



Università Politecnica delle Marche

Facoltà di Medicina e Chirurgia

Dottorato di ricerca XV° ciclo

“Salute dell’Uomo”

**Studio comparativo sullo
sviluppo dell’Organo Adiposo
nell’uomo e nel topo.
Potenziali correlazioni morfo-
funzionali**

Relatore: Chiar.mo Prof.
Saverio Cinti

Tesi di dottorato di:
Loris Sartini

Correlatore: Chiar.mo Prof
Andrea Frontini

Indice

1 Introduzione

- 1.1 Il concetto di organo adiposo.**
- 1.2 Il tessuto adiposo bianco (WAT).**
- 1.3 Il tessuto adiposo bruno (BAT).**
- 1.4 L'innervazione e la vascolarizzazione dell'organo adiposo.**
- 1.5 La plasticità dell'organo adiposo.**
- 1.6 Anatomia macroscopica dell'organo adiposo nel modello animale.**
- 1.7 Anatomia macroscopica dell'organo adiposo nell'uomo.**
- 1.8 Stato dell'arte sullo sviluppo prenatale dell'organo adiposo nell'uomo.**
- 1.9 Perdita del fenotipo bruno durante la crescita e l'insorgenza dell'obesità: il "whitening".**
- 1.10 OBIETTIVO: Studiare lo sviluppo dell'organo adiposo nell'uomo. Valutare potenziali correlazioni morfo-funzionali con il modello murino.**

2 Materiali e Metodi

- 2.1 Soggetti inclusi nello studio e depositi adiposi analizzati.**
- 2.2 Istologia (microscopia ottica).**
- 2.3 Immunoistochimica (UCP1- TH-CD56- ZIC1).**
- 2.4 Microscopia elettronica a trasmissione (TEM).**

3 Risultati

- 3.1 Analisi morfologica dei depositi sottocutanei e viscerali dei feti del gruppo early (precoci); istologia, immunoistochimica e TEM.**
- 3.2 Analisi istologica e immunoistochimica dei depositi sottocutanei e viscerali nei feti del gruppo intermedio.**
- 3.3 Analisi morfologica dei depositi sottocutanei e viscerali nei feti late (pre-termine); istologia e immunoistochimica.**
- 3.4 Focus sull'analisi immunoistologica per lo ZIC1.**

4 Conclusione

5 Riferimenti bibliografici

6 Sezione iconografica

1 Introduzione

1.1 Il concetto di Organo Adiposo

Il tessuto adiposo viene definito da molti un tessuto connettivo senza una specifica anatomia e con una distribuzione semplicemente descritta come sottocutanea e viscerale. Anche la fisiologia propria di questo tessuto è stata in qualche modo sottovalutata e limitata principalmente ad un'azione di accumulo/rilascio dei lipidi a seconda delle necessità dell'organismo e ad un ruolo meccanico di protezione e termo-regolazione. La diffusione epidemica dell'obesità e delle sue complicanze cliniche, in particolar modo nell'ultimo trentennio, hanno attirato l'attenzione della comunità scientifica verso questo tessuto che riveste ora una funzione centrale nella comprensione fisiopatologica dell'obesità e del diabete.

Le evidenze morfologiche e la grande mole di dati su nuove molecole prodotte e secrete da questo tessuto, hanno avvalorato l'idea di un tessuto con anatomia e fisiologia molto più complesse di quanto prima si pensasse e dalla quale è scaturito il concetto di Organo Adiposo Endocrino.

Andando ad analizzare la definizione di organo "l'unità definibile morfologicamente, costituita dall'associazione di diversi tessuti che svolgono funzioni tra loro integrate ad un fine comune", questa viene soddisfatta in pieno dalle caratteristiche morfo-funzionali dell'organo adiposo.

La definizione più corretta è quella di un organo a multi-depositi, disseccabili dalle altre strutture per la presenza di piani di clivaggio e forniti di uno specifico corredo vascolo-nervoso in cui la componente nervosa è principalmente noradrenergica.

I due tessuti principali che costituiscono l'organo sono: i) il tessuto adiposo bianco (white adipose tissue; WAT) e ii) il tessuto adiposo bruno (brown adipose tissue; BAT). Essi sono costituiti da cellule assai differenti per caratteristiche morfologiche, biochimiche e funzionali, tuttavia sono entrambi presenti nello stesso organo all'interno del quale cooperano funzionalmente al mantenimento dell'omeostasi energetica (1). Si trovano inoltre zone miste, le quali contengono adipociti che presentano caratteristiche morfologiche e funzionali intermedie tra i tipici adipociti bianchi e bruni. In queste zone si è identificato un terzo citotipo cellulare

chiamato pauciloculare o brite/beige (2) (3) (Fig.1). Non da ultimo la scoperta e la caratterizzazione di tutta una serie di molecole prodotte da quest'organo, tra le quali la leptina, definito l'ormone della sazietà che è in grado di andare ad influenzare l'assunzione del cibo a livello ipotalamico, hanno definitivamente permesso di guardare al "grasso" come un organo vero e proprio sia dal punto di vista anatomico che funzionale e di descrivere molti dei pathways molecolari tramite i quali avviene il cross-talk con altri organi tra cui il sistema nervoso centrale (4). Quindi una conoscenza dettagliata di questo organo, sia dal punto di vista morfologico che funzionale, è un prerequisito per elaborare strategie atte a combattere l'obesità e la sindrome metabolica.

1.2 Il tessuto adiposo bianco (WAT)

Il tessuto adiposo bianco è caratterizzato da un colore bianco-giallastro e risulta costituito prevalentemente da adipociti bianchi (Fig.2A).

Si tratta di una cellula avente una forma sferica che può raggiungere dimensioni assai variabili (da un minimo di 10 μm ad un massimo di 200 μm di diametro).

Identificata dalla presenza di un unico vacuolo lipidico citoplasmatico contenente trigliceridi che occupa più del 90% del volume cellulare, questa cellula assume un aspetto morfologico uniloculare (2).

Un sottile strato di citoplasma riveste il vacuolo lipidico e si allarga leggermente in prossimità del nucleo (Fig.2B).

Dall'osservazione al microscopio elettronico si notano in sede peri-nucleare tutti gli altri organuli citoplasmatici: mitocondri, cisterne di reticolo endoplasmatico rugoso e liscio ed un piccolo apparato di Golgi. I mitocondri hanno una forma lunga e sottile, sormontata da piccole creste variamente orientate.

Su tutto il contorno esterno della membrana plasmatica ritroviamo una distinta membrana basale.

Dal punto di vista funzionale l'adipocita bianco funge da deposito di molecole altamente energetiche, i trigliceridi, le quali in seguito a stimolo nervoso (ortosimpatico) guidato da bassi livelli di insulina e glicemia, vengono rilasciate in circolo.

Gli adipociti, oltre ad essere la principale sorgente di acidi grassi, sono stati riconosciuti quali importanti centri di produzione di proteine con funzioni altamente specializzate, di ormoni e di fattori di crescita, secreti sia in condizioni basali che sotto stimolo ormonale.

Un esempio, come già accennato, è la leptina, il principale messaggero che stimola i circuiti cerebrali della sazietà a livello del nucleo arcuato, in maniera proporzionale alle dimensioni raggiunte dall'organo adiposo.

Oltre alla modulazione dei circuiti nervosi che regolano l'appetito, essa va a svolgere un controllo più fine di tipo endocrino, metabolico e nutrizionale sia a breve che a lungo termine.

La leptina viene prodotta in proporzione alla massa adiposa; il digiuno prolungato provoca un calo della sua sintesi, mentre il ripristino dell'alimentazione riporta velocemente le concentrazioni tissutali della stessa a valori normali. Essa va ad agire come sensore della disponibilità di nutrienti per l'organo adiposo, in quanto la sua sintesi viene indotta dall'aumento della glicemia e della lipidemia (5).

Può operare/intervenire direttamente sul metabolismo, inibendo la lipogenesi e stimolando la lipolisi; regola inoltre l'ematopoiesi, l'angiogenesi e controlla la pressione arteriosa e la formazione di tessuto osseo.

Un'altra proteina di grande importanza secreta dal WAT è l'adiponectina.

Essa va ad esaltare le azioni metaboliche dell'insulina, così come bassi livelli riscontrabili nei soggetti diabetici favoriscono il fenomeno dell'insulino-resistenza.

L'adiponectina impedisce inoltre ai monociti di aderire alle cellule endoteliali, evento precoce nella genesi della placca aterosclerotica, suggerendo un ruolo protettivo nei confronti del danno vascolare (6).

Il tessuto adiposo bianco svolge altre funzioni spesso legate al distretto anatomico in cui è localizzato, quali l'isolamento termico (pannicolo adiposo sottocutaneo) e di ammortizzatore meccanico in zone particolarmente sottoposte a pressione (es. pianta del piede e rotula). La distribuzione anatomica di questo tessuto è, in condizioni normali, prevalentemente in sede sottocutanea ma in condizioni di obesità la quantità aumenta anche di 10 volte nella sede viscerale dove il WAT svolge maggiormente la sua azione morbigena in particolare quando si accumula in specifiche sedi come in quella mediastinica e mesenterica.

1.3 Il tessuto adiposo bruno (BAT)

Tramite osservazione macroscopica a fresco, il BAT si presenta con una colorazione molto più scura rispetto al WAT (più assimilabile al muscolo), dovuta alla ricca vascolarizzazione ed alla presenza di grandi e numerosi mitocondri, caratteristica peculiare di questo tessuto.

L'elemento parenchimale dominante è l'adipocita bruno, differente dall'adipocita bianco per la sua forma poliedrica, con dimensioni che oscillano tra i 15-50 μm di diametro (Fig.2C).

Dal punto di vista morfologico è caratterizzato da un nucleo rotondo in posizione centrale circondato da un abbondante citoplasma ricco di organuli. All'interno del citoplasma ritroviamo piccoli e numerosi vacuoli lipidici costituiti da trigliceridi, caratteristica che gli conferisce il nome di cellula multiloculare (Fig.2D).

Tramite l'utilizzo della microscopia elettronica osserviamo che queste cellule sono ricche di mitocondri di notevoli dimensioni contenenti un elevato numero di creste trasversali ed impacchettate tra loro (Fig. 2F).

Oltre ad essere ben distinguibili tutti gli organuli, si denota una notevole presenza di perossisomi, organuli che rivestono l'importante funzione di neutralizzazione dell'enorme numero di radicali liberi che si formano dalla beta-ossidazione degli acidi grassi nelle catene respiratorie mitocondriali che lo stesso userà per produrre calore.

Questa particolare attività è resa possibile dalla presenza di una proteina mitocondriale unica nell'organismo, l'uncoupling protein 1 (UCP1), che costituisce un marker univoco del fenotipo bruno e che caratterizza questo citotipo dal punto di vista funzionale (7).

L'UCP1 è una proteina protonofora inserita nella membrana interna mitocondriale che costituisce un canale protonico alternativo all'ATP-sintasi per il rientro degli ioni H^+ . Tale azione permette di vanificare il gradiente generato durante la respirazione cellulare, impedire la formazione di ATP ed ottenere solo la produzione di calore come prodotto finale (8).

L'effetto appena descritto costituisce il principale meccanismo non muscolare di controllo della temperatura corporea al di sotto della termoneutralità. Questo valore varia da specie a specie (28°-32°C nel topo, 22°C nell'uomo) (9) ed essenzialmente dipende dal rapporto superficie/volume

dell'organismo. La legge di Bergman riferisce che gli animali di grandi dimensioni hanno un rapporto superficie/volume minore rispetto agli animali di piccole dimensioni, quindi disperdono il calore molto più lentamente e si trovano avvantaggiati nei climi più temperati, mentre gli animali di piccole dimensioni sopravvivono meglio in climi caldi e secchi, dove la loro capacità di disperdere velocemente il calore è d'indubbio vantaggio.

L'elevata attività metabolica e la grande quantità di calore prodotto dagli adipociti bruni, richiedono un'abbondante vascolarizzazione del tessuto; si noti che ad ogni singola cellula arrivano due o tre capillari, permettendo il rapido smaltimento del calore prodotto e facilitando l'apporto di ossigeno per l'ossidazione degli acidi grassi (Fig. 2E).

Un'altra caratteristica osservabile nel BAT è l'intensa innervazione (10).

Questo consente al BAT di interfacciarsi con il sistema nervoso e rispondere ai cambiamenti causati dagli stimoli ambientali. La maggior parte delle fibre parenchimali (fibre nervose che entrano a contatto con gli adipociti), esprimono la tirosina idrossilasi (TH), un enzima che catalizza uno degli ultimi passaggi di sintesi della noradrenalina e quindi ampiamente considerato un marker affidabile delle fibre noradrenergiche.

Al di sotto del valore di termoneutralità si attiva il sistema nervoso ortosimpatico con il rilascio di noradrenalina che agisce sul recettore beta₃ adrenergico, promuovendo l'attivazione e la neosintesi dell'UCP₁ e determinando variazioni morfologiche evidenti come l'iperplasia e l'ipertrofia mitocondriale oltre alla riduzione del carico dei vacuoli lipidici.

L'esposizione acuta e l'acclimatamento cronico al freddo aumentano l'espressione di TH in correlazione all'aumento delle fibre parenchimali ed in parallelo all'incremento del numero degli adipociti bruni presenti all'interno dell'organo (fenomeno a cui ci si riferisce con il termine di "browning"). Pertanto, l'organo adiposo di animali esposti al freddo è più bruno e più densamente innervato rispetto all'organo adiposo di animali che vivono a temperature di termoneutralità. L'induzione del browning dell'organo adiposo negli animali obesi (sia geneticamente obesi che con obesità indotta da dieta grassa), si correla con un miglioramento del quadro metabolico (11). Questa evidenza ha aperto la strada ad una serie di prospettive terapeutiche con lo scopo di reclutare nuovi adipociti bruni e/o attivare quelli già presenti

anche nell'organismo di soggetti adulti nei quali è stata recentemente descritta la presenza di questo tessuto che veniva ritenuta fisiologicamente non rilevante.

1.4 L'innervazione e la vascolarizzazione dell'organo adiposo

Molte delle funzioni svolte all'interno dell'organo adiposo, sono sotto il controllo del Sistema Nervoso Periferico ed in particolare guidate dalla branca ortosimpatica e dalla noradrenalina rilasciata dai nervi a livello parenchimale nel WAT e nel BAT.

La noradrenalina, a livello degli adipociti maturi, interagisce con tutti e tre i recettori β e con i recettori α_1 , α_2 ; il sistema di signalling include un neurotrasmettitore unico e non molti recettori ma è comunque molto complesso. E' importante notare come lo stimolo adrenergico in diversi contesti fisiologici (es. digiuno o stimolazione a freddo) determini eventi finalistici molto diversi in uno stesso deposito che forma l'organo (es. sottocutaneo inguinale dell'animale): la lipolisi e il rilascio di trigliceridi nel primo caso è l'evento dominante mentre la stimolazione della termogenesi nel secondo diventa l'evento fisiologico prevalente. Infatti, dopo un digiuno prolungato si nota la comparsa di cellule fibroblastoidi (adipociti bianchi dimagriti) prive di accumuli lipidici, mentre nel secondo caso avviene una trasformazione del fenotipo da bianco a bruno. Questo dipende molto probabilmente dal diverso milieu di molecole circolanti che le due situazioni presentano. La via di trasduzione del segnale maggiormente studiata è quella β adrenergica responsabile della termogenesi. Dei tre sottotipi di recettori β adrenergici, il β_3 -adrenergico è il più significativo dal momento che è stato ritrovato solo negli adipociti bianchi e bruni. L'attivazione del recettore β_3 , da parte della noradrenalina, attiva una proteina G associata al recettore la quale a cascata attiva la via dell'AMPC, che porta alla fosforilazione della PKA. Quest'ultima causerà due risultati finali: la lipolisi degli acidi grassi contenuti nei vacuoli lipidici utilizzati come substrato energetico nella termogenesi e l'aumento dell'espressione dell'UCP1 (8). Il grado di innervazione dei vari depositi varia in base al fenotipo predominante nel deposito e allo stato funzionale dell'organo adiposo. Il BAT risulta essere più densamente

innervato rispetto al WAT, dato che si riscontrano numerose fibre noradrenergiche anche all'interno dei lobuli (intralobulari) a stretto contatto con gli adipociti bruni. Inoltre la densità parenchimale delle fibre nervose aumenta nel BAT durante l'esposizione a freddo e nel WAT durante il digiuno (12) (13) (14). Per il nostro studio morfo-funzionale abbiamo usato due marker per indagare sulla componente nervosa dei tessuti adiposi: come marker costitutivo delle fibre nervose è stato impiegato il CD56 o NCAM (neural cell adhesion), una molecola di glicoproteina espressa sulla superficie dei neuroni che ha un ruolo nella crescita degli assoni (15). Il TH invece ha avuto il ruolo di marker funzionale delle terminazioni nervose adrenergiche coinvolte nella sintesi della noradrenalina (16).

Come accennato precedentemente, il BAT risulta essere uno dei tessuti più densamente vascolarizzato del nostro corpo (17) (Fig.2F). Oltre a permettere il rapido smaltimento del calore da esso prodotto e facilitare l'apporto di ossigeno per l'ossidazione degli acidi grassi e di nutrienti per il mantenimento delle funzioni degli adipociti, la vascolarizzazione dell'organo adiposo, svolge altre numerose funzioni. Queste includono: la rimozione dei prodotti metabolici dal tessuto adiposo; il trasporto di fattori di crescita, citochine e ormoni per modulare le funzioni degli adipociti e la crescita; il trasporto di fattori di crescita, adipochine, citochine, prodotte dagli adipociti che regolano a livello globale le funzioni fisiologiche tramite il meccanismo endocrino e allo stesso tempo vari fattori e citochine, con azione paracrina e autocrina; la fornitura di cellule staminali e precursori degli adipociti residenti nelle parete dei vasi che possono eventualmente differenziarsi in adipociti maturi; il contributo alla formazione delle isole vascolo adipose durante lo sviluppo embrionale dell'organo adiposo; la fornitura di altri tipi cellulari, come le cellule infiammatorie che interessano secondariamente la funzione degli adipociti (18).

1.5 La plasticità dell'organo adiposo.

In accordo con gli studi morfologici, la parete vascolare dei capillari del tessuto adiposo è la nicchia adipogenica dove avviene la proliferazione ed il differenziamento dalle cellule staminali (presenti nella componente murale del vaso) a preadipociti. Questi avvenimenti sono altamente coordinati a partire dall'embriogenesi fino all'età adulta, confermando che gli adipociti bianchi, bruni e brite possono condividere le stesse cellule progenitrici, le cellule mesenchimali associate ai vasi sanguigni (19).

Recentemente in letteratura sono apparsi nuovi termini per descrivere alcuni adipociti di certi depositi WAT che hanno una notevole capacità di alterare il loro fenotipo da adipociti tipicamente bianchi fino a farlo assomigliare a quello degli adipociti bruni. Questo fenomeno è stato definito "browning" ed è facilmente indotto dall'esposizione al freddo e dalla stimolazione β_3 -adrenergica. Il Browning, ampiamente studiato sui piccoli mammiferi, risulta avere un impatto positivo sul profilo metabolico, provocando un aumento della spesa energetica (20). In genere, il Browning comporta la comparsa di grappoli di adipociti multiloculari dispersi tra gli adipociti bianchi. Questo fenomeno varia tra i depositi WAT ed è fortemente influenzato da fattori genetici (21) (22) (23). Inizialmente gli adipociti multiloculari UCP1 positivi sono stati chiamati "convertible" o "pauciloculare", perché il fenomeno del Browning può essere indotto da adipociti uniloculari UCP1 negativi senza che avvenga la proliferazione cellulare. Successivamente sono stati introdotti altri due termini per descrivere questi tipi cellulari. Con il termine "brite" (brown in white) si va a descrivere gli adipociti con evidenze morfologiche con un fenotipo "brown like" immersi tra adipociti con un fenotipo "white-like" (24). Il termine "beige" viene usato per descrivere le cellule che hanno un'attività termogenica attiva e che compaiono nel WAT dopo esposizione a freddo, ma questo termine viene maggiormente usato anche per descrivere una differente origine di tali adipociti rispetto agli adipociti bruni presenti nel BAT (25). Il termine "beige" dovrebbe essere usato per descrivere a livello qualitativo determinati depositi di grasso, come ad esempio il deposito sottocutaneo inguinale WAT (scWAT), il quale mostra caratteristiche morfologiche intermedie tra il deposito epididimale, definito classicamente

bianco (eWAT), ed il deposito di grasso interscapolare definito classicamente bruno (iBAT).

Gli adipociti bruni e quelli brite possono derivare da fonti differenti ma hanno una fisiologia simile.

Da studi di lineage tracing è stato stabilito che le cellule che esprimono il fattore miogenico 5 (Myf5) possono dar luogo sia agli adipociti bruni dell'iBAT e del deposito perirenale, che ai miociti scheletrici. D'altra parte, gli adipociti brite che compaiono nel WAT in risposta al trattamento β_3 -adrenergico o allo stress da freddo risultano essere Myf5 negativi, come gli adipociti classicamente bianchi, indicando una diversa origine rispetto agli adipociti bruni classici del iBAT (26). Tuttavia alcuni studi indicano che i depositi di grasso bianco contengono una miscela di adipociti Myf5 sia positivi che negativi, complicando ulteriormente la comprensione di quale sia il ruolo del Myf5 durante l'adipogenesi. Diversi studi hanno dimostrato che la stragrande maggioranza degli adipociti brite inducibili derivano dalla trans-differenziazione degli adipociti bianchi (27) (28) (29). Questa teoria è stata supportata da uno studio eseguito da Rosenwald et al. (29) che dimostra una trans-differenziazione bidirezionale dalla morfologia bianca su adattamento al caldo (e viceversa) verso un fenotipo bruno a seguito di esposizione al freddo delle stesse cellule. Un'ulteriore prova a supporto di questa teoria è la descrizione di adipociti multiloculare UCP1 negativi e adipociti pauciloculari UCP1 positivi nelle aree di confine tra WAT e BAT, nell'interscapolare (iBAT) e nell'inguinale (ingWAT) come una fase intermedia in trans-differenziazione (30) (2). Questi esperimenti forniscono prove per la coesistenza di due processi; la trans-differenziazione diretta e la generazione ex novo degli adipociti bruni quando la situazione fisiologica lo richiede. Inoltre, dallo studio condotto da Lee et al. (31) è emerso che una popolazione di preadipociti esprimono un fattore di crescita di derivazione piastrinica (PDGFR α) e sono in grado di differenziare in adipociti Brite su esposizione al freddo, dando più sostegno alla coesistenza della generazione ex novo ed alla trans-differenziazione degli adipociti Brite. Sulla base dei dati trasmessi, la visione d'insieme è piuttosto complessa. Perciò è possibile ipotizzare che gli adipociti brite provengano da diverse fonti e rappresentino una fase intermedia sia a livello morfologico che fisiologico tra un adipocita bianco e un adipocita marrone (32). Le prove morfologiche e genetiche non sembrano

suggerire un meccanismo comune, ma piuttosto meccanismi diversi per il reclutamento degli adipociti brite, con una situazione piuttosto eterogenea a seconda del deposito analizzato. La fisiologia potrebbe essere impiegata per trovare un punto d'incontro per definire e caratterizzare queste cellule. Dai dati emersi, gli adipociti brite, che si trovano in scWAT aventi una morfologia bianca, come riscontrato negli animali mantenuti a temperatura ambiente ed alimentati con una dieta chow, devono essere considerati adipociti bianchi perché sono più propensi a comportarsi come tale. Sotto stimoli specifici, sono inclini a spostare il loro fenotipo verso un fenotipo tendente al bruno. Se gli stimoli poi persistono, essi acquistano una morfologia ed una espressione proteica completamente indistinguibile dagli adipociti bruni. Nelle condizioni appena descritte, gli adipociti brite producono anche calore dovuto ad un aumento dei livelli di UCP1 e devono essere considerati adipociti bruni anche se differiscono per origine di sviluppo e non si differenziano da precursori Myf5-positivi. Quando la situazione torna alla normalità e la produzione di calore non è più necessaria, l'adipocita brite acquista nuovamente la morfologia bianca. Il profilo di espressione genica di queste cellule durante la transizione fenotipica differisce da quella degli adipociti bruni che ritroviamo in altri depositi come iBAT sotto ai medesimi stimoli (33). Infine negli ultimi anni in letteratura è emerso un nuovo marker del tessuto adiposo bruno per l'identificazione dei depositi che dal punto di vista ontogenetico possono essere definiti classicamente bruni: zinc finger of the cerebellum-1 (Zic1). Questo gene potrebbe essere coinvolto nello sviluppo dello stesso tessuto adiposo bruno. Gli esperimenti condotti da Jong et al. (34) in vitro su adipociti bruni knock-out per lo ZIC1, hanno descritto un'espressione dell'Ucp1 ridotta, suggerendo un ruolo funzionale per Zic1 nella regolazione a valle dell'espressione dell'Ucp1 durante lo stimolo noradrenergico, ma senza comprendere fino in fondo il ruolo dello Zic1 nello sviluppo di questi adipociti. Questo gene è stato anche recentemente validato in vivo per opera di de Jong, et al. e Walden T. B., et al. (3, 35), mostrando che la sua espressione è selettiva per il tessuto adiposo bruno rispetto ad altri depositi adiposi.

1.6 Anatomia macroscopica dell'organo adiposo nel modello animale

Nonostante la loro diversa conformazione anatomica ed i ruoli funzionali, gli adipociti bianchi e bruni si trovano insieme in tutti i depositi di grasso che costituiscono l'organo adiposo. Nei piccoli roditori, un'attenta dissezione rivela che i depositi sottocutanei e viscerali hanno una diversa anatomia a seconda dell'età, del sesso, dei ceppi e delle condizioni sperimentali esaminate.

I roditori hanno due principali depositi sottocutanei: uno anteriore ed uno posteriore localizzati alla base degli arti. Il deposito anteriore, il più complesso dal punto di vista anatomico, ha una forma piramidale il cui vertice si trova nell'area interscapolare.

Da qui partono simmetriche proiezioni laterali, situate principalmente sotto le scapole e tra il muscolo scheletrico dorsale paravertebrale, le quali si estendono fino alle regioni cervicali ed ascellari, in stretto collegamento con i grossi vasi alla base del collo.

Il deposito interscapolare rappresenta la porzione centrale e più cospicua, considerato perciò il classico deposito bruno (Fig.1).

Il deposito posteriore sottocutaneo si trova alla base delle zampe posteriori. È più compatto e consistente in una singola banda che si estende dalla regione lombare (porzione dorso-lombare) a quella inguino-crurale (parte inguinale) sino alle regioni del pube e dei glutei (porzione glutei).

A livello del pube avviene la fusione con il deposito contro-laterale, mentre negli arti si trovano i depositi sotto-fasciale. Nelle zampe posteriori, sono localizzati due depositi principali situati nella coscia a livello della fossa poplitea. Nelle parti dorso-lombare e inguinale sono presenti uno o due linfonodi.

I depositi viscerali sono contenuti a livello mediastinico ed addominale, dove sono racchiusi prevalentemente in aree delimitate da membrane sierose.

Il principale deposito mediastinico è situato fra i tratti prossimali dei fasci nervosi e vascolari intercostali, il cuore e l'aorta. I depositi addominali possono essere definiti retro-peritoneali ed intraperitoneali.

Il deposito retro-peritoneale, con tipica forma conica allungata e generalmente costituito da tessuto adiposo bianco, si trova tra la colonna vertebrale e la parete addominale posteriore in posizione paravertebrale ed è separato dal deposito peri-renale da volte peritoneali. Il deposito omentale

nei roditori assume una dimensione ridotta, ma come nell'uomo esso è connesso alla grande curvatura dello stomaco ed il deposito mesenterico è definito dai due foglietti peritoneali che trattengono l'intestino sulla parete addominale posteriore.

Nei maschi è presente il deposito epididimale, ben circoscritto, avvolto e legato all'epididimo attraverso il peritoneo.

Nelle femmine, il peri-renale, peri-ovarico, para-metricale e il peri-vescicale sono contenuti nello stesso deposito (addomino-pelvico).

Tutti i depositi sopra descritti sono definiti a composizione mista, poiché costituiti sia da tessuto adiposo bianco che da tessuto adiposo bruno. La presenza di uno piuttosto che dell'altro tessuto è responsabile del colore del deposito: quando prevale il WAT è preponderante l'aspetto bianco, mentre la prevalenza del BAT conferisce una colorazione più scura.

Nell'organo adiposo dei roditori la maggior parte del deposito sottocutaneo anteriore è composto soprattutto da BAT, mentre il sottocutaneo posteriore è principalmente bianco.

Dei depositi viscerali il mediastino è principalmente bruno, in particolar modo nel topo dove invece l'omentale e il mesenterico sono principalmente bianchi.

Il deposito addomino-pelvico è ugualmente composto da BAT e WAT, mentre l'epididimale è quasi completamente bianco (1).

La prevalenza di un tessuto rispetto ad un altro all'interno dello stesso deposito dipende largamente dal background genetico, dall'età, dal sesso e dalle condizioni ambientali (temperatura, tipo di dieta, attività fisica). Da ciò scaturisce che con l'avanzare dell'età il deposito sottocutaneo anteriore tipicamente BAT va incontro ad una progressiva sostituzione con il WAT.

A livello sistematico gli adipociti bruni tendono a diminuire con l'età in tutti i depositi (1).

1.7 Anatomia macroscopica dell'organo adiposo nell'uomo

I concetti di base relativi all'organo adiposo dei piccoli mammiferi sopradescritti sono applicabili in linea di massima anche all'organo adiposo degli esseri umani. Ritroviamo che i tessuti bianchi, bruni e di composizione mista presenti nell'organo adiposo umano hanno le stesse caratteristiche morfologiche e fisiologiche descritte nell'organo adiposo murino. Sebbene l'anatomia dell'organo adiposo umano non sia mai stata descritta nel dettaglio, è noto che essa è composta di depositi sottocutanei e viscerali. Il tessuto adiposo sottocutaneo è in continuità con il tessuto adiposo dermico, e non è limitato a delle aree ben definite, bensì risulta presente come strato continuo sotto la pelle. Il tessuto adiposo mammario, sottocutaneo e gluteo-femorale è più sviluppato nelle femmine che nei maschi (1).

A livello degli arti, il tessuto adiposo intramuscolare è stato studiato tramite le moderne tecniche di imaging radiologico ed è stato calcolato che il 10% dell'organo adiposo umano è localizzato proprio in queste sedi.

I depositi viscerali dell'uomo corrispondono a quelli presenti nei roditori, ma con qualche differenza evidente. Il deposito omentale è particolarmente ben sviluppato negli esseri umani, mentre il tessuto adiposo epididimale non è presente affatto.

Ulteriori due depositi sono presenti e ben descritti negli esseri umani: la bolla di Bichat e il deposito retro-orbitale.

Inoltre, molti organi contengono quantità variabili di adipociti a livello della parotide, della paratiroide, del midollo osseo, del pancreas, del timo, dei linfonodi e altri luoghi minori.

Il peso dell'organo adiposo umano negli adulti normopeso ammonta a circa 8-18% del peso corporeo nei maschi ed il 14-28% nelle donne.

Dalla microscopia ottica ed elettronica dei tessuti adiposi umani è emerso che questi tessuti sono identici a quelli dei tessuti adiposi murini, ma la dimensione degli adipociti è circa 30-40% più grande di quella dei topi e ratti.

Tutte le molecole prodotte dagli adipociti murini sono prodotte anche dagli adipociti umani, tra cui la leptina, l'adiponectina, il TNF- α , il PAI-1, etc.

Nell'uomo massicciamente obeso, l'organo adiposo può aumentare di quattro volte tanto e raggiungere il 60-70% del peso corporeo.

In situazioni di bilancio energetico negativo, l'organo adiposo riduce il suo volume e le dimensioni dei suoi adipociti. Gli adipociti completamente delipidizzati possono essere trovati nel tessuto adiposo di soggetti con un bilancio energetico negativo. Il destino di tali adipociti è ancora dibattuto; alcuni autori suggeriscono che essi subiscano apoptosi.

Non tutti i depositi reagiscono allo stesso modo durante le situazioni di bilancio energetico negativo. Il tessuto adiposo sottocutaneo della regione gluteo-femorale di donne in pre-menopausa è più resistente al dimagrimento rispetto al tessuto adiposo addominale sottocutaneo, ma dopo la menopausa il processo dimagrante dei due tessuti è simile. Questo sembra essere dovuto alla combinazione di una maggiore attività della lipoproteina lipasi ed una ridotta attività lipolitica nel tessuto adiposo gluteo-femorale. Si presume che quest'ultima derivi da una relativa preponderanza dell'attività anti-lipolitica dei recettori alfa-2-adrenergici nei confronti dei recettori beta-3-adrenergici, dovuta all'assenza di estrogeni nel periodo della menopausa. Tale condizione causa variazioni del profilo lipidico e favorisce l'accumulo lipidico a livello addominale (36)(37).

La recente dimostrazione della presenza di un considerevole quantitativo di tessuto adiposo bruno metabolicamente attivo nei neonati, che aiuta a mantenere costante la temperatura corporea e la sua regressione con il crescere dell'età fino alla quasi completa scomparsa nell'anziano, ha attirato l'attenzione della comunità scientifica per la possibilità di indagare in merito a strategie atte ad una maggiore persistenza del tessuto e nella conseguente possibilità di stimolare lo stesso per contrastare l'obesità e la sindrome metabolica.

La capacità di stimolare il reclutamento di adipociti bruni nell'adulto è dimostrata in pazienti affetti da tumori secernenti catecolamine come il feocromocitoma o il paraganglioma o tramite stimolazione al freddo a 19°C per 12h.

Tramite l'utilizzo della PET e della tomografia computerizzata (TC) con l'ausilio del glucosio 18F-fluorodeossiglucosio (18F-FDG), è stato possibile evidenziare quali sono le sedi del tessuto adiposo bruno nell'uomo (Fig.3A). E' emerso un notevole assorbimento del 18F-FDG ai livelli sottoscapolare, sovraclaveare, laterocervicale, al di sotto del plesso brachiale proseguendo attraverso la gabbia toracica lungo i grossi vasi fino ad arrivare a livello

epicardico e nella regione paraspinale addominale. Tutte queste aree risultano essere UCP1 positive (38) (39) (40) (41) (42) (Fig.3B).

Le analisi istologiche ed immunoistochimiche sulle biopsie di grasso peritiroideo corrispondenti all'area BAT emersa dalle PET-CT, hanno dimostrato che esse sono formate da adipociti bruni e bianchi ed i comparti vascolare e nervoso risultano essere simili all'organo adiposo murino. Le aree contenenti prevalentemente adipociti bruni hanno una maggiore densità di capillari e fibre noradrenergiche rispetto a quelle contenenti prevalentemente adipociti bianchi e la proporzione di adipociti UCP1-positivi tra tutti gli adipociti di questi individui varia dal 3% al 31% (media 13,3%) (43).

1.8 Stato dell'arte sullo sviluppo prenatale dell'organo adiposo nell'uomo

Studi sull'anatomia dell'organo adiposo umano hanno evidenziato che l'organo adiposo umano vede la sua formazione a livello intrauterino dalla quattordicesima alla ventiquattresima settimana di gestazione, nelle zone dove lo si ritrova accumulato dopo la nascita, suggerendo che il secondo trimestre di gestazione è il periodo chiave dell'adipogenesi. Gli studi morfologici di Poissonnet et al. e di Wassermann mostrano che le prime sedi di sviluppo dell'organo adiposo sono a livello del collo e della testa (bolla di Bichat e il deposito retro-orbitale) e rapidamente progrediscono nel tronco e negli arti (44) (45). Le prime strutture anatomiche ad essere identificate prima della comparsa dei tipici adipociti sono i lobuli di grasso. Inizialmente i lobuli non mostrano alcuna evidenza di accumulo di lipidi e sono chiamati lobuli mesenchimali. Questi poi daranno luogo a lobuli di grasso primitivi che contengono materiale lipidico. Dalle loro osservazioni emerge che l'adipogenesi appare preferenzialmente nei lobuli dove la proliferazione capillare è più attiva, confermando questo aspetto molto importante per lo sviluppo dei lobuli di grasso primitivi. Nell'ultima fase, i lobuli di grasso primitivi si trasformano in lobuli di grasso definitivi, che già assomigliano a quelli presenti nel neonato, e successivamente, negli adulti. I primi lobuli di grasso appaiono nella testa precisamente nel cuscinetto adiposo buccale del viso, successivamente nella guancia e nel mento a livello sottocutaneo. In queste regioni, i lobuli di grasso definitivi sono facilmente riconoscibili dalla

17a settimana gestazionale. A 17 settimane, i lobuli iniziano a svilupparsi intorno al nervo ottico e ai bulbi oculari andando a formare i lobuli oculari che arriveranno a completo differenziamento tra le 19 e le 20 settimane. Nel collo l'adipogenesi inizia contemporaneamente a quella delle guance (14.5 settimane). Inizialmente i lobuli mesenchimali sono identificabili nel tessuto sottocutaneo, soprattutto in prossimità dell'arco anteriore e nei processi trasversali delle vertebre cervicali e successivamente intorno ai muscoli del collo. A livello toracico, il tessuto adiposo è il primo deposito riconoscibile nel sottocute della parete posteriore del torace a 15 settimane, ed è densamente distribuito attorno alle vertebre toraciche. In questo momento, il grasso appare anche nella regione mammaria. Più tardi, intorno alla 16a settimana, il tessuto adiposo si diffonde nel sottocute della parete toracica anteriore. Il primo segno di adipogenesi addominale si nota nella parete addominale tra la 14a e la 15a settimana, mentre il grasso perirenale sviluppa dalla 15a settimana nella fascia pararenale e lungo il tratto dell'aorta addominale, ed è completamente differenziato dopo la 21a settimana. Negli arti superiori, il grasso compare in un primo momento intorno l'articolazione della spalla, e si diffonde rapidamente tra i muscoli e gli strati sottocutanei di questa regione. Le regioni distali degli arti superiori mostrano la presenza di tessuto adiposo intorno alla 16a settimana. Nella regione di gluteo femorale e nel piede, il tessuto adiposo si inizia a formare dalla 16a settimana. Nel piede, come nella mano, questo tessuto è prima identificabile nel sottocute della suola. Va sottolineato che alla fine della 23a settimana, uno strato ispessito di grasso sottocutaneo copre le estremità degli arti, come si vede più avanti nel neonato. La distribuzione anatomica del BAT è stata definita da Aherne e Hull (45) nei neonati e nei feti umani che vanno dalle 29 alle 40 settimane. Secondo questi autori, il BAT si trova soprattutto tra le scapole, intorno muscoli del collo e dei vasi sanguigni, nelle ascelle, e intorno ai reni e nelle ghiandole surrenali (Fig.4). Mancano però studi dettagliati sullo sviluppo dei depositi adiposi in specifiche sedi anatomiche sottocutanee e viscerali. In particolare quelle sedi, che tramite esami di PET, si sono dimostrate con un fenotipo bruno nei soggetti umani adulti.

1.9 Perdita del fenotipo bruno durante la crescita e l'insorgenza dell'obesità: il "whitening".

L'invecchiamento è associato ad una maggiore incidenza di dislipidemia, intolleranza al glucosio, diabete di tipo 2, obesità ed altre comorbidità. La massa grassa corporea è il risultato del rapporto tra introito e consumo calorico, e dal momento che il primo non varia o addirittura diminuisce con l'età, è molto verosimile che il ridotto consumo calorico sia il fattore determinante dell'obesità nell'anziano. In effetti l'aging è associato ad una significativa diminuzione di tutte le principali componenti del consumo calorico totale, vale a dire metabolismo basale a riposo, effetto termico alimentare, termogenesi non da brivido (prodotto dal BAT) ed attività fisica. E' stato osservato che quest'ultima contribuisce da sola addirittura alla metà della riduzione del consumo calorico totale che si riscontra nell'anziano. Numerose alterazioni ormonali inoltre contribuiscono all'incremento corporeo in età geriatrica; la ridotta riduzione dell'ormone della crescita (GH), la ridotta sensibilità all'ormone tiroideo, i ridotti livelli di testosterone e la resistenza alla leptina (tutte condizioni associate all'invecchiamento), determinano un incremento della massa grassa ed una riduzione della massa magra. Un dato ancora più rilevante e caratterizzante è che nell'invecchiamento si assiste ad un maggiore e progressivo incremento del grasso addominale. L'invecchiamento porta ad una perdita del BAT favorendo l'aumento del WAT. Si ipotizza che questo fenomeno sia dovuto ad una serie di fattori: perdita della capacità rigenerativa delle cellule staminali / progenitrici degli adipociti bruni; perdita generale della biogenesi e della funzione mitocondriale di queste cellule; alterazioni nel controllo neuronale da parte del sistema nervoso simpatico che può contribuire alla compromessa rigenerazione e termogenesi negli adipociti bruni invecchiati, cambiamenti di segnali endocrini legati all'età (47) (48) (49). In letteratura diversi studi mostrano che i tessuti classicamente bruni in soggetti obesi o diabetici di tipo 2, perdono le loro caratteristiche morfologiche di adipociti bruni, mantenendo l'espressione genica tipica del BAT. Questo dato si evince bene dal lavoro di Harold Sacks et al. (50), condotto su biopsie di grasso epicardico e paracardico di un gruppo di pazienti diabetici di tipo 2. I risultati di questo studio mostrano che i markers molecolari definiti classici degli adipociti bruni, UCP1, PGC1 α , PRDM16, PPAR γ , tramite un estratto

mitocondriale, sono ben espressi in questi pazienti diabetici anche se la morfologia è quella di un fenotipo bianco (whitening). Il whitening del BAT che si instaura con l'età o con l'obesità potrebbe essere rallentato o contrastato con terapie in grado di stimolare questo tessuto mimando l'effetto del freddo in quanto il BAT, responsabile della termogenesi, con la sua attività potrebbe contrastare l'obesità aumentando il dispendio energetico, mantenendo sotto controllo il peso corporeo negli adulti.

1.10 OBIETTIVO: Studiare lo sviluppo dell'organo adiposo nell'uomo. Valutare potenziali correlazioni morfo-funzionali con il modello murino.

Questo lavoro di tesi nasce con lo scopo di studiare lo sviluppo dell'organo adiposo dell'uomo in età fetale. L'intenzione è poi quella di indagare potenziali analogie morfo-funzionali già descritte in letteratura per il modello murino.

L'approccio utilizzato ha coinvolto prevalentemente tecniche morfologiche che sono particolarmente efficaci per la caratterizzazione fenotipica. Lo scopo ultimo è stato quello di osservare possibili differenze, correlazioni e similitudini di quattro depositi adiposi che si sono dimostrati particolarmente interessanti dal punto di vista morfologico e funzionale: cervicale, interscapolare, mediastinico, perirenale. Questi depositi sono stati studiati durante le fasi di sviluppo intrauterina e poi confrontati con gli stessi depositi di grasso dei soggetti umani adulti e per estensione correlati da un punto di vista morfo-funzionale anche con il modello murino.

Lo studio è stato diviso in due parti.

La prima parte si è incentrata sull'osservazione morfologica dei quattro depositi di tessuto adiposo per mezzo della microscopia ottica. Questo è servito ad avere un dettaglio istologico del deposito e a valutare eventuali differenze tra le diverse fasi di sviluppo dell'organo adiposo.

Con l'ausilio della microscopia elettronica abbiamo poi cercato di determinare l'ultrastruttura delle cellule che compongono il tessuto per comprendere come avvenga l'adipogenesi dell'organo adiposo nell'uomo e quali cellule prendano parte a questo fenomeno. La seconda parte del lavoro

si è concentrata nella ricerca di possibili markers che caratterizzano i due tessuti che compongono l'organo per valutare eventuali differenze di fenotipo e funzione. L'analisi è stata svolta tramite la ricerca di proteine come: l'uncoupling protein 1 (UCP1) e la tyrosina hydroxylase (TH), zinc finger of the cerebellum-1 (Zic1), confermati da numerosi studi come markers per definire se un tessuto adiposo ha caratteristiche brune.

Infine, i dati ottenuti dalle nostre osservazioni morfologiche sono stati confrontati con i dati presenti in letteratura sull'origine dei vari depositi che compongono l'organo adiposo nel modello murino.

2 Materiali e Metodi

2.1 Soggetti inclusi nello studio e depositi adiposi analizzati

I depositi che abbiamo preso in considerazione per questo studio morfologico consistono in due sottocutanei (cervicale e iBAT) e due viscerali (mediastinico e peri-renale) prelevati da feti umani provenienti dall'Università di Medicina e Farmacia di Craiova (Romania). Molti altri depositi sono stati prelevati in sede di esame autoptico, ma una successiva analisi macroscopica delle parti prelevate ha evidenziato che quelli sopra elencati erano i campioni più consistenti come prelievo (e i più frequenti come presenza), e quindi ci hanno permesso una descrizione dettagliata sulla loro morfologia durante tutte le fasi di sviluppo prese in esame. I tessuti prelevati sono poi stati inviati presso i laboratori di Anatomia del Dipartimento di Medicina Sperimentale e Clinica dell'Università Politecnica delle Marche per le successive analisi morfologiche.

La microscopia ottica ha evidenziato alcune importanti analogie e molte differenze dei depositi presi in esame durante le diverse fasi di sviluppo del feto. Questo ci ha permesso di individuare in modo arbitrario (non in relazione ai time points descritti in modo classico negli studi di embriologia e di organogenesi) tre gruppi di soggetti con caratteristiche comparabili nello sviluppo dei pannicoli adiposi: gruppo early (precoci; compresi fra le 16-21 settimane), gruppo intermediate (intermedi; compresi fra le 22-26 settimane), gruppo late (pre-termine; compresi fra le 36-39 settimane).

I dati clinici dei feti sono riassunti nella Tabella 1:

FETI					
	N.soggetti	Sesso	Settimane di gestazione	Peso	Campioni
Early (precoci)	5	M	16-21	~300gr	Cervicale iBAT Mediastinico Peri-renale
Intermediate (intermedi)	5	4 M 1 F	22-26	~700gr	Cervicale iBAT Mediastinico Peri-renale
Late (pre-termine)	4	2 M 2 F	36-39	~920gr	Cervicale iBAT Mediastinico Peri-renale

Il consenso informato è stato ottenuto da parte del Ministry of Education, Research, Youth and Sport (Romania) No. 04/ 24.01.2011 che ha dato il permesso per ottenere e utilizzare i campioni dei pazienti per gli studi morfologici.

2.2 Istologia (microscopia ottica)

Dopo l'asportazione chirurgica, i vari campioni di tessuto sono stati fissati per immersione overnight a 4 ° C in paraformaldeide al 4% in tampone fosfato 0,1 M (pH 7,4). I campioni sono stati poi disidratati, inclusi in paraffina orientandoli in modo che il piano di sezione corrispondesse alla superficie più ampia del deposito.

Per ogni deposito sono state tagliate al microtomo a slitta sezioni seriate di 3µm di spessore a tre livelli di profondità: superficiale, intermedio e profondo, in modo da ottenere campioni rappresentativi dell'intero spessore ed estensione del campione.

Per le analisi istologiche sono state utilizzate una sezione per livello e colorate con ematossilina ed eosina.

Le sezioni di tessuto sono state osservate con un microscopio ottico Nikon Eclipse 80i usando un 4X, 10X, 20X come obiettivi, e le immagini digitali sono state ottenute con una fotocamera Nikon DXM 1200.

2.3 Immunoistochimica (UCP1-TH- CD56- ZIC1)

Le successive sezioni in paraffina a quelle usate per l'istologia sono state utilizzate per la localizzazione delle proteine UCP1, TH, CD56 e ZIC1. L'UCP1 è stato rilevato tramite l'utilizzo di un anticorpo Abcam cat # 10983; rabbit anti UCP1 made in goat, mentre il TH è stato visualizzato tramite l'utilizzo dell'anticorpo Millipore cat # AB153; sheep anti TH made in rabbit. Il CD56 è stato rilevato tramite l'utilizzo di un anticorpo della Novocastra cat # NCL-L-CD56-1B6; mouse anti CD56 made in horse, mentre lo ZIC1 è stato visualizzato tramite l'utilizzo di un anticorpo Sigma Prestige cat # HPA004898; rabbit anti ZIC1 made in goat. La reazione d'immunoistochimica viene svolta con un protocollo standard e quando risulta positiva si ottiene un precipitato marrone in corrispondenza della localizzazione della proteina di interesse. Per validare l'anticorpo utilizzato e la correttezza della sequenza, sono sempre stati inclusi controlli positivi. Nel dettaglio la reazione procede come di seguito descritto:

1. Le sezioni vengono sparaffinate e idratate in acqua;
2. Le sezioni usate per ricercare le proteine CD56 e ZIC1 sono state trattate con Antigen Retrieval con tampone citrato (0.1M) a pH 6 a 95° per venti minuti;
3. Lavare in PBS (Phosphate-Buffered Saline 0.015M) a pH 7.3 (2 lavaggi di 7 min);
4. Incubare con perossido di idrogeno al 3% in metanolo per 40 minuti a temperatura ambiente per inattivare le perossidasi endogene;
5. Lavare in PBS (Phosphate-Buffered Saline 0.015M) a pH 7.3 (2 lavaggi di 7 min);
6. Incubare con Normal Serum al 5% (si usa lo stesso siero dell'animale dove è stato sviluppato l'anticorpo secondario) per ridurre colorazioni aspecifiche, per 20 minuti.
7. A seguire due lavaggi in PBS di 7 minuti;
8. Incubare con l'anticorpo (poli-monoclonale) primario: anticorpo rabbit anti UCP1 made in goat (1:500; ab10983, Abcam, Cambridge UK), anti TH made in sheep (1:200; AB153 Millipore), anticorpo mouse anti CD56 made in horse (1:50; NCL-L-CD56-1B6 Novocastra), anticorpo rabbit anti ZIC1 made in goat (1:20; HPA004898 Sigma prestige), overnight a 4°C.

9. Lavare con PBS 2 volte per 7 minuti;
10. Incubare con l'anticorpo IgG secondario biotilinato sviluppato contro l'antigene del primo anticorpo diluito con PBS (per l'UCP1 e lo ZIC1 anti rabbit made in goat 1:200; per il TH anti sheep made in rabbit 1:200; per il CD56 anti mouse made in horse 1:200 Vector Labs, Burlingame, CA, USA);
11. Lavare con PBS 2 volte per 7 minuti;
12. La reazione immunoistochimica è stata eseguita utilizzando il kit Vector's Vectastain ABC (1%; Burlingame, CA) per 60 minuti
13. 2 lavaggi in PBS per 7 minuti;
14. Incubare Sigma Fast 3,3'-diaminobenzidine (Sigma, St. Louis, MO) per 3 minuti permetterà di visualizzare la perossidasi
15. Lavare con acqua distillata
16. Per visualizzare i nuclei, le sezioni vengono contrastate con ematossilina, a seguire montate in Eukitt (Fluka, Deisenhofen, Germania)

2.4 Microscopia elettronica a Trasmissione (TEM)

I frammenti di tessuto di circa 1 mm³ sono stati:

1. Immersi per la fissazione in 2% glutaraldeide e 2% formaldeide diluita in 0,1 M PBS (tampone fosfato), pH 7.4 per 4 ore;
2. Lavati con PBS,
3. Post-fissati in 1% OsO₄ per 60 minuti a 4 °C;
4. Deidratati in acetone e inclusi in una miscela di Epon e Araldite;
5. Mediante un MTX ultramicrotomo (RM, Tucson, AZ, USA) sono state ottenute sezioni ultrasottili colorate con citrato di piombo, ed esaminate con un microscopio a trasmissione Philips CM 10 (Philips, Eindhoven, The Netherlands).

3 Risultati

3.1 Analisi morfologica dei depositi sottocutanei e viscerali dei feti early (precoci). Istologia, immunoistochimica e TEM

Il primo aspetto anatomico da evidenziare nell'analisi dello sviluppo del pannicolo adiposo fetale, è la sua comparsa in sede sottocutanea nella parte superiore e dorsale del tronco. E' infatti in questa sede anatomica (in maniera molto costante in tutti i feti analizzati) che risultano molto chiare a livello macroscopico la comparsa multifocale di accumuli distinti di materiale lipidico (Fig.5A). Queste "isolette" di grasso sono prevalentemente localizzate a livello cervicale laterale e a livello interscapolare e sovrascapolare. Gli accumuli risultano essere evidenti già a 15-16 settimane di vita fetale, quando si presentano con la morfologia appena descritta. Diventeranno poi via via più consistenti come dimensioni ed andranno a confluenza per formare un unico pannetto adiposo sottocutaneo cervicale ed interscapolare. A livello viscerale i feti appartenenti al gruppo early non hanno mostrato accumuli di grasso in nessuna delle sedi prese in esame. La descrizione del tessuto adiposo in queste sedi anatomiche viene quindi rimandata al gruppo intermedio.

L'osservazione istologica dei reperti sottocutanei ha evidenziato delle caratteristiche molto simili in tutti i soggetti inclusi in questo gruppo sperimentale. Si nota che i depositi sono formati da isole vascolo-adipocitiche (anlages) nude costituite da ammassi di cellule mesenchimali indifferenziate, una combinazione di piccoli vasi sanguiferi e nervi (Fig.5B). In un buon numero di isole abbiamo però evidenziato anche i primi accumuli di materiale lipidico all'interno di preadipociti associati alle isole vascolo-adipocitiche immerse nella ancora povera (poco cellularizzata) matrice connettivale che forma i tessuti a questo stadio di sviluppo.

L'accumulo lipidico all'interno di questi preadipociti è un ovvio criterio per distinguere e valutare il grado di maturazione delle isole vascolo-adipocitiche e ci permette di discriminare i preadipociti dalle cellule indifferenziate presenti all'interno dell'isola (Fig.5C).

I preadipociti risultano essere sempre in stretto contatto con i piccoli vasi contenuti all'interno delle isole stesse. Con l'ausilio della TEM abbiamo

caratterizzato gli aspetti ultrastrutturali delle isole vascolo-adipocitiche nelle loro prime fasi di formazione. Le immagini sono altamente suggestive nel confermare l'origine degli adipociti dagli elementi vascolari. Sono visibili molte cellule in posizione pericitica (associate ai capillari sanguigni) e ricche di glicogeno, un tratto questo caratteristico per identificare i primi segni di differenziazione in senso adipocitico. All'interno dei "anlages" osserviamo che i preadipociti, che hanno intrapreso fasi di sviluppo successive, hanno un aspetto già chiaramente multiloculare e caratteristiche ultrastrutturali tipiche degli adipociti bruni oltre ad avere uno stretto rapporto con i vasi all'interno dell'isola (Fig.6 A).

I mitocondri risultano essere quelli tipici dell'adipocita bruno: numerosi, di notevoli dimensioni e contenenti molte creste trasversali e impacchettate tra loro (Fig 6 B). Inoltre i vasi contenuti all'interno delle isole mostrano un epitelio particolare di tipo epitelioide a suggerire la forte attività proliferativa delle cellule murali dei vasi (Fig 6 C). Tutti gli elementi descritti sono circondati da una distinta membrana basale. Alla periferia del lobulo, ritroviamo fibroblasti ben differenziati disposti in cerchi concentrici, immersi in una matrice densa di fibrille collagene che delimitano la zona di sviluppo adipocitico.

A seguito delle osservazioni ottenute tramite la TEM, abbiamo intrapreso ulteriori indagini immunoistochimiche al fine di meglio caratterizzare dal punto di vista fenotipico la componente cellulare che forma le isole vascolo-adipocitiche nei vari gradi di sviluppo. Con l'ausilio di tale tecnica ci siamo prefissati di caratterizzare questi tessuti dal punto di vista funzionale ricercando l'UCP1, utilizzato come marker univoco del fenotipo bruno.

Dalla nostra analisi è emerso che i preadipociti contenuti nei quattro tessuti presi in considerazione risultano essere positivi a questo marker già nelle prime fasi di sviluppo (Fig.7A e B).

Unico deposito che si discosta leggermente dagli altri per morfologia è l'iBAT, composto principalmente da preadipociti pauciloculari UCP1 positivi. (Fig.7 C) Infine, siamo andati ad indagare la componente dei nervi all'interno degli anlages presenti nelle varie sedi anatomiche prese in esame. Per questa indagine abbiamo utilizzato due markers: il CD56 come marker costitutivo delle fibre nervose ed il TH come marker funzionale delle fibre adrenergiche. Da quest'analisi è emersa un'assenza di positività all'interno delle isole, a

livello parenchimale, per entrambi i markers (non mostrato). Abbiamo tuttavia riscontrato la presenza di grossi fasci di fibre nervose in posizione inter-lobulare prevalentemente associate ai grossi vasi sanguiferi i quali sono risultati positivi sia per il CD56 che per il TH (Fig.7D).

3.2 Analisi istologica e immunoistochimica dei depositi sottocutanei e viscerali nei feti intermedi

L'analisi dei tessuti del gruppo dei feti intermedie (compresi tra 22-26 settimane) ha evidenziato aspetti istologici paragonabile alla situazione mostrata per i feti del gruppo early, almeno per quanto riguarda i depositi sottocutanei, ma con alcune differenze sostanziali nell'organizzazione generale e nell'innervazione. Gli accumuli lipidici sono sempre in conformazione multifocale, ma aumentano in maniera considerevole rispetto alla situazione vista all'esame istologico dei soggetti early, arrivando in alcuni casi a confluenza per iniziare a formare il pannicolo adiposo sottocutaneo anteriore dorsale che sarà poi evidente nei feti pretermine ed ancora di più nei neonati. Nel cervicale e nell'iBAT si iniziano ad evidenziare alcune differenze tra gli strati più profondi con caratteristiche più brune rispetto alle isole più superficiali, con un fenotipo pauciloculare ed una morfologia intermedia tra un classico tessuto bruno ed uno bianco (Fig 8A). Questo dato si evince molto bene nel deposito cervicale dove la distinzione nel fenotipo dei diversi strati è più netta mentre nell'iBAT l'impressione è che le cellule risultino avere una morfologia più diffusamente pauciloculare a tutti i livelli anatomici. Inoltre, alcune cellule pauciloculari sono risultate positive all'UCP1 mentre una buona parte sono risultate negative (Fig. 8B). L'indagine sul comparto nervoso dei depositi presenti in questa fase di sviluppo mostra aspetti molto interessanti evidenziando un passaggio forse cruciale per il mantenimento del fenotipo così come descritto nelle sue prime fasi di comparsa. Iniziamo a riportare la presenza di immagini chiare di fibre intralobulari/parenchimali (fibre all'interno delle isole), le quali risultano positive sia con il marker costitutivo (CD56) che con quello funzionale (TH), oltre a ritrovare come nel gruppo precedente abbondanti fibre interlobulari/perivascolari, positive ad entrambi i marker (Fig.8 C e E). Da evidenziare che in alcuni casi esaminati, abbiamo trovato fibre parenchimali

positive esclusivamente per il marker costitutivo ma non per quello funzionale proprio a dimostrare le fasi iniziali di costituzione del comparto nervoso del tessuto adiposo tuttavia probabilmente non ancora con un ruolo fisiologico determinato.

Il gruppo dei feti intermedi è il gruppo nel quale abbiamo evidenziato i primi segnali di accumulo lipidico a livello viscerale.

Come già accennato nel capitolo dei materiali e metodi, i campioni inclusi in questo studio sono stati quelli risultati più consistenti come prelievo e i più frequenti come presenza e che ci hanno permesso una descrizione dettagliata sulla loro morfologia durante tutte le fasi di sviluppo prese in esame. Per i due depositi viscerali sono stati scelti i campioni provenienti dal deposito mediastinico e perirenale. A livello mediastinico le isole sono ancora in una fase precoce/rudimentale ed appaiono come abbozzi simili a quanto visto nel sottocutaneo del gruppo early e con esigui accumuli lipidici (prevalenza di isole nude). Le poche isole nelle quali inizia ed essere evidente la presenza di cellule che hanno intrapreso un percorso differenziativo in senso adipocitico, risultano sempre essere nettamente positive per l'UCP1 (Fig. 9 A). Questo discorso è ancora più evidente e chiaro nel deposito peri-renale dove troviamo una situazione con molte isole scarsamente differenziate accanto a poche isole maggiormente differenziate in senso adipocitico e quindi ricche di cellule multiloculari UCP1 positive (Fig 9 B). L'innervazione delle isole viscerali risulta essere ancora scarsa ma presente con fibre prevalentemente in posizione perivascolare interlobare e più chiaramente positive al marker costitutivo (CD56) (Fig.9 C e D) mentre scarsamente positive per il marker funzionale (TH) (Fig. E e F).

3.3 Analisi morfologica dei depositi sottocutanei e viscerali nei feti late (pre-termine). Istologia e immunohistochimica.

A questo livello di sviluppo i depositi adiposi sottocutanei sono ormai completamente formati. Notiamo che le varie isole adipose si sono fuse fra loro formando un unico pannicolo adiposo sottocutaneo. In particolare a livello cervicale, possono essere distinti in modo chiaro tre strati, situazione riscontrabile poi anche nel neonato e in una buona percentuale di soggetti adulti (Fig.10 A).

- Uno strato più superficiale formato prevalentemente da adipociti bianchi costituiti da un unico vacuolo lipidico che occupa quasi tutta la cellula e rivestito da un sottile strato di rima citoplasmatica povera di mitocondri
- Uno strato intermedio misto costituito da adipociti bianchi, pauciloculari (scarsamente UCP1 positivi) e bruni (più chiaramente UCP1 positivi)
- Un terzo strato profondo, associato in modo chiaro ai grossi vasi della regione del collo che si portano ad irrorare le strutture del cranio e che mostra un fenotipo multiloculare chiaramente UCP1 positivo (Fig.11 A).

L'iBAT ha ormai anch'esso assunto la sua costituzione definitiva (maggiormente descritta e caratterizzata in fase neonatale) formando un pannicolo adiposo disseccabile in posizione appunto interscapolare e sovrascapolare (ascellare). Il deposito a questo livello di sviluppo ha assunto un fenotipo intermedio con una notevole variabilità da soggetto a soggetto. Abbiamo però riscontrato una tendenza ad assumere un fenotipo intermedio con la presenza predominante di cellule pauciloculari con vari gradi di positività per'UCP1 (Fig.11 B). Per quanto riguarda l'innervazione di questi due depositi sottocutanei iniziamo a riportare immagini chiare di fibre nervose presenti in posizione parenchimale e quindi all'interno delle isole a stretto contatto con gli adipociti ormai differenziati. Le fibre sono risultate immunoreattive sia per il marker costitutivo (Fig. 12) che funzionale (non mostrato).

Il dato più eclatante e di maggiore interesse nell'analisi dei tessuti adiposi dei feti appartenenti al gruppo late, ha riguardato l'analisi dei depositi viscerali.

Il grado di innervazione è in linea con quanto notato per tessuti sottocutanei

del gruppo late, evidenziando che il comparto nervoso è quasi completamente sviluppato. Nel dettaglio, abbiamo riscontrato un maggior numero di fibre nervose marcate sia con il CD56 (Fig. 13) che con il TH (non mostrato), rispetto ai depositi sottocutanei appartenenti agli stessi soggetti.

3.4 Focus sull'analisi immunohistologica per lo ZIC1.

Essendo un marker di recente scoperta, non sono disponibili molti anticorpi commerciali. Una volta individuato un buon anticorpo, abbiamo validato lo strumento su controlli positivi come la corteccia cerebrale (Fig. 13A) e sulla ghiandola surrenale (Fig. 13B). In tutti i depositi descritti (sottocutanei e viscerali) ed in tutti i time-points di sviluppo, siamo poi andati ad indagare la presenza dello Zic1, che viene utilizzato nel modello animale per l'identificazione dei depositi che dal punto di vista ontogenetico possono essere definiti classicamente bruni. Da questa analisi è emerso che gli adipociti bruni contenuti nel deposito peri-renale del gruppo late sono marcatamente positivi (Fig. 14 C e D). Abbiamo riscontrato una leggera positività anche nei depositi iBAT e nei cervicali dei late ma in maniera molto meno convincente (Fig. 14 E e F). Tutti gli altri depositi analizzati a vari gradi di sviluppo sono risultati negativi (non mostrato).

4 Conclusione

La descrizione e la caratterizzazione del pattern di comparsa del tessuto adiposo durante lo sviluppo fetale nell'uomo è un argomento di particolare interesse per varie discipline medico-biologiche. Il chiaro coinvolgimento dell'Organo Adiposo nell'insorgenza di varie patologie metaboliche nell'organismo adulto, richiede una migliore conoscenza del suo sviluppo sia da un punto di vista citologico ed istologico (citotipi che compongono i singoli depositi), sia da un punto di vista anatomico (sedi di comparsa dei vari depositi) sia da un punto di vista funzionale.

Un aggiornamento delle descrizioni presenti in letteratura (44) (45) sembra essere una necessità attuale alla luce della recente evidenza sulla presenza del BAT anche nei soggetti umani adulti (51). L'attività di questo tessuto sembra essere importante nel modulare la spesa energetica totale e quindi nel regolare l'equilibrio della bilancia energetica (36). Inoltre la presenza e l'attività di questo tessuto sembrano essere direttamente coinvolte nel controllo della sensibilità insulinica e quindi dei livelli di glicemia, i quali si correlano in modo chiaro ad un profilo metabolico sano, e prevalente in soggetti giovani e magri rispetto ai soggetti anziani (52). La graduale involuzione morfo-funzionale del tessuto durante l'invecchiamento potrebbe infatti contribuire all'aggravarsi di alcune problematiche di dislipidemie caratteristiche di alcune sottopopolazioni di soggetti anziani (47).

Diventa quindi importante descrivere e caratterizzare il pattern di comparsa dei tessuti adiposi bianchi e bruni nei vari comparti sottocutanei e viscerali dell'uomo per poter meglio valutare potenziali similitudini con il modello murino. Eventuali processi di trasformazione del fenotipo di specifici depositi in associazione a problematiche metaboliche ed endocrinologiche dei soggetti adulti umani potrebbero essere, come per il modello murino, una base eziopatologica della comparsa di obesità e diabete.

Il nostro studio si è avvalso di precedenti descrizioni morfologiche ed anatomiche relative allo sviluppo del tessuto adiposo fetale andando ad integrare questi dati con una più precisa ed aggiornata descrizione e caratterizzazione delle tipologie cellulari presenti nei singoli depositi, così come del loro comparto vascolo nervoso, durante vari periodi di sviluppo fetale. In particolare abbiamo incluso nello studio circa 15 feti che sono stati

divisi in base al grado di sviluppo in 3 gruppi: il gruppo early dei feti precoci (16-21 settimane di vita intrauterina), il gruppo intermedio (22-26 settimane) ed il gruppo late che include i feti a termine. In questi feti abbiamo analizzato lo sviluppo del tessuto adiposo in sedi anatomiche sottocutanee (cervicale ed iBAT) ed in sede viscerale (mediastinico e perirenale). I dati morfologici hanno confermato quanto già presente in letteratura e cioè che le prime evidenze di comparsa del grasso sono chiaramente in sede sottocutanea ed in particolare nel comparto toracico superiore in posizione dorsale e latero-cervicale. Siamo quindi andati a caratterizzare questi primi accumuli di grasso in sede sottocutanea ed in particolare nelle sedi cervicale ed interscapolare. I primi segni di comparsa sono stati evidenziati attorno alla 16a-17a settimana di vita fetale. In queste depositi, la comparsa del grasso, ha un pattern multifocale con foci più evidenti in sede cervicale e con una minore densità nella sede interscapolare (a questo livello di sviluppo precoce). L'indagine istologica ha evidenziato la presenza di isole vasculo-adipocitiche a vari gradi di sviluppo. Accanto ad isole completamente costituite da cellule mesenchimali (fibroblastoidi) e da capillari sanguiferi (isole nude), si osservano isole all'interno delle quali le cellule mesenchimali hanno iniziato un processo differenziativo in senso adipocitico evidenziati dai primi segni di accumulo lipidico. Tutte le cellule con accumuli lipidici in entrambe le sedi anatomiche considerate, mostravano una chiara morfologia ascrivibile ad adipociti bruni, evidenza confermata con indagini di immunostochimica per l'UCP1 che ha infatti mostrato una chiara positività (Fig. 7B).

L'indagine ultrastrutturale, tramite TEM, di questi "anlages" vasculo-adipocitici ha confermato il fenotipo bruno delle cellule presenti con accumuli lipidi multiloculari e con mitocondri caratteristici. Grazie a questo approccio siamo stati inoltre in grado di descrivere particolari caratteristiche della componente murale dei vasi sanguiferi presenti nelle isole. Le cellule endoteliali dei vasi hanno infatti mostrato in modo consistente una morfologia epitelioidale compatibile con un elevato tasso proliferativo di questo comparto dal quale molto probabilmente gemmano i nuovi adipociti che popolano l'isola (Fig.6).

L'evoluzione della morfologia dei depositi sottocutanei ora descritti è in linea con la situazione "finale" descritta nei soggetti adulti. Il pannello adiposo

diviene infatti via via più consistente come risultato dalla confluenza dei foci adiposi costituendo dei depositi disseccabili già a livello di sviluppo intermedio ma più chiari ed evidenti nel gruppo late e quindi in pre-termine. In particolare, il deposito latero-cervicale mostra una morfologia molto chiara con uno strato profondo formato da accumuli di BAT, uno strato intermedio misto ed uno più superficiale con caratteristiche prevalenti di tipo bianco. Lo sviluppo descritto, risulta sia da un punto di vista anatomico che istologico, totalmente comparabile a quanto già descritto nel modello murino dove i primi segnali di comparsa del tessuto adiposo sono descritti intorno a E18 in sede sottocutanea anteriore e solo successivamente in sedi posteriori come l'inguinale a P7. Anche per il comparto nervoso dei singoli depositi abbiamo caratterizzato uno sviluppo comparabile a quello già descritto nell'animale da laboratorio. Le isole vascolo-adipocitiche non sono infatti inizialmente innervate e questo sembra suggerire un controllo "cell-autonomus" da parte degli adipociti che acquisiscono in modo indipendente dal controllo del sistema nervoso (e quindi senza uno stimolo adrenergico centrale) il fenotipo bruno. Solo successivamente, a livelli di sviluppo più avanzati, compaiono prima nervi in posizione interlobulare, in associazione ai vasi sanguiferi maggiori, e poi a livello parenchimale dove diviene evidente anche la presenza di fibre nervose adrenergiche marcate con il marker funzionale. Questo evidenzia una situazione particolare e probabilmente riferibile alle necessità fisiologiche del feto. La produzione di calore a questo livello non sembra essere una necessità impellente ma il "macchinario" termogenetico assume via via la sua composizione definitiva per essere poi pronto a rispondere in maniera efficiente al repentino cambiamento imposto dall'esposizione all'ambiente esterno che consegue al parto. Il neonato dovrà quindi essere in grado di produrre calore allo scopo di mantenere un'adeguata temperatura corporea. Non avendo ancora un pannello adiposo sottocutaneo che lo protegga e non avendo una componente muscolare totalmente formata per la termogenesi da brivido, la termogenesi da BAT diventa quindi fondamentale. Questa situazione appena descritta è analoga a quella presente nei piccoli roditori dove il deposito interscapolare è già presente a livello embrionale (E18) ed è chiaramente formato da accumuli di adipociti UCP1-positivi che non risultano essere sotto il controllo del sistema nervoso ortosimpatico. Solo l'esposizione all'ambiente esterno e la necessità

di termoregolare in maniera indipendente, rendono necessario il “completamento” funzionale del circuito. Un'altra ipotesi relativa alla presenza di UCP1 a questo stadio di sviluppo può essere relativa alla necessità di ridurre la pressione ossidativa nei tessuti in formazione (53).

Per quanto riguarda la comparsa del grasso nelle sedi viscerali, i primi segni di accumulo da noi evidenziati sono in sede omentale (intorno alle 22^o settimana) ma purtroppo questa è risultata essere un'osservazione di tipo aneddótico non avendo a disposizione un numero sufficiente di campioni di questo deposito nei vari gruppi sperimentali da noi analizzati.

Uno studio più sistematico e completo è stato invece possibile per altri due depositi viscerali particolarmente interessanti che sono il mediastinico ed il perirenale. Quest'ultimo compare intorno alle 24 settimane di vita (quindi più tardivo del sottocutaneo) e con uno spiccato fenotipo bruno caratterizzato da cellule che esprimono alti livelli di UCP1. Il mediastinico risulta anch'esso comparire con un chiaro fenotipo bruno e con una tempistica leggermente diversa (intorno alle 26 settimane). In entrambi i casi, i primi accumuli che andranno a costituire il deposito finale sono formati da isole vascolo-adipocitiche che non sono innervate a livello parenchimale. Anche qui come nel comparto sottocutaneo appaiono prima i markers costitutivi delle fibre nervose e poi quello funzionale (nei pre-termine) che risulta anche in queste sedi essere prevalentemente di tipo adrenergico (TH positive). Queste evidenze sono particolarmente interessanti e rappresentano la vera novità dello studio, in quanto una caratterizzazione dettagliata dei depositi viscerali durante lo sviluppo fetale umano non è completamente disponibile in letteratura. Il fenotipo bruno dei primi accumuli di grasso viscerale che compongono l'organo adiposo dell'uomo è quindi un'evidenza non scontata ed importante e che permette di ipotizzare nell'uomo, come per il topo, dei fenomeni di whitening fisio-patologico dell'Organo Adiposo. Infatti, gli stessi depositi (in particolare il mediastinico) sono particolarmente morbigeni nella condizione di obesità dove risultano avere uno spiccato fenotipo bianco e spiccate caratteristiche pro-infiammatorie che si correlano in maniera diretta all'insorgenza di specifiche patologie metaboliche caratteristiche dell'obesità viscerale come il diabete e le relative complicanze cardiovascolari (50). Questo vale anche per il deposito peri-renale che nei pazienti adulti in sovrappeso ed obesi risulta essere formato prevalentemente da adipociti

bianchi ma che durante lo sviluppo mostra invece un chiarissimo fenotipo iniziale di tipo bruno. Ciò supporta nuovamente l'ipotesi di una trasformazione in senso bianco dei depositi viscerali, evento che determina una maggiore predisposizione dei soggetti adulti/anziani a sviluppare una serie di patologie. Inoltre queste evidenze avvalorano il ruolo protettivo del tessuto adiposo bruno nei confronti dello sviluppo di una serie di patologie nei soggetti giovani che hanno un grado di persistenza e di attività del BAT maggiore (54). Molto interessante notare come il deposito peri-renale sia uno di quelli che è risultato essere positivo in maniera chiara e consistente per lo Zic1, considerato un marker dell'adipocita bruno classico (anche gli adipociti dell'iBAT sono risultati positivi ma in maniera meno uniforme). Anche nel modello animale il peri-renale è uno dei depositi che mostra una chiara positività per lo Zic1 (3). Questo ci permette di ipotizzare che questo deposito origini come un deposito bruno classico per svolgere funzioni di termoregolazione. Il BAT a livello viscerale nell'uomo si associa prevalentemente ai grandi vasi sanguiferi allo scopo di ridurre la dispersione di calore. Risulta quindi logico spiegare la sua presenza a livello dell'origine dell'arco aortico nel mediastino così come a livello inter-renale in corrispondenza delle arterie renali, dove arriva il 25% della gittata cardiaca e dove quindi potenzialmente si potrebbe mettere in atto una forte dispersione di calore, se i reni e i grossi vasi non fossero opportunamente "coibentati". In questa ottica anche la massiva presenza di BAT a livello peri-renale si spiega nel senso di limitare la dispersione da parte di questi organi che sono molto prossimi alla superficie in corrispondenza della parete addominale posteriore. L'evidenza che questo deposito in molti pazienti adulti obesi risulti essere costituita da tessuto adiposo bianco, supporta l'ipotesi di una trasformazione diretta da adipociti bruni a bianchi con un cambio di fisiologia e con un conseguente impatto negativo sul profilo metabolico del soggetto.

In conclusione possiamo dire che l'organo adiposo umano segue uno sviluppo comparabile a quello murino. L'organo presenta spiccate caratteristiche brune in quasi tutte le sedi anatomiche sottocutanee e viscerali analizzati. Nei soggetti adulti questi stessi depositi risultano in parte (soprattutto i sottocutanei) permanere con un fenotipo bruno ma i viscerali assumono quasi sempre un fenotipo bianco maggiormente evidente e morbigeno nei

pazienti in sovrappeso e negli obesi dove questo fenotipo si associa con problematiche metaboliche e cardiovascolari. Dati a nostra disposizione che sono stati alla base della tesi di laurea da me svolta presso il laboratorio di Anatomia Umana dell'Università Politecnica delle Marche, hanno evidenziato che nei soggetti diabetici con un elevato BMI (>30) i depositi adiposi mediastinici perdono le loro caratteristiche brune. Questi depositi acquistano un fenotipo bianco (whitening) confermando la teoria della transdifferenziazione del tessuto adiposo, Gli adipociti contenuti in queste sedi mostrano infatti particolari caratteristiche sia dal punto morfologico che molecolare, nei pazienti di controllo.

Dal punto di vista morfologico abbiamo infatti osservato una significativa diversità nelle dimensioni di questi adipociti rispetto agli adipociti che si trovano nei depositi sottocutanei (in particolare nell'arto inferiore). Inoltre grazie ad approcci di tipo molecolare si è potuta evidenziare un'espressione genetica di questi tessuti, più simile al tessuto adiposo bruno che a quello bianco. In particolare, grazie all'analisi su estratti mitocondriali siamo riusciti ad identificare livelli sostanziali della proteina UCP1. Questo ci consente di ipotizzare un ruolo funzionale particolare di questo tessuto come ad esempio una protezione di tipo termico contro eventuali situazioni di esposizione cronica al freddo e quindi come meccanismo di difesa di uno degli organi più importanti del nostro organismo: il cuore. Nella corte di pazienti da noi analizzati le caratteristiche descritte erano perse ed il tessuto mediastinico (peri-cardico ed epicardico) risulta avere uno spiccato fenotipo bianco con caratteristiche pro-infiammatorie. Questo è in linea con le recenti scoperte relative al grasso viscerale che mostrano appunto che questo tessuto è maggiormente coinvolto nelle malattie metaboliche per una serie di motivazioni.

L'accumulo del grasso viscerale si correla maggiormente all'insorgenza della sindrome metabolica che si instaura nei soggetti obesi a seguito dello stato di infiammazione cronica di basso grado caratteristica del tessuto adiposo in queste condizioni fisio-patologiche (55). Lo stato infiammatorio si instaura a seguito della morte cellulare che causa il rilascio di materiale (soprattutto lipidico) nello spazio extracellulare dando il via ad una risposta di tipo immunitario per la rimozione del materiale da parte dei macrofagi, in una classica reazione da corpo estraneo. I macrofagi, per la loro funzionalità,

mettono in moto meccanismi molecolari che vanno ad interagire con il recettore dell'insulina determinando un fallimento della normale omeostasi guidata da questo ormone e causando una reazione a catena che porta all'insorgenza di una serie di patologie correlate tra cui il diabete.

La posizione anatomica dei depositi viscerali determina un maggior rischio di rilascio di queste molecole a livello sistemico ed è quindi più pericoloso come accumulo rispetto a quello sottocutaneo che risulta invece meno dannoso. Basti pensare alla vicinanza del tessuto omentale con la vena cava inferiore, o ai tessuti peri ed epicardici che sono in stretto contatto con le arterie coronariche.

Inoltre, il grasso viscerale mediastinico composto da adipociti più piccoli (originariamente bruni) e meno capaci di accumulare grosse quantità di grasso rispetto agli adipociti del sottocutaneo, diventa quindi a seguito del whitening una sede di infiammazione cronica nei pazienti obesi con le conseguenze sopra descritte (11) (56).

In conclusione possiamo affermare che questo studio conferma i dati già presenti in letteratura ma caratterizza in modo più dettagliato la natura dei primi accumuli di grasso durante lo sviluppo nell'uomo. L'evidenza è che questi sono chiaramente di tipo bruno sia in sede sottocutanea sia in sede viscerale. La trasformazione in senso bianco, soprattutto a livello dei depositi viscerali dei soggetti adulti, potrebbe essere alla base della insorgenza delle problematiche metaboliche. Una strategia terapeutica che si basi sul mantenimento del fenotipo bruno dell'organo potrebbe quindi essere indirizzata prevalentemente verso il comparto viscerale di grasso per mantenere e/o ripristinare le caratteristiche inizialmente brune (e la conseguente fisiologia catabolica) di questi depositi, oltre alla auspicabile attivazione del BAT a livello sottocutaneo (54).

5 Riferimenti bibliografici

- 1) Andrea Frontini, et al. (2010). Distribution and Development of Brown Adipocytes in the Murine and Human Adipose Organ. *Cell Metabolism*, **11**, 253-256.
- 2) Saverio Cinti (2012). The adipose organ at a glance. *Disease Models & Mechanisms*, **5**, 588-594.
- 3) Waldén, T. B., et al. (2012). Recruited vs. nonrecruited molecular signatures of brown, “brite,” and white adipose tissues. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.*, **302**, 19-31.
- 4) Caro, J.F., et al. (1996). Leptin: the tale of an obesity gene. *Diabetes*, **45**, 1455-62.
- 5) Balthasar N, et al. (2004). Leptin receptor signaling in POMC neurons is required for normal body weight homeostasis. *Neuron*, **42**,983-991.
- 6) Jansson PA, et al. (2003). A novel cellular marker of insulin resistance and early atherosclerosis in humans is related to impaired fat cell differentiation and low adiponectin. *Faseb Journal*, **17**, 1434-1440.
- 7) Ricquier D. (2005). Respiration uncoupling and metabolism in the control of energy expenditure. *The Proceedings of the Nutrition Society*, **64**, 47-52
- 8) Cannon, B., and Nedergaard, J. (2004). Brown Adipose Tissue: Function and Physiological Significance *Physiol*, **84**, 277-359.
- 9) Gordon CJ. (2012). Thermal physiology of laboratory mice: defining thermoneutrality. *Journal of Thermal Biology* **37**: 654–685.
- 10) Giordano A., et al. (2008). Adipose organ nerves revealed by immunohistochemistry. *Methods in Molecular Biology*, **456**, 83-95.
- 11) A. Smorlesi, et al. (2014). The adipose organ: white-brown adipocyte plasticity and metabolic inflammation. *Obesity Reviews*, **13**, 83-86.
- 12) De Matteis R, et al. (1998) TH-, NPY-, SP-, and CGRPimmunoreactive nerves in interscapular brown adipose tissue of adult ratsacclimated at different temperatures: an immunohistochemical study. *J Neurocytol*, **27**,877-886.
- 13) Giordano A, et al. (2005) Regional-dependent increase of sympathetic innervation in rat white adipose tissue during prolonged fasting. *J Histochem Cytochem*, **53**, 679-687.

- 14) Bartness T. J., et al. (2010). Sympathetic and sensory innervation of brown adipose tissue. *International Journal of Obesity*, **34**, 36-42.
- 15) Schachner M., et al., (2009). Neural Cell Adhesion Molecules and Synapse Regulation. *Encyclopedia of Neuroscience*, 91-96.
- 16) Nagatsu T. (1995). Tyrosine hydroxylase: human isoforms, structure and regulation in physiology and pathology. *Essays Biochemistry*, **30**, 15-35.
- 17) Lim S., et al. (2012) Cold-induced activation of brown adipose tissue and adipose angiogenesis in mice. *Nature Protocols*, **7**, 606-615.
- 18) Cao Y. (2013) Angiogenesis and Vascular Functions in Modulation of Obesity, Adipose Metabolism, and Insulin Sensitivity. *Cell Metabolism*, **18**, 478-489.
- 19) Khanh-Van Tran, et al. (2012). The Vascular Endothelium of the Adipose Tissue Gives Rise to Both White and Brown Fat Cells. *Cell Metabolism*, **15**, 222-229.
- 20) Wu J, et al. (2013). Adaptive thermogenesis in adipocytes: is beige the new brown? *Genes Dev*, **27**, 234-250.
- 21) Granneman JG, et al. (2005). Metabolic and cellular plasticity in white adipose tissue I: effects of beta3-adrenergic receptor activation. *Am J Physiol Endocrinol Metab*, **289**, 608-616.
- 22) Xue B, et al. (2007) Genetic variability affects the development of brown adipocytes in white fat but not in interscapular brown fat. *J Lipid Res*, **48**, 41-51.
- 23) Guerra C, et al. (1998). Emergence of brown adipocytes in white fat in mice is under genetic control. Effects on body weight and adiposity. *J Clin Invest*, **102**, 412-420.
- 24) Petrovic, N., et al. (2010). Chronic peroxisome proliferator-activated receptor gamma (PPARgamma) activation of epididymally derived white adipocyte cultures reveals a population of thermogenically competent, UCP1-containing adipocytes molecularly distinct from classic brown adipocytes. *The Journal of Biological Chemistry*, **285**, 7153-7164.
- 25) Wu J, et al. (2012). Beige adipocytes are a distinct type of thermogenic fat cell in mouse and human. *Cell*, **150**, 366-376.
- 26) Sanchez-Gurmaches J, et al. (2012). PTEN loss in the Myf5 lineage redistributes body fat and reveals subsets of white adipocytes that arise from Myf5 precursors. *Cell Metabolism*, **16**, 348-362.

- 27) Barbatelli, G., et al. (2010). The emergence of cold-induced brown adipocytes in mouse white fat depots is determined predominantly by white to brown adipocyte transdifferentiation. *American Journal of Physiology. Endocrinology and Metabolism*, **298**, 1244-1253.
- 28) Himms-Hagen, J., et al. (2000). Multilocular fat cells in WAT of CL-316243-treated rats derive directly from white adipocytes. *American Journal of Physiology. Cell Physiology*, **279**, 670-681.
- 29) Rosenwald, M., et al. (2013) Bi-directional interconversion of brite and white adipocytes. *Nature Cell Biology*, **15**, 659-667.
- 30) Vitali, A., et al. (2012) The adipose organ of obesity-prone C57BL/6J mice is composed of mixed white and brown adipocytes. *Journal of Lipid Research*, **53**, 619-629.
- 31) Lee, Y.H., et al. (2012). In vivo identification of bipotential adipocyte progenitors recruited by beta3-adrenoceptor activation and high-fat feeding. *Cell Metabolism*, **5**, 588-594.
- 32) Cinti S. (2011) Between brown and white: novel aspects of adipocyte differentiation. *Ann Med*, **43**, 104-115.
- 33) Sartini L. , et al. (2014). Potential novel therapeutic strategies from understanding adipocyte transdifferentiation mechanisms. *Expert Review of Endocrinology & Metabolism*, **10**, 143-152.
- 34) de Jong, J., et al. (2012). Expression of Zinc finger of the cerebellum 1 suggests a possible role in development and/or function of brown adipose tissue. in *Proceedings Of The Physiological Society*.
- 35) de Jong, J.M., et al. (2015). A stringent validation of mouse adipose tissue identity markers. *American Journal of Physiology. Endocrinology and Metabolism*, **308**, 1085-1105.
- 36) Cinti S. (2006) The role of brown adipose tissue in human obesity. *Nutrition, Metabolism and Cardiovascular Diseases*, **16**, 569-574.
- 37) Lizcano F., Guzman G. (2014) Estrogen Deficiency and the Origin of Obesity during Menopause. *BioMed Research International*. **2014**, 11.
- 38) Kirsi A. Virtanen, et al. (2009) Functional Brown Adipose Tissue in Healthy Adults. *The new England journal medicine*, **360**, 1518-1525.
- 39) Hondares E, et al. (2014) Fibroblast growth factor-21 is expressed in neonatal and pheochromocytoma-induced adult human brown adipose tissue. *Metabolism*, **63**, 312-317.

- 40) Masayuki Saito et al. (2009) High Incidence of Metabolically Active Brown Adipose Tissue in Healthy Adult Humans. *Diabetes*, **58**, 1526-1531.
- 41) Sacks HS, et al. (2009) Uncoupling protein-1 and related messenger ribonucleic acids in human epicardial and other adipose tissues: epicardial fat functioning as brown fat. *J Clin Endocrinol Metab*, **94**, 3611-3615.
- 42) Aaron M, et al. (2009) Identification and Importance of Brown Adipose Tissue in Adult Humans. *The new England Journal of Medicine*, **360**, 1509-1517.
- 43) M.C. Zingaretti, et al. (2009) The presence of UCP1 demonstrates that metabolically active adipose tissue in the neck of adult humans truly represents brown adipose tissue. *Faseb J*, **23**, 3113-3120.
- 44) C. M. Poissonnet, et al. (1984) The chronology of adipose tissue appearance and distribution in the human fetus. *Elsevier*, **10**, 1-11.
- 45) Wassermann, F., et al. (1965). The development of adipose tissue. *American Physiological Society*, **10**, 87-101.
- 46) Aheme, W. and Hull, D. (1966) Brown adipose tissue and heat production in the newborn infant. *J. Pathol. Bacteriol*, **91**, 223-234.
- 47) Antonia Graja Tim J. Schulz. (2015) Mechanisms of Aging-Related Impairment of Brown Adipocyte Development and Function. *Gerontology*, **61**, 211-217.
- 48) Nicole H. Rogers. (2014) Brown adipose tissue during puberty and with aging. *Annals of Medicine*, **47**, 142-149.
- 49) Yoneshiro T, et al. (2013) Impact of UCP1 and beta3AR gene polymorphisms on age-related changes in brown adipose tissue and adiposity in humans. *Int J Obes*
- 50) Harold S. Sacks, et al (2013) Adult Epicardial Fat Exhibits Beige Features. *J Clin Endocrin Metab*, **37**, 993-998.
- 51) Wouter D. van Marken Lichtenbelt. (1999). Cold-Activated Brown Adipose Tissue in Healthy Men. *The New England Journal of Medicine*, **360**-1500-1508.
- 52) Aaron M. Cypess, et al. (2010). The Role and Importance of Brown Adipose Tissue in Energy Homeostasis. *Current Opinion in Pediatrics*, **22**, 478-484.

- 53) R. Oelkrug, et al. (2014). Antioxidant properties of UCP1 are evolutionarily conserved in mammals and buffer mitochondrial reactive oxygen species. *Elvesier*, **77**, 210-216.
- 54) Giordano A., et al. (2016). Convertible visceral fat as a therapeutic target to curb obesity. *Nature Reviews Drug Discovery*, **15**, 405-424.
- 55) Björntorp P, et al. (1999). Visceral obesity and diabetes. *Drugs*, **8**, 75-82.
- 56) Murano I, et al. (2008). Dead adipocytes, detected as crown-like structures, are prevalent in visceral fat depots of genetically obese mice. *J Lipid Res*, **49**, 1562-1568.

6 Sezione iconografica

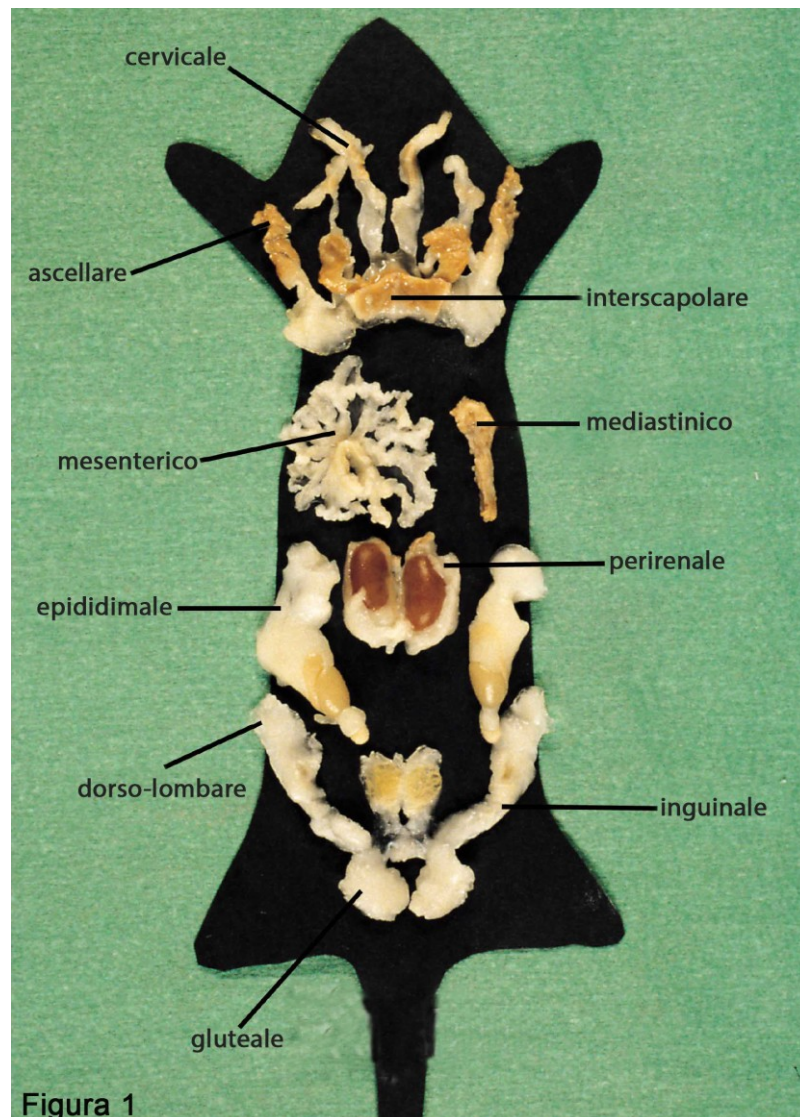


Figura 1: Organo adiposo del topo a temperatura ambiente. In questa immagine i vari depositi adiposi sono stati dissecati e disposti su di una sagoma. I depositi cervicali, ascellari e interscapolari costituiscono il deposito sottocutaneo anteriore. Quelli dorso-lombari inguinali e gluteali compongono il deposito sottocutaneo posteriore. Gli altri indicati nell'immagine sono i depositi viscerali. Da una valutazione colorimetrica è possibile valutare dal punto di vista qualitativo la composizione mista dei depositi.

Immagine tratta da: The Adipose Organ. (1999) Saverio Cinti. Editrice Kurtis

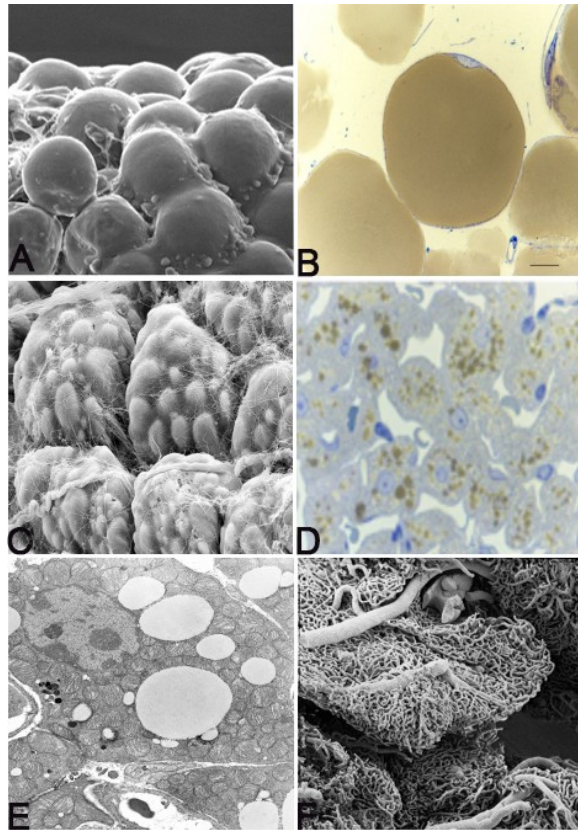


Figura 2: **A.** Immagine al microscopio elettronico a scansione di adipociti bianchi di topo. Queste cellule raggiungono una dimensione media di 40-50 micron nel topo.

B. Immagine al microscopio ottico di adipociti bianchi umani. La grossa goccia lipidica di colore giallo occupa la quasi totalità del citoplasma lasciando una sottile rima di citoplasma alla periferia. **C.** Adipociti bruni di topo al microscopio elettronico a scansione. Queste cellule raggiungono una dimensione media di 20-30 micron.

D. Immagine al microscopio ottico di tessuto adiposo bruno. La multilocularità caratteristica di questa citotipo, risulta evidente nelle numerose goccioline colorate di giallo. **E.** Queste cellule producono calore grazie all'UCP1 che si trova nei mitocondri peculiari di questa cellula. Al Microscopio elettronico a

Trasmissione è possibile visualizzare la loro dimensione e l'elevata densità all'interno del citoplasma. **F.** Casting vascolare eseguito nel tessuto adiposo bruno. Questa tecnica mette in evidenza la fine rete capillare presente nel tessuto e utile a distribuire il calore prodotto da questo tessuto.

Immagini tratte da: *The Adipose Organ.* (1999). Saverio Cinti. Editrice Kurtis. *Distribution and Development of Brown Adipocytes in the Murine and Human Adipose Organ.* (2010). Andrea Frontini and Saverio Cinti. *Cell Metabolism.* *The trochanteric fat pad.* (2011). P. Panettiere. *European Journal of Histochemistry.* Modificate da: Loris Sartini

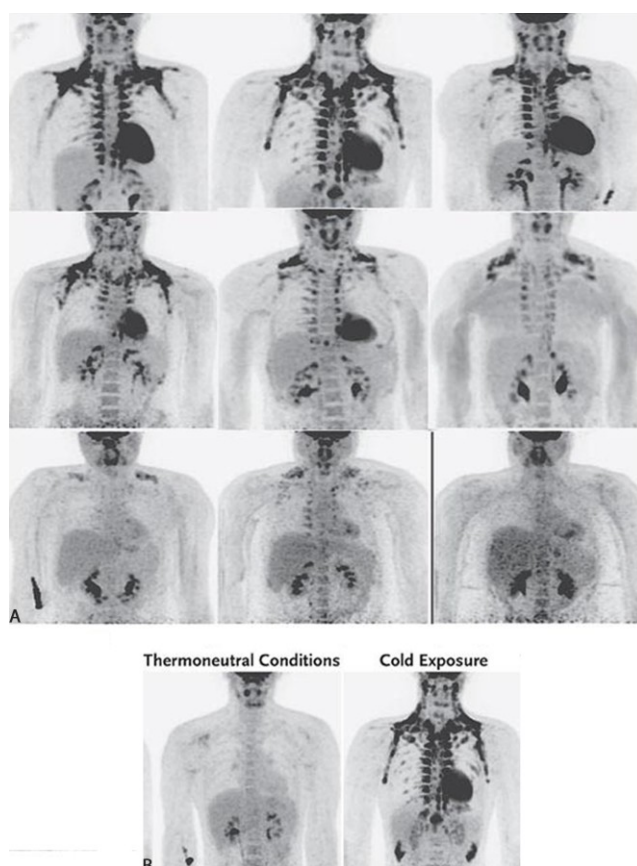


Figura 3: A. Risultati della PET-CT in 9 soggetti mostrano l'assorbimento fisiologico del ^{18}F -FDG nel BAT dell'uomo. Le immagini della riga superiore sono di soggetti magri con i più alti livelli di attività del tessuto adiposo Bruno, le immagini della fila centrale sono di soggetti magri con livelli medi di attività, e le immagini nella riga inferiore sono di soggetti obesi o in sovrappeso con bassi livelli di attività. La regione sovraclaveare risulta avere la maggior quantità di tessuto adiposo bruno. B. Scansione PET-CT con ^{18}F -FDG in un soggetto magro prima e dopo l'esposizione al freddo.

Immagine tratta da: Cold-Activated Brown Adipose Tissue in Healthy Men. (1999) Wouter D. van Marken Lichtenbelt. The New England Journal of Medicine. Modificate da: Loris Sartini



Figura 4: Distribuzione del tessuto adiposo bruno nel neonato, localizzato tra le scapole, intorno muscoli del collo e dei vasi sanguigni, nelle ascelle, e intorno ai reni e nelle ghiandole surrenali.

Immagini tratte da: The Structure and Function of Brown Adipose Tissue in the Neonate. (1980) V. Davis. Journal of Obstetric, Gynecologic, & Neonatal Nursing. Modificate da Loris Sartini.

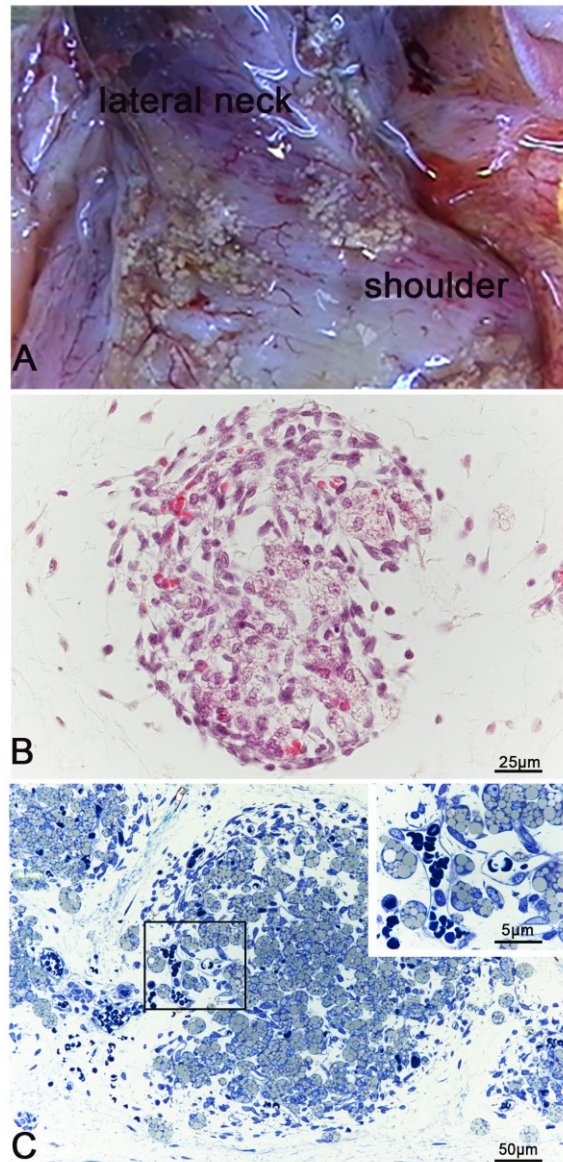


Figura 5: A. Anatomia rappresentativa del deposito adiposo sottocutaneo a livello latero cervicale tra le 16 e le 21 settimane.

B. Immagine rappresentativa di un'isola vascolo-adipocitica nuda con ematossilina ed eosina, una combinazione di piccoli vasi sanguiferi, nervi e preadipociti.

C. Immagine a forte ingrandimento di un'isola vascolo-adipocitica con blu di toluidina, si nota chiaramente l'aspetto multiloculare dei preadipociti a stretto contatto con i vasi contenuti all'interno dell'isola.

Modificate con permesso da Frontini et al. in preparazione e da S. Cinti (Obesity, Diabetes and The Adipose Organ, Springer Ed.)

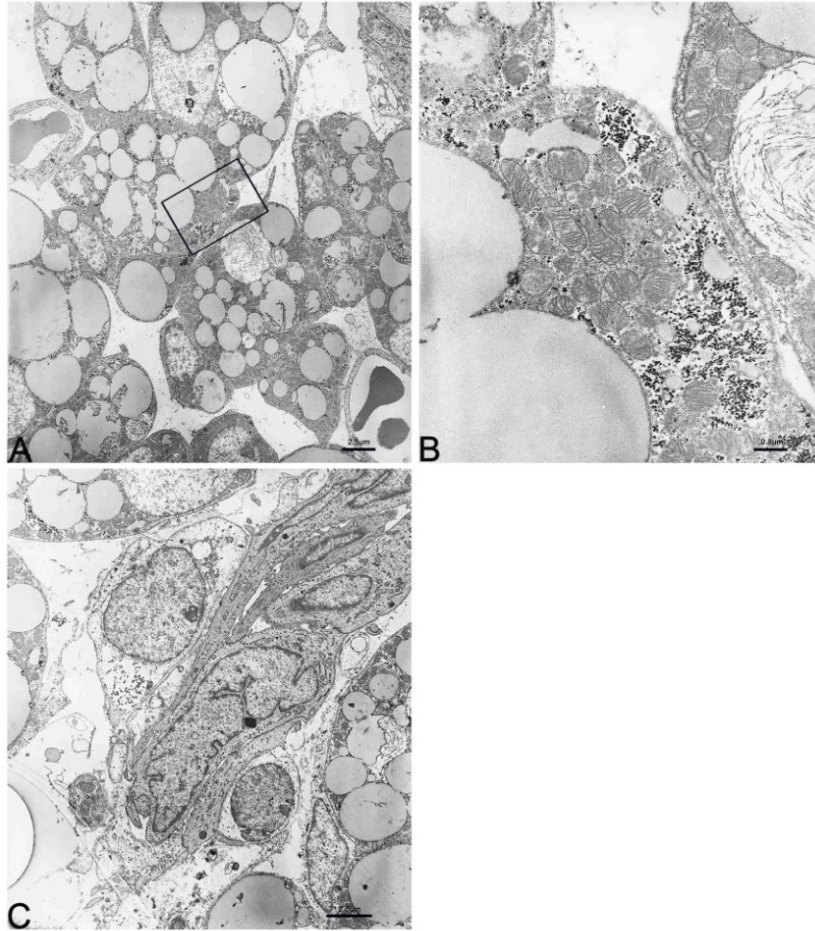


Figura 6: A. Immagine al microscopio elettronico a trasmissione di adipociti prelevati nel deposito latero cervicale del gruppo early, con un aspetto chiaramente multiloculare .

B. Immagine a più forte ingrandimento dove si nota che questi adipociti possiedono grossi mitocondri, ricchi di creste trasversali e impacchettate tra loro ed abbondanti granuli di glicogeno.

C. Grosso vaso capillare con cellule endoteliali a nucleo particolarmente convoluto a suggerire la forte attività proliferativa delle cellule murali del vaso.

Modificate con permesso da Frontini et al. in preparazione e da S. Cinti Obesity, Diabetes and The Adipose Organ, Springer Ed.)

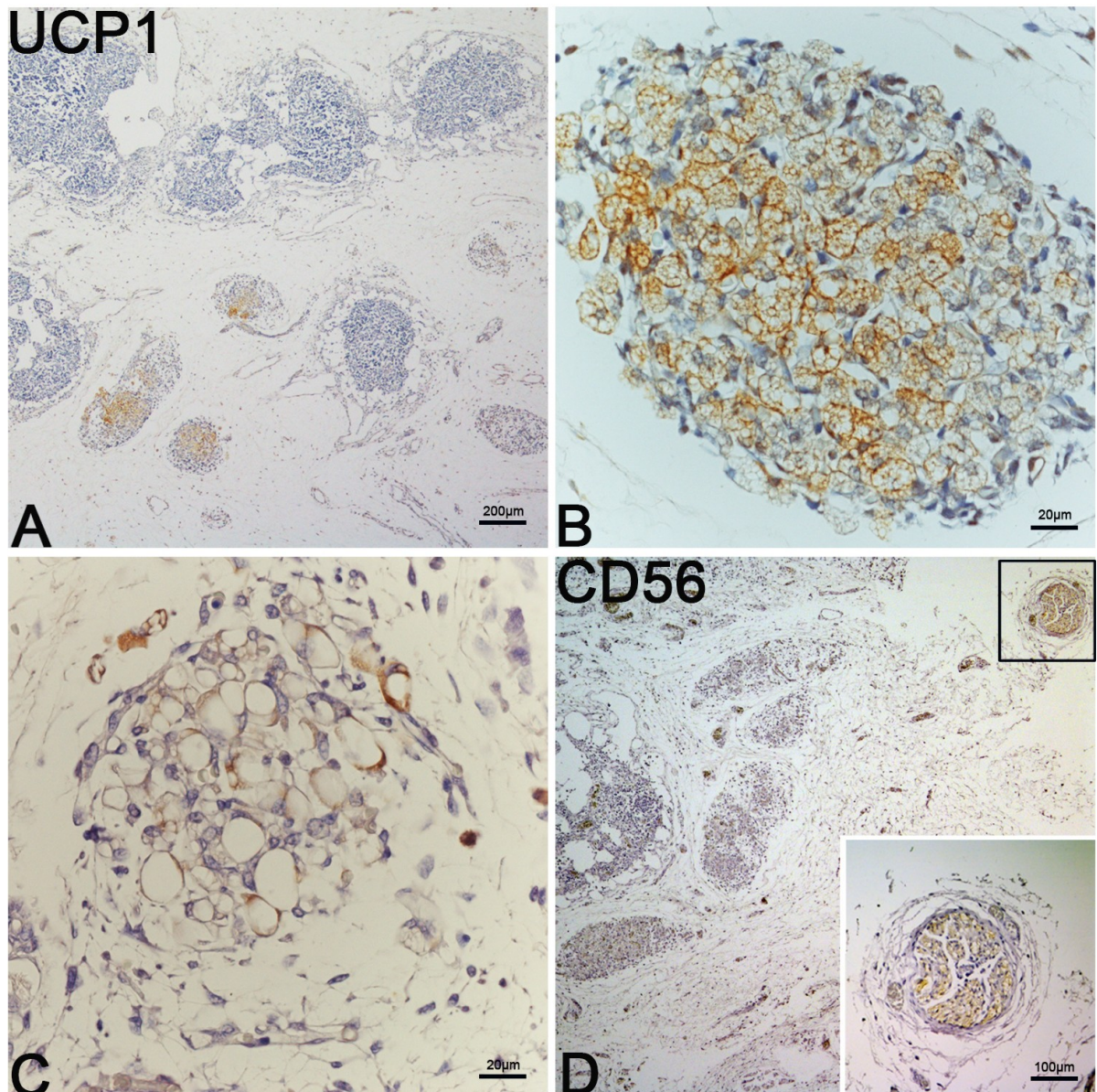


Figura 7: A. Immunoistochimica contro la proteina UCP1 su campione latero cervicale del gruppo early.

B. Immagine rappresentativa dell'immunomorfologia di un'isola vasculo adipocitica del comparto latero cervicale. Il risultato positivo viene evidenziato con un precipitato marrone a livello del citoplasma (mitocondri) degli adipociti bruni.

C. Immunoistochimica eseguito contro l'UCP1 su un campione rappresentativo del deposito iBAT del gruppo early, permettendo di capire facilmente quali adipociti pauciloculari risultano essere positivi all'UCP1.

D. Il tessuto latero cervicale mostra la presenza di grossi fasci di fibre nervose in posizione inter-lobulare i quali sono risultati positivi per il marker costitutivo CD56.

Potenzialmente inclusa in Frontini et al., in preparazione

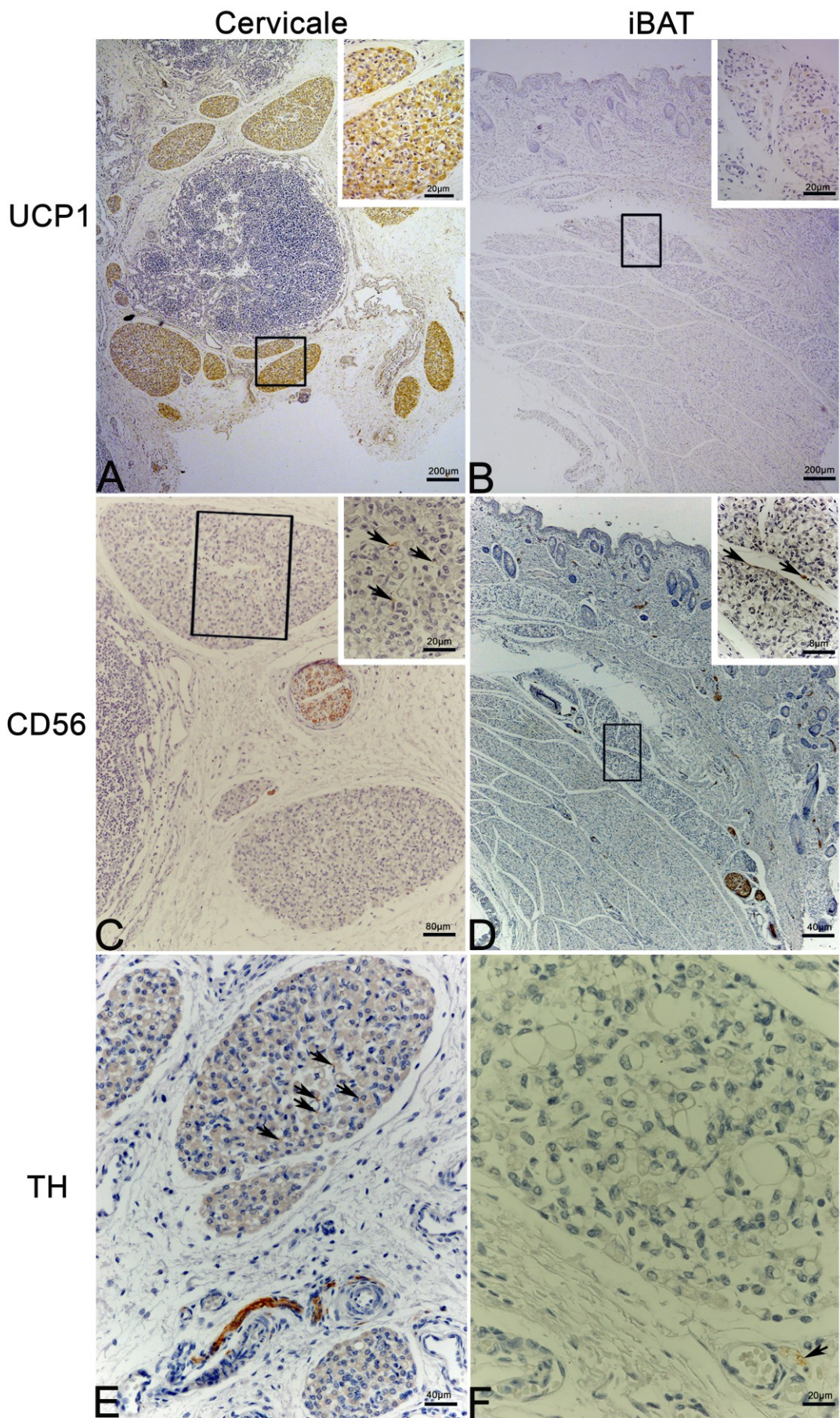


Figura 8: A. Immunoistochimica per l'UCP1 su un campione rappresentativo del deposito laterocervicale del gruppo intermedio, gli adipociti dello strato più profondo risultano essere positivi a questo marker.

B. L'iBAT risulta mostrare una morfologia pauciloculare e solo alcune delle cellule contenute nello strato più profondo risultano essere positive all'UCP1, mentre le altre risultano essere negative.

C.D.E.F. Immagini rappresentative dello sviluppo del comparto nervoso dei depositi sottocutanei per i markers CD56 e TH. Si nota la presenza di fibre interlobulari/perivascolari e intralobulari/parenchimali positive per il marker costitutivo, indicate con le frecce. Nel deposito laterocervicale ritroviamo fibre intralobulari/parenchimali positive al TH, mentre nell'iBAT ritroviamo solo le fibre perivascolari positive a questo marker.

Potenzialmente inclusa in Frontini et al., in preparazione

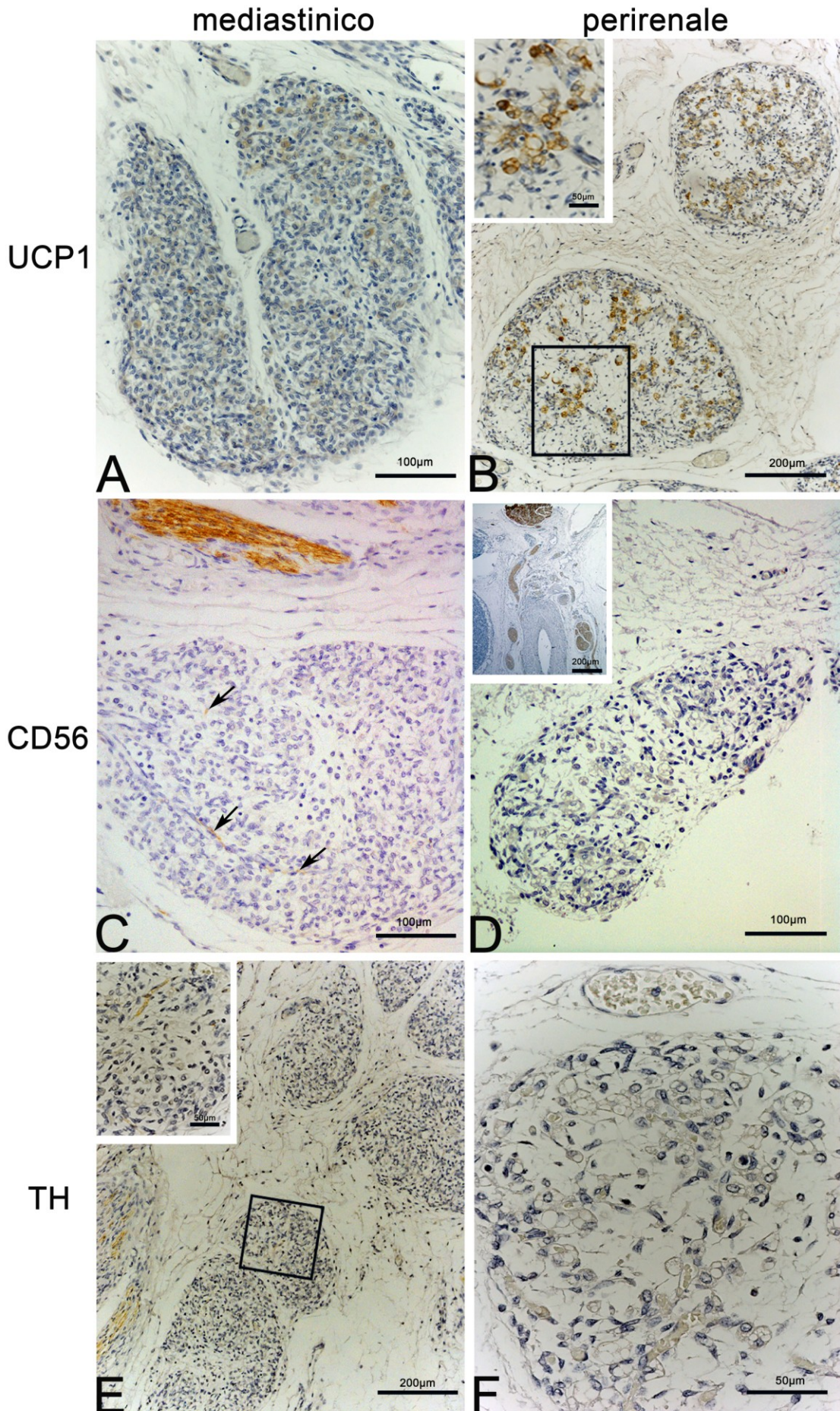


Figura 9: A.B. Immagini rappresentative dell'immunomorfologia delle isole vasculo-adipocitiche dei comparti viscerali a livello mediastinico e perirenale positive all'UCP1.

C. E. Immagini rappresentative dello sviluppo del comparto nervoso del deposito mediastinico per i markers CD56 e TH. Si nota la presenza di fibre intralobulari/parenchimali positive per entrambi i markers.

D. F. A livello perirenale ritroviamo solo fibre nervose interlobulari/perivascolari positive ai markers (vedi riquadro D), mentre le isole risultano negative.

Potenzialmente inclusa in Frontini et al., in preparazione



Figura 10: A. Anatomia del deposito latero cervicale del gruppo late. Questo deposito ha raggiunto la sua costituzione finale formando un unico pannicolo adiposo sottocutaneo dissecabile dalle altre strutture.

B. Immagine macroscopica dei quattro depositi presi in esame per questo studio del gruppo late.

Potenzialmente inclusa in Frontini et al., in preparazione

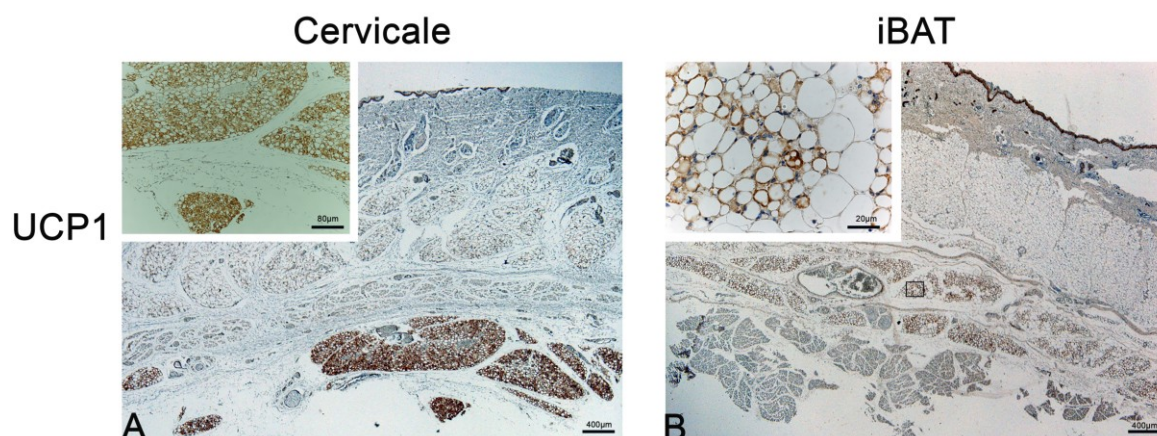


Figura 11: A. B. Immagine rappresentativa dell'immunomorfologia dei depositi sottocutanei del gruppo late. Ritroviamo isole fortemente positive all'UCP1 nella parte più profonda dei due depositi mostrati.

Potenzialmente inclusa in Frontini et al., in preparazione

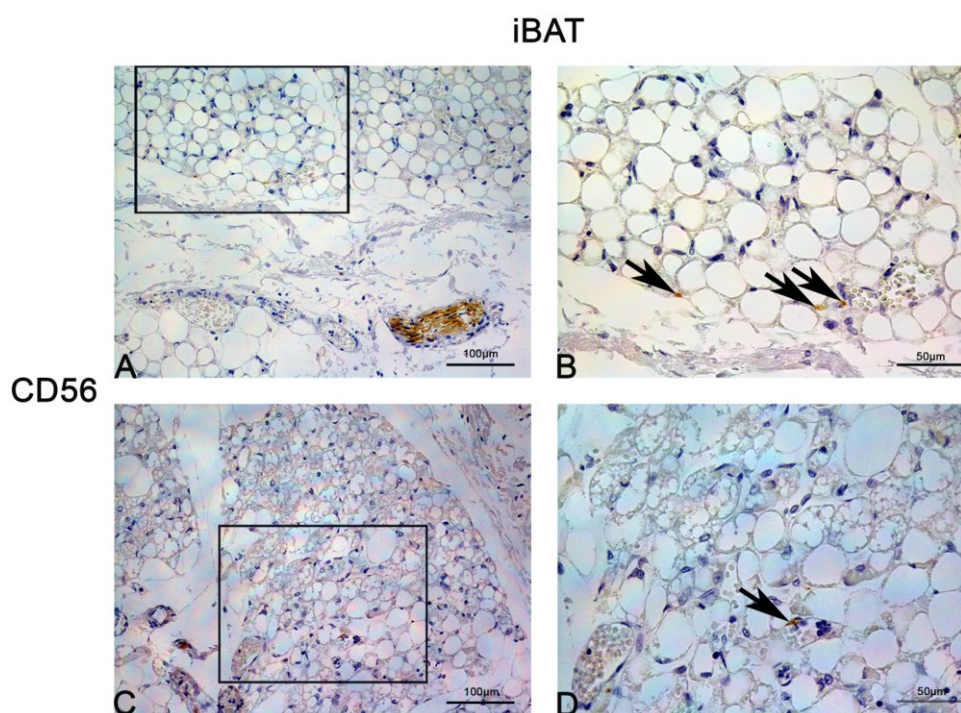


Figura 12 A.B.C.D. Immagini rappresentative del comparto nervoso del deposito interscapolare per il marker CD56. Si nota la chiara presenza di fibre intralobulari/parenchimali positive per questo marker, indicate con le frecce.

Potenzialmente inclusa in Frontini et al., in preparazione

CD56

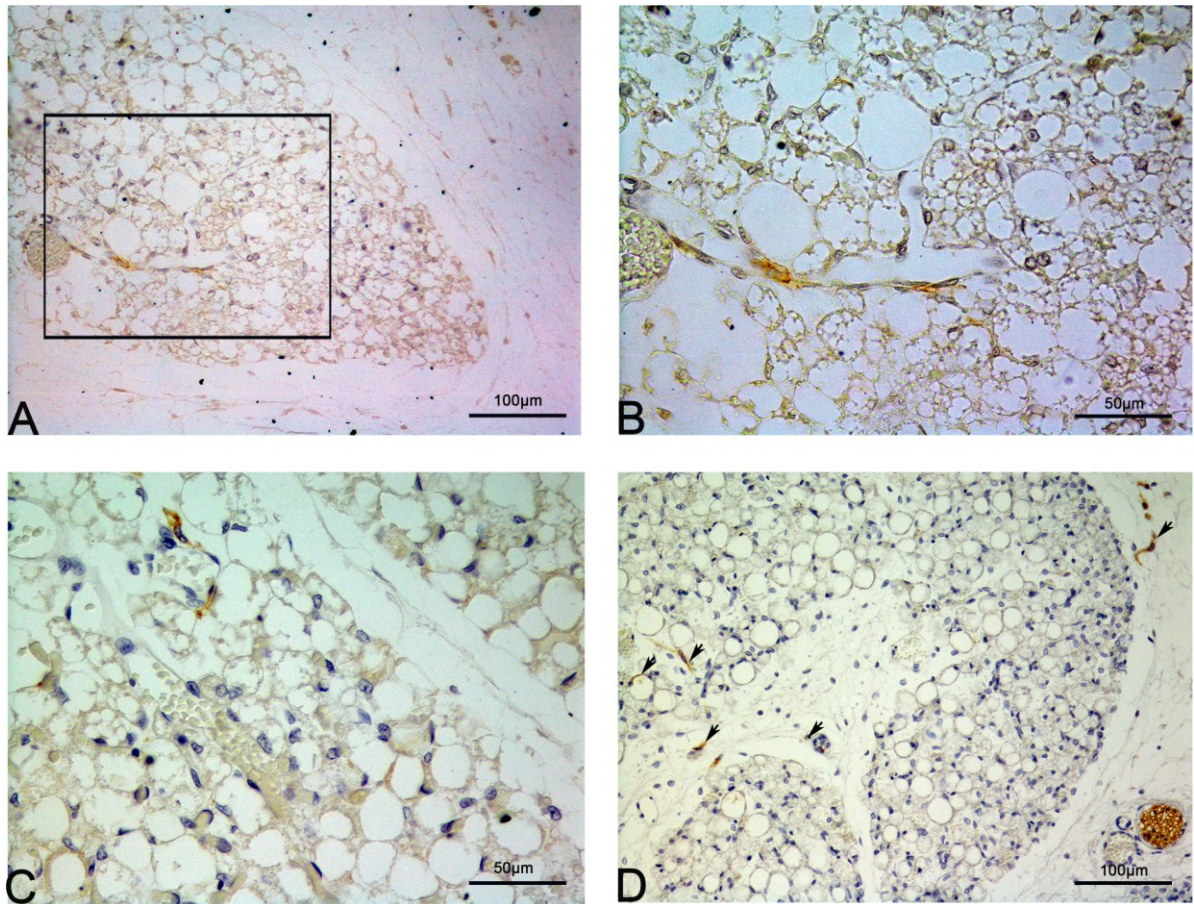


Figura 13: A.B.C.D. Immagine rappresentativa del grado d'innervazione del mediastinico (A, B, C) e del perirenale (D) che risulta essere in linea con quanto descritto nei depositi sottocutanei. Ritroviamo infatti le fibre intralobulari/parenchimali positive per il marker CD56.

Potenzialmente inclusa in Frontini et al., in preparazione

ZIC1

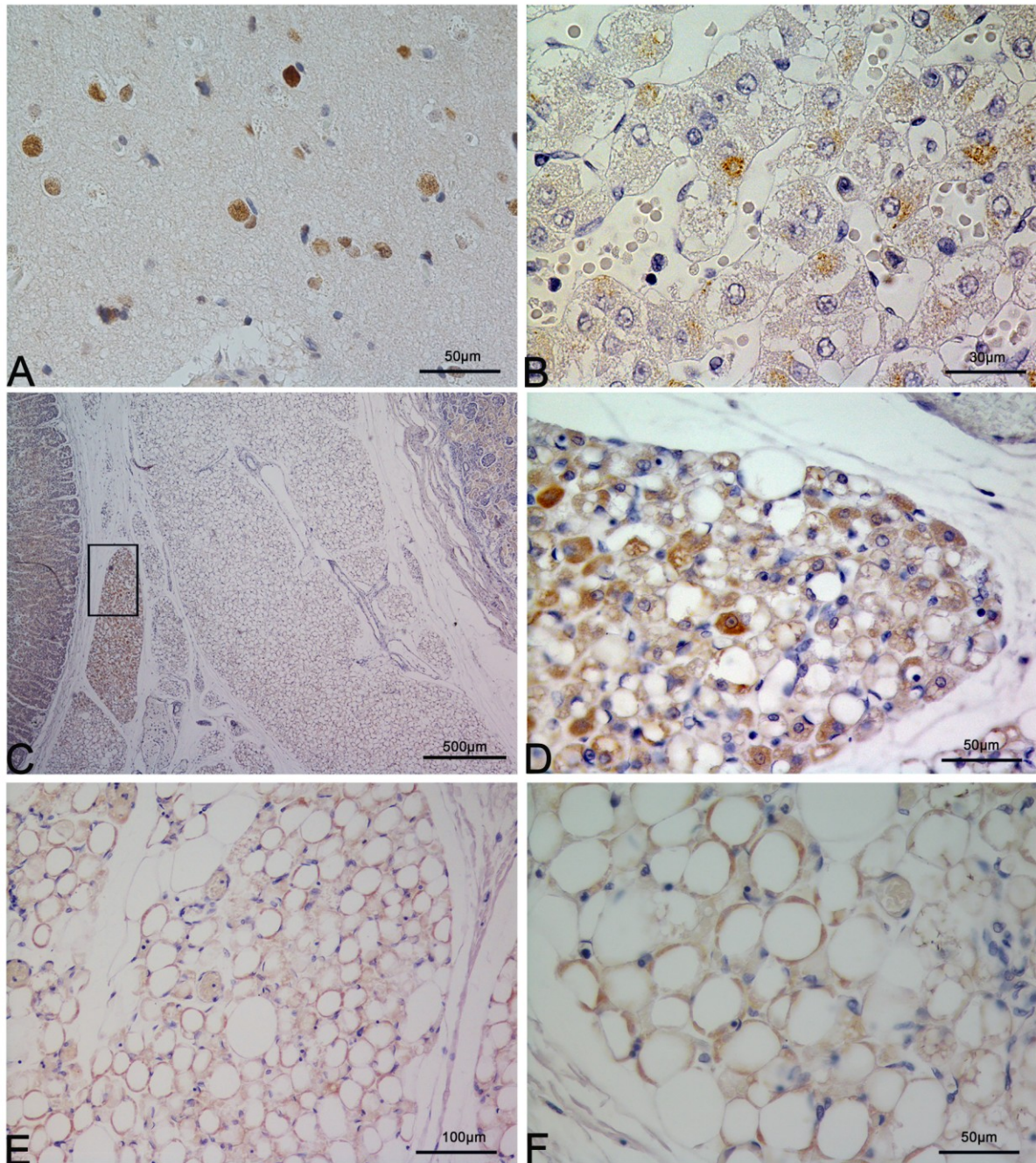


Figura 14: A.B. Immagini di immunoistochimica di cervelletto (A) e surrene (B) usati come controlli positivi per il marker ZIC1. C.D. Immagine di immunoistochimica sul deposito perirenale del gruppo late per il marker ZIC1, si notano diversi adipociti multiloculari positivi. E.F. A livello interscapolare si trovano adipociti pauciloculari con una blanda positività per lo Zic1.

Potenzialmente inclusa in Frontini et al., in preparazione