale di ROS intracellulari nella frazione vascolare stromale (SVF) è stato recentemente descritto anche nel tessuto adiposo sottocutaneo di soggetti più anziani rispetto a quello di bambini ed adulti [69]. Quindi anche i nostri dati sembrano confermare l'aumento della produzione di ROS di adipociti invecchiati in coltura.

La fibrosi è un altro segno distintivo di un tessuto adiposo metabolicamente disfunzionale e può essere presente in varie condizioni fisiopatologiche come l'invecchiamento. È interessante notare che nel nostro modello in vitro, parallelamente all'invecchiamento degli adipociti, è stato riscontrato un cambiamento significativo nei livelli di espressione di mRNA delle proteine chiave correlate al rimodellamento della matrice extracellulare (ECM), con una maggiore espressione di COL1 α 1, Col6a3, Laminin4a e MMP-11 negli adipociti che invecchiano, rispetto alle cellule più giovani. Il rimodellamento dell'ECM del tessuto adiposo è stato ampiamente descritto nella fisiopatologia dell'obesità ed in condizioni d'insulino-resistenza [70-72]. Divoux A. et al hanno dimostrato che il tessuto adiposo di soggetti obesi diventa fibrotico nei depositi di grasso sia sottocutaneo che omentale e la quantità, la distribuzione e i tipi di collagene (I, III e VI) cambiano tra i soggetti magri e quelli obesi; i soggetti obesi presentano, infatti, una maggiore fibrosi totale nel tessuto adiposo omentale ed una maggiore fibrosi pericellulare rispetto ai soggetti magri in entrambi i depositi di grasso (sottocutaneo ed omentale) [70].

Solo pochi studi, tuttavia, hanno esaminato il fenomeno della fibrosi nel TA in relazione all'invecchiamento. Donato et al. hanno osservato un aumento significativo della fibrosi in sezioni istologiche di tessuto adiposo bianco epididimale proveniente da ratti anziani rispetto ad animali giovani [34].

Il collagene VI si distingue dagli altri membri della famiglia del collagene in quanto è sostanzialmente il collagene predominante maggiormente rappresentato nel tessuto adiposo e può quindi avere un ruolo importante nella fisiopatologia degli adipociti. Khan et al. hanno dimostrato che i livelli di espressione di col6a3 sono significativamente aumentati nel grasso epididimale di topi ob / ob e db / db durante gli stati di stress metabolico, con upregulation rispettivamente di 1,3 e 1,4 volte. Sono anche stati esaminati i livelli di col6a3 in una popolazione di soggetti indiani/asiatici, confrontati con un gruppo di controllo di soggetti caucasici. L'espressione di col6a3 è risultata significativamente aumentata nei depositi adiposi sottocutaneo addominale e gluteale in questa coorte indiana asiatica [32]. Questi dati nel loro insieme suggeriscono che la sovraregolazione del collagene VI possa essere un segno distintivo del tessuto adiposo umano disfunzionale. I nostri dati suggeriscono

che anche durante l'invecchiamento degli adipociti si assiste ad una upregolazione dei livelli d'espressione sia a livello dell'mRNA che a livello proteico di Col6a3.

Inoltre, per quanto riguarda l'espressione delle caveole e della caveolina 1 durante i processi d'invecchiamento cellulare, ci sono dati discordanti anche in relazione al tipo cellulare considerato. Infatti, alcuni studi sembrano indicare che Cav-1 sia up-regolato durante la senescenza replicativa e quella prematura indotta da stress. Ad esempio, Cav-1 è up-regolato in HDF senescenti, nelle cellule staminali mesenchimali e nelle cellule stromali del midollo osseo [73, 74]. Coerentemente con i risultati delle cellule senescenti, l'espressione di Cav-1 è molto aumentata nel cervello, nella milza e nel polmone dei vecchi ratti [73, 75]. Il livello di espressione di Cav-1 è anche molto elevato dopo l'esposizione al perossido di idrogeno nelle cellule NIH-3T3 [76]. Poiché il knockdown o knockout di Cav-1 è in grado di prevenire la senescenza prematura indotta dallo stress nelle cellule NIH-3T3 e nei fibroblasti embrionali di topo (MEF), è stato ipotizzato che Cav-1 possa essere un fattore cruciale per la senescenza prematura cellulare [76, 77]. Altri lavori in letteratura, tuttavia, presentano dati discordanti a riguardo: il knockdown di Cav-1 non altera la senescenza prematura indotta dal perossido di idrogeno negli HDF, induce un cambiamento morfologico simile alla senescenza, con aumento delle dimensioni delle cellule [78]. I topi knockout per Cav-1 hanno fenotipi correlati all'invecchiamento in vari organi in quanto presentano neurodegenerazione con invecchiamento precoce, ridotta capacità di rigenerazione epatica, atrofia del tessuto adiposo, ipertrofia patologica del cuore e resistenza all'insulina [40, 44]. Inoltre, in un recente studio condotto da Yu et nel 2017, gli studiosi, utilizzando cellule di carcinoma polmonare umano A549, che esprimono altamente Cav-1 ed effettuando il knockdown di Cav-1 in queste cellule, hanno dimostrato che la carenza di Cav-1 può indurre senescenza cellulare attivando la via p53-p21 con compromissione della respirazione mitocondriale e inattivazione di SIRT1[79].

I nostri dati ottenuti mediante immunofluorescenza ed analisi Western Blot confermano che negli adipociti nel corso del processo d'invecchiamento (durante il quale aumenta anche il numero di cellule senescenti), l'espressione di Cav-1 diminuisce, in accordo con gli studi precedenti condotti in altri tipi cellulari. La riduzione di

Cav-1 porterebbe quindi a una riduzione della sua azione anti-fibrotica con parallelo aumento del collagene.

Globalmente i nostri dati sembrano confermare anche nel tessuto adiposo il ruolo antifibrotico delle caveole e della caveolina 1. E' noto che, in altri tipi di tessuti, la Caveolina-1 regola direttamente ed indirettamente i processi fibrotici: ad esempio, nella fibrosi cardiaca e polmonare, Cav-1 previene la deposizione di collagene, la proliferazione di fibroblasti e la via del TGF β attraverso la regolazione negativa delle vie di segnalazione Smad e non Smad come GTPase simile a Rho, PI3K / AKT, MAPK (MEK / ERK) e JNK. Inoltre, è stato dimostrato che nei fibroblasti polmonari, l'espressione del collagene è regolata da PKC ϵ , PKC α ed ERK-1/2. Nei fibroblasti polmonari SSc, Cav-1 è ridotto, ERK-1/2 è iperattivato e la produzione di collagene è aumentata. Studi in vivo condotti su tessuto polmonare di animali esposti a bleomicina confermano che il tessuto fibrotico è caratterizzato da una ridotta espressione Cav-1, dall'iperattivazione di ERK-1/2 e dall'eccessiva produzione di collagene [80]. I nostri risultati, ottenuti mediante analisi western blot, sono in linea con questi studi precedenti, affermando che anche negli adipociti invecchiati vi è un'iperattivazione della via di segnalazione MEK/ERK che potrebbe portare ad un aumento della produzione di collagene in seguito alla diminuzione delle caveole.

Infine, considerando che l'ipossia è stata riconosciuta come meccanismo di danno tissutale correlato all'invecchiamento, abbiamo studiato gli effetti dell'ipossia nel nostro sistema in vitro, con l'ipotesi che potesse esso stesso rappresentare un modello d'invecchiamento accelerato, alla base della disfunzione tissutale del tessuto adiposo [23].

Per quanto riguarda la relazione ipossia-senescenza, recentemente, sempre più studi dimostrano che Sirt1 svolge un ruolo importante nella protezione dallo stress cellulare e nel controllo delle vie chiave durante l'ischemia/ipossia [81, 82]. Gli studi sul danno da ischemia / ipossia hanno dimostrato che il livello di NAD cellulare diminuisce a causa dell'iperattivazione della polimerasi (PARP), dell'apertura dei pori di transizione della permeabilità mitocondriale (mPTP) e della downregolazione di Nampt [83], portando a down-regolazione di Sirt1.

La P53 è un fattore di trascrizione sensibile allo stress e un soppressore tumorale fondamentale. L'acetilazione di più siti di lisina di p53, compresi i siti 373 e 382, è una condizione necessaria per la sua attività trascrizionale. In un modello sperimentale di cellule H9c2 (mioblasti cardiaci), è stato scoperto che il livello di acetilazione di p53 era aumentato drammaticamente quando le cellule erano soggette a ipossia / riossigenazione (HR). Tuttavia, nelle cellule stressate da ipossia / riossigenazione, il livello di acetilazione di p53 nel gruppo di cellule con Sirt1 attivato è stato significativamente ridotto rispetto a quello nel gruppo di controllo, il che ha suggerito che l'attività di p53 possa essere inibita da Sirt1 [83].

Anche i risultati del nostro studio mostrano che le proteine P53 e Sirt1 sono inversamente correlate tra loro determinando un aumento delle cellule senescenti in coltura rispetto al controllo coltivato in condizioni di normossia. Ciò potrebbe confermare che anche per l'adipocita l'ipossia rappresenta un meccanismo d'invecchiamento accelerato.

Inoltre, nel nostro studio, gli adipociti in ipossia, a livello morfologico, risultavano più piccoli rispetto ai relativi controlli. Zhang et al. hanno descritto una significativa riduzione dei livelli di colorazione Oil Red O in cellule 3T3-L1 cresciute in condizioni di ipossia [23]. Allo stesso modo Donato et al. hanno osservato che il tessuto adiposo di topi anziani presentava adipociti significativamente più piccoli con un fenotipo pro-ossidativo, rispetto alle cellule di animali giovani [34]. La riduzione della dimensione degli adipociti in condizioni ipossiche può essere dovuta a diversi fattori. Negli adipociti ipossici è stata descritta una riduzione dell'assorbimento di acidi grassi, con conseguente riduzione della lipogenesi e aumento della lipolisi [84, 85]. Articoli precedentemente pubblicati hanno mostrato che le condizioni ipossiche inibiscono la lipogenesi e l'adipogenesi in un processo HIF-1 α dipendente [86]. Queste associazioni trovano conferma anche da studi condotti sul tessuto adiposo viscerale di soggetti obesi che presenta un ambiente ipossico; in questi tessuti alti livelli di HIF-1 α sono stati associati negativamente all'espressione di geni coinvolti nella sintesi di acidi grassi [87]. Inoltre, Zhang et al. hanno osservato un aumento di ROS negli adipociti maturi 3T3-L1 cresciuti in condizioni ipossiche, rispetto alla coltura cresciuta in normossia e nel tessuto adiposo dei topi anziani [23].

Inoltre, studi precedenti [28, 35] hanno dimostrato che nel tessuto adiposo in rapida espansione dei soggetti obesi, l'ipossia porta a un'induzione di HIF1 α che a sua volta porta a un potente programma trascrizionale profibrotico e ad un rimodellamento della matrice extracellulare. Questi dati sono in linea con i nostri risultati di real-time ed immunofluorescenza che dimostrano sia un up-regolazione a livello genico (coll1a1, col6a3, laminin4a, MMP11) che un'aumento a livello proteico (col6a3) dei componenti della matrice extracellulare in condizioni d'ipossia severa.

In uno studio di Regazzetti et al del 2015 si afferma che l'ipossia, tramite l'HIF1 α , inibisce l'espressione di cavin 1 e cavin 2 (famiglia di proteine citoplasmatiche che funzionano cooperativamente con le caveoline nella formazione e nella funzione delle caveole) causando un calo significativo del numero di caveole nella membrana plasmatica degli adipociti portando ad insulino-resistenza [88]. Tuttavia, questi autori non hanno rilevato una riduzione dell'espressione di Cav-1 forse a causa di un tempo più breve (16 ore) di incubazione dell'ipossia. Invece, i nostri risultati dimostrano che 24 h di ipossia sono necessarie per raggiungere una riduzione significativa dell'espressione di Cav-1.

Infine, recentemente sta emergendo l'ipotesi che uno dei pathway attivati dall'ipossia durante i processi fibrotici potrebbe essere l'ERK pathway. Infatti Kim et al, esponendo i fibroblasti all'ipossia ed esaminando i meccanismi molecolari a valle della fibrosi cutanea associati alla guarigione delle ferite, hanno dimostrato che ERK fosforilato è un mediatore chiave nella transizione epiteliale-mesenchimale (EMT) indotta dall'ipossia dei fibroblasti durante la guarigione delle ferite. L'attivazione di ERK indotta dall'ipossia era associata ad un aumento dei livelli di marcatori EMT, TGF- β , CTGF e collagene di tipo 1 nei fibroblasti del derma umano (HDF) [89]. Anche i nostri risultati dimostrano che in condizioni ipossiche l'ERK pathway è attivo, in associazione con un aumento del collagene.

Per quanto riguarda lo studio ex vivo condotto su campioni di EAT di soggetti CAD e non CAD, non essendoci fin'ora studi precedenti in letteratura che dimostrano l'inversa correlazione tra la fibrosi e le caveole nel tessuto adiposo epicardico di

soggetti anziani, riteniamo che i nostri risultati, seppur preliminari, siano promettenti e potrebbero aprire la strada ad ulteriori studi ed approfondimenti futuri su questa tematica.

6. CONCLUSIONI

In conclusione, dato che i nostri risultati sull'analisi del tessuto adiposo epicardico umano confermano i dati nel modello in vitro e mostrano una associazione tra Caveolina1, fibrosi stromale e invecchiamento, il nostro modello in vitro d'invecchiamento fisiologico e d'invecchiamento precoce degli adipociti potrebbe essere potenzialmente utile per testare gli effetti di diversi approcci terapeutici finalizzati alla riduzione della disfunzione del tessuto adiposo ed alla riduzione dei processi pro-fibrotici e pro-infiammatori mediante l'up-regolazione delle caveole, portando così ad un miglioramento in termini di salute e della vita.

7. BIBLIOGRAFIA

1. Lopez-Otin, C., et al., *The hallmarks of aging*. Cell, 2013. **153**(6): p. 1194-217.
2. Munoz-Espin, D. and M. Serrano, *Cellular senescence: from physiology to pathology*. Nat Rev Mol Cell Biol, 2014. **15**(7): p. 482-96.
3. Sun, N., R.J. Youle, and T. Finkel, *The Mitochondrial Basis of Aging*. Mol Cell, 2016. **61**(5): p. 654-666.
4. Kollman, C., et al., *Donor characteristics as risk factors in recipients after transplantation of bone marrow from unrelated donors: the effect of donor age*. Blood, 2001. **98**(7): p. 2043-51.
5. Molofsky, A.V., et al., *Increasing p16INK4a expression decreases forebrain progenitors and neurogenesis during ageing*. Nature, 2006. **443**(7110): p. 448-52.
6. McHugh, D. and J. Gil, *Senescence and aging: Causes, consequences, and therapeutic avenues*. J Cell Biol, 2018. **217**(1): p. 65-77.
7. Kirkland, J.L. and T. Tchkonja, *Cellular Senescence: A Translational Perspective*. EBioMedicine, 2017. **21**: p. 21-28.
8. Kershaw, E.E. and J.S. Flier, *Adipose tissue as an endocrine organ*. Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism, 2004. **89**(6): p. 2548-2556.
9. Stout, M.B., et al., *Physiological Aging: Links Among Adipose Tissue Dysfunction, Diabetes, and Frailty*. Physiology, 2017. **32**(1): p. 9-19.
10. Monickaraj, F., et al., *Accelerated fat cell aging links oxidative stress and insulin resistance in adipocytes*. J Biosci, 2013. **38**(1): p. 113-22.
11. Xu, H., et al., *Chronic inflammation in fat plays a crucial role in the development of obesity-related insulin resistance*. J Clin Invest, 2003. **112**(12): p. 1821-30.
12. Schwer, B. and E. Verdin, *Conserved metabolic regulatory functions of sirtuins*. Cell Metab, 2008. **7**(2): p. 104-12.
13. Yoshizaki, T., et al., *SIRT1 exerts anti-inflammatory effects and improves insulin sensitivity in adipocytes*. Mol Cell Biol, 2009. **29**(5): p. 1363-74.
14. Gillum, M.P., et al., *Sirt1 regulates adipose tissue inflammation*. Diabetes, 2011. **60**(12): p. 3235-45.
15. Perez, L.M., et al., *'Adipaging': ageing and obesity share biological hallmarks related to a dysfunctional adipose tissue*. J Physiol, 2016. **594**(12): p. 3187-207.
16. Poulou, N. and R. Raju, *Sirtuin regulation in aging and injury*. Biochim Biophys Acta, 2015. **1852**(11): p. 2442-55.
17. Warolin, J., et al., *The relationship of oxidative stress, adiposity and metabolic risk factors in healthy Black and White American youth*. Pediatr Obes, 2014. **9**(1): p. 43-52.
18. Wu, D. and P. Yotnda, *Induction and Testing of Hypoxia in Cell Culture*. Journal of Visualized Experiments, 2011(54).
19. Semenza, G.L., *Vascular responses to hypoxia and ischemia*. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 2010. **30**(4): p. 648-52.
20. Weinstein, J.R. and S. Anderson, *The aging kidney: physiological changes*. Adv Chronic Kidney Dis, 2010. **17**(4): p. 302-7.
21. Rausch, M.E., et al., *Obesity in C57BL/6J mice is characterized by adipose tissue hypoxia and cytotoxic T-cell infiltration*. Int J Obes (Lond), 2008. **32**(3): p. 451-63.

22. Ye, J., et al., *Hypoxia is a potential risk factor for chronic inflammation and adiponectin reduction in adipose tissue of ob/ob and dietary obese mice*. *Am J Physiol Endocrinol Metab*, 2007. **293**(4): p. E1118-28.
23. Zhang, L., et al., *Aging is associated with hypoxia and oxidative stress in adipose tissue: implications for adipose function*. *Am J Physiol Endocrinol Metab*, 2011. **301**(4): p. E599-607.
24. Mariman, E.C. and P. Wang, *Adipocyte extracellular matrix composition, dynamics and role in obesity*. *Cell Mol Life Sci*, 2010. **67**(8): p. 1277-92.
25. Aratani, Y. and Y. Kitagawa, *Enhanced synthesis and secretion of type IV collagen and entactin during adipose conversion of 3T3-L1 cells and production of unorthodox laminin complex*. *J Biol Chem*, 1988. **263**(31): p. 16163-9.
26. Nakajima, I., et al., *Adipose tissue extracellular matrix: newly organized by adipocytes during differentiation*. *Differentiation*, 1998. **63**(4): p. 193-200.
27. Trayhurn, P., B. Wang, and I.S. Wood, *Hypoxia and the endocrine and signalling role of white adipose tissue*. *Arch Physiol Biochem*, 2008. **114**(4): p. 267-76.
28. Sun, K., et al., *Fibrosis and adipose tissue dysfunction*. *Cell Metab*, 2013. **18**(4): p. 470-7.
29. Sun, K., et al., *Endotrophin triggers adipose tissue fibrosis and metabolic dysfunction*. *Nat Commun*, 2014. **5**: p. 3485.
30. Chun, T.H., et al., *A pericellular collagenase directs the 3-dimensional development of white adipose tissue*. *Cell*, 2006. **125**(3): p. 577-91.
31. Gregor, M.F. and G.S. Hotamisligil, *Inflammatory mechanisms in obesity*. *Annu Rev Immunol*, 2011. **29**: p. 415-45.
32. Khan, T., et al., *Metabolic dysregulation and adipose tissue fibrosis: role of collagen VI*. *Mol Cell Biol*, 2009. **29**(6): p. 1575-91.
33. Henegar, C., et al., *Adipose tissue transcriptomic signature highlights the pathological relevance of extracellular matrix in human obesity*. *Genome Biol*, 2008. **9**(1): p. R14.
34. Donato, A.J., et al., *The impact of ageing on adipose structure, function and vasculature in the B6D2F1 mouse: evidence of significant multisystem dysfunction*. *J Physiol*, 2014. **592**(18): p. 4083-96.
35. Halberg, N., et al., *Hypoxia-inducible factor 1alpha induces fibrosis and insulin resistance in white adipose tissue*. *Mol Cell Biol*, 2009. **29**(16): p. 4467-83.
36. Sacks, H.S. and J.N. Fain, *Human epicardial adipose tissue: a review*. *Am Heart J*, 2007. **153**(6): p. 907-17.
37. Semenza, G.L., *Oxygen sensing, hypoxia-inducible factors, and disease pathophysiology*. *Annu Rev Pathol*, 2014. **9**: p. 47-71.
38. Wang, T.D., et al., *Association of epicardial adipose tissue with coronary atherosclerosis is region-specific and independent of conventional risk factors and intra-abdominal adiposity*. *Atherosclerosis*, 2010. **213**(1): p. 279-87.
39. Hatem, S.N. and P. Sanders, *Epicardial adipose tissue and atrial fibrillation*. *Cardiovasc Res*, 2014. **102**(2): p. 205-13.
40. Cohen, A.W., et al., *Role of caveolin and caveolae in insulin signaling and diabetes*. *Am J Physiol Endocrinol Metab*, 2003. **285**(6): p. E1151-60.
41. Busija, A.R., H.H. Patel, and P.A. Insel, *Caveolins and cavins in the trafficking, maturation, and degradation of caveolae: implications for cell physiology*. *Am J Physiol Cell Physiol*, 2017. **312**(4): p. C459-C477.
42. Hayer, A., et al., *Biogenesis of caveolae: stepwise assembly of large caveolin and cavin complexes*. *Traffic*, 2010. **11**(3): p. 361-82.

43. Cohen, A.W., et al., *Role of caveolae and caveolins in health and disease*. *Physiol Rev*, 2004. **84**(4): p. 1341-79.
44. Briand, N., et al., *Caveolin-1 expression and cavin stability regulate caveolae dynamics in adipocyte lipid store fluctuation*. *Diabetes*, 2014. **63**(12): p. 4032-44.
45. Dietzen, D.J., W.R. Hastings, and D.M. Lublin, *Caveolin is palmitoylated on multiple cysteine residues. Palmitoylation is not necessary for localization of caveolin to caveolae*. *J Biol Chem*, 1995. **270**(12): p. 6838-42.
46. Boscher, C. and I.R. Nabi, *Caveolin-1: role in cell signaling*. *Adv Exp Med Biol*, 2012. **729**: p. 29-50.
47. Quest, A.F., L. Leyton, and M. Parraga, *Caveolins, caveolae, and lipid rafts in cellular transport, signaling, and disease*. *Biochem Cell Biol*, 2004. **82**(1): p. 129-44.
48. Williams, T.M. and M.P. Lisanti, *Caveolin-1 in oncogenic transformation, cancer, and metastasis*. *Am J Physiol Cell Physiol*, 2005. **288**(3): p. C494-506.
49. Podar, K., et al., *Essential role of caveolae in interleukin-6- and insulin-like growth factor I-triggered Akt-1-mediated survival of multiple myeloma cells*. *J Biol Chem*, 2003. **278**(8): p. 5794-801.
50. Scherer, P.E., et al., *Induction of caveolin during adipogenesis and association of GLUT4 with caveolin-rich vesicles*. *J Cell Biol*, 1994. **127**(5): p. 1233-43.
51. Gustavsson, J., et al., *Localization of the insulin receptor in caveolae of adipocyte plasma membrane*. *FASEB J*, 1999. **13**(14): p. 1961-71.
52. Garrean, S., et al., *Caveolin-1 regulates NF-kappa B activation and lung inflammatory response to sepsis induced by lipopolysaccharide*. *Journal of Immunology*, 2006. **177**(7): p. 4853-4860.
53. Wang, X.M., et al., *Caveolin-1 confers antiinflammatory effects in murine macrophages via the MKK3/p38 MAPK pathway*. *Am J Respir Cell Mol Biol*, 2006. **34**(4): p. 434-42.
54. Gvaramia, D., et al., *Role of caveolin-1 in fibrotic diseases*. *Matrix Biol*, 2013. **32**(6): p. 307-15.
55. Zhang, G.Y., et al., *Role of caveolin-1 in the pathogenesis of tissue fibrosis by keloid-derived fibroblasts in vitro*. *Br J Dermatol*, 2011. **164**(3): p. 623-7.
56. Tourkina, E., et al., *Antifibrotic properties of caveolin-1 scaffolding domain in vitro and in vivo*. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*, 2008. **294**(5): p. L843-61.
57. Yu, Y.H. and H. Zhu, *Chronological changes in metabolism and functions of cultured adipocytes: a hypothesis for cell aging in mature adipocytes*. *Am J Physiol Endocrinol Metab*, 2004. **286**(3): p. E402-10.
58. Zoico, E., et al., *In vitro aging of 3T3-L1 mouse adipocytes leads to altered metabolism and response to inflammation*. *Biogerontology*, 2010. **11**(1): p. 111-22.
59. Zoico, E., et al., *In vitro model of chronological aging of adipocytes: Interrelationships with hypoxia and oxidation*. *Exp Gerontol*, 2019. **121**: p. 81-90.
60. White, U.A. and Y.D. Tchoukalova, *Sex dimorphism and depot differences in adipose tissue function*. *Biochim Biophys Acta*, 2014. **1842**(3): p. 377-92.
61. Shihata, W.A., M.R.A. Putra, and J.P.F. Chin-Dusting, *Is There a Potential Therapeutic Role for Caveolin-1 in Fibrosis?* *Front Pharmacol*, 2017. **8**: p. 567.
62. Stout, M.B., et al., *Physiological Aging: Links Among Adipose Tissue Dysfunction, Diabetes, and Frailty*. *Physiology (Bethesda)*, 2017. **32**(1): p. 9-19.
63. Tchkonina, T., et al., *Fat tissue, aging, and cellular senescence*. *Aging Cell*, 2010. **9**(5): p. 667-84.

64. Hasan, A.U., et al., *Increase in tumor suppressor Arf compensates gene dysregulation in in vitro aged adipocytes*. *Biogerontology*, 2017. **18**(1): p. 55-68.
65. Stenderup, K., et al., *Aging is associated with decreased maximal life span and accelerated senescence of bone marrow stromal cells*. *Bone*, 2003. **33**(6): p. 919-26.
66. Vicencio, J.M., et al., *Senescence, apoptosis or autophagy? When a damaged cell must decide its path--a mini-review*. *Gerontology*, 2008. **54**(2): p. 92-9.
67. Cartwright, M.J., T. Tchkonina, and J.L. Kirkland, *Aging in adipocytes: potential impact of inherent, depot-specific mechanisms*. *Exp Gerontol*, 2007. **42**(6): p. 463-71.
68. Gu, Y., et al., *Changes in mesenchymal stem cells following long-term culture in vitro*. *Mol Med Rep*, 2016. **13**(6): p. 5207-15.
69. Liu, M., et al., *Adipose-Derived Mesenchymal Stem Cells from the Elderly Exhibit Decreased Migration and Differentiation Abilities with Senescent Properties*. *Cell Transplant*, 2017. **26**(9): p. 1505-1519.
70. Divoux, A., et al., *Fibrosis in human adipose tissue: composition, distribution, and link with lipid metabolism and fat mass loss*. *Diabetes*, 2010. **59**(11): p. 2817-25.
71. Lin, T.H. Chun, and L. Kang, *Adipose extracellular matrix remodelling in obesity and insulin resistance*. *Biochem Pharmacol*, 2016. **119**: p. 8-16.
72. Arcidiacono, B., et al., *Expression of matrix metalloproteinase-11 is increased under conditions of insulin resistance*. *World J Diabetes*, 2017. **8**(9): p. 422-428.
73. Park, J.S., et al., *Increased caveolin-1, a cause for the declined adipogenic potential of senescent human mesenchymal stem cells*. *Mech Ageing Dev*, 2005. **126**(5): p. 551-9.
74. Sun, C., et al., *Inhibition of phosphatidylcholine-specific phospholipase C prevents bone marrow stromal cell senescence in vitro*. *J Cell Biochem*, 2009. **108**(2): p. 519-28.
75. Kang, M.J., et al., *Caveolin-1 upregulation in senescent neurons alters amyloid precursor protein processing*. *Exp Mol Med*, 2006. **38**(2): p. 126-33.
76. Volonte, D., et al., *Expression of caveolin-1 induces premature cellular senescence in primary cultures of murine fibroblasts*. *Mol Biol Cell*, 2002. **13**(7): p. 2502-17.
77. Bartholomew, J.N., D. Volonte, and F. Galbiati, *Caveolin-1 regulates the antagonistic pleiotropic properties of cellular senescence through a novel Mdm2/p53-mediated pathway*. *Cancer Res*, 2009. **69**(7): p. 2878-86.
78. Madaro, L., et al., *Knock down of caveolin-1 affects morphological and functional hallmarks of human endothelial cells*. *J Cell Biochem*, 2013. **114**(8): p. 1843-51.
79. Yu, D.M., et al., *Caveolin-1 deficiency induces premature senescence with mitochondrial dysfunction*. *Aging Cell*, 2017. **16**(4): p. 773-784.
80. Tourkina, E., et al., *Opposing effects of protein kinase Calpha and protein kinase Cepsilon on collagen expression by human lung fibroblasts are mediated via MEK/ERK and caveolin-1 signaling*. *J Biol Chem*, 2005. **280**(14): p. 13879-87.
81. Zhang, F., et al., *Protective effects of icariin-mediated SIRT1/FOXO3 signaling pathway on intestinal ischemia/reperfusion-induced acute lung injury*. *Mol Med Rep*, 2015. **11**(1): p. 269-76.
82. Meng, X., et al., *Sirt1: Role Under the Condition of Ischemia/Hypoxia*. *Cell Mol Neurobiol*, 2017. **37**(1): p. 17-28.
83. Liu, L., et al., *Exogenous NAD(+) supplementation protects H9c2 cardiac myoblasts against hypoxia/reoxygenation injury via Sirt1-p53 pathway*. *Fundam Clin Pharmacol*, 2014. **28**(2): p. 180-9.

84. Trayhurn, P., *Hypoxia and Adipose Tissue Function and Dysfunction in Obesity*. *Physiological Reviews*, 2013. **93**(1): p. 1-21.
85. Trayhurn, P. and S.Y. Alomar, *Oxygen deprivation and the cellular response to hypoxia in adipocytes - perspectives on white and brown adipose tissues in obesity*. *Front Endocrinol (Lausanne)*, 2015. **6**: p. 19.
86. Yim, S., et al., *Insulin and hypoxia share common target genes but not the hypoxia-inducible factor-1alpha*. *J Biol Chem*, 2003. **278**(40): p. 38260-8.
87. Garcia-Fuentes, E., et al., *Hypoxia is associated with a lower expression of genes involved in lipogenesis in visceral adipose tissue*. *J Transl Med*, 2015. **13**: p. 373.
88. Regazzetti, C., et al., *Hypoxia inhibits Cavin-1 and Cavin-2 expression and down-regulates caveolae in adipocytes*. *Endocrinology*, 2015. **156**(3): p. 789-801.
89. Kim, J., et al., *Hypoxia-Induced Epithelial-To-Mesenchymal Transition Mediates Fibroblast Abnormalities via ERK Activation in Cutaneous Wound Healing*. *Int J Mol Sci*, 2019. **20**(10).