

UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI VERONA

DIPARTIMENTO DI MEDICINA

SCUOLA DI DOTTORATO DI SCIENZE DELLA VITA E DELLA SALUTE

DOTTORATO DI RICERCA IN  
SCIENZE BIOMEDICHE CLINICHE E SPERIMENTALI

XXXI ciclo  
S.S.D. MED/09

*Con il contributo di Banca Popolare*

MODULAZIONE DEI FENOMENI DI SENESCENZA  
CELLULARE DI ADIPOCITI E PREADIPOCITI *IN VITRO*

Coordinatore: prof. Giovanni Targher

Tutor: Ch.mo prof. Mauro Zamboni

Correlatore: dott.ssa Elena Zoico

Dottoranda: Maela Tebon

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

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



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



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



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

# INDICE

SOMMARIO	5
SCOPO DELLA TESI	6
ABSTRACT	7
1. INTRODUZIONE	
1.1 Modificazione del tessuto adiposo e invecchiamento	8
1.2 Caratteristiche del tessuto adiposo bianco	9
1.3 Adipogenesi e invecchiamento	10
1.4 Invecchiamento e infiammazione cronica	12
1.5 Invecchiamento e stress ossidativo	14
1.6 Senescenza cellulare e fenotipo SASP ( <i>senescence-associated secretory phenotype</i> )	15
1.7 miRNA e tessuto adiposo	17
1.8 Sirtuine e invecchiamento	19
1.9 Possibili modulatori di senescenza	20
1.9.1 Flavonoidi, la quercetina	22
2. MATERIALI E METODI	
2.1 Colture cellulari	25
2.2 Trattamento con quercetina in adipociti	26
2.3 Stimolazione con perossido di idrogeno e trattamento con quercetina in adipociti	26
2.4 Stimolazione con perossido di idrogeno e trattamento con quercetina in adipociti	27
2.5 Stimolazione con perossido di idrogeno e trattamento con quercetina in preadipociti	28
2.6 Morfologia degli adipociti	29
2.7 Quantificazione area dei preadipociti	29
2.8 Saggio di senescenza dell'attività $\beta$ - galattosidasica	29
2.9 Analisi dei radicali dell'ossigeno	30
2.10 Estrazione di RNA, retrotrascrizione ed espressione genica e miRNA (Real-Time PCR, RT-PCR)	31
2.11 Analisi delle proteine mediante Western blot	32
2.12 Analisi statistica	32

3. RISULTATI	
3.1 Il trattamento con quercetina modula il profilo infiammatorio e la senescenza in adipociti maturi 3t3-L1 in vitro	33
3.2 Effetti del trattamento con quercetina sul processo di senescenza prematura indotta in adipociti maturi 3T3-L1 in vitro	38
3.3 Effetti del trattamento con quercetina sul processo di senescenza prematura indotta in preadipociti 3T3-L1 in vitro	48
4. DISCUSSIONE	49
5. BIBLIOGRAFIA	54

## SOMMARIO

L'invecchiamento è accompagnato da una complessa rete di processi biologici caratterizzati da uno stato infiammatorio cronico basale, a sua volta correlato allo sviluppo di patologie età-associate come: aterosclerosi, osteoartriti, Alzheimer, diabete di tipo 2. Una sempre più approfondita analisi del processo di senescenza tessuto-specifico potrebbe consentire l'individuazione di target terapeutici utili a modulare il processo complessivo dell'invecchiamento stesso.

L'invecchiamento è causa di declino delle funzionalità sistemiche e il tessuto adiposo è uno degli organi maggiormente colpiti in quanto subisce cambiamenti significativi che riguardano la quantità, la distribuzione, la composizione cellulare e l'attività endocrina, giocando un ruolo chiave nell'insorgenza di insulino-resistenza, di disfunzioni metaboliche e infiammazione sistemica.

L'abbondanza del tessuto adiposo e le diverse funzioni da esso esercitate lo rendono un organo fondamentale per la comprensione della fisiologia dell'intero organismo. Tuttavia, i cambiamenti a cui è sottoposto durante il processo di invecchiamento sono solo in parte noti e oggetto di studio negli ultimi anni. È quindi fondamentale conoscere i processi molecolari che stanno alla base della fisiopatologia del tessuto adiposo e del suo invecchiamento in modo da poter individuare strategie terapeutiche per le malattie correlate all'invecchiamento.

In questo studio, è stato messo a punto un modello cellulare di senescenza *in vitro* attraverso il trattamento con perossido di idrogeno ( $H_2O_2$ ) in adipociti e preadipociti 3T3-L1 murini. Successivamente è stata valutata la potenziale attività senolitica della quercetina esaminandone l'effetto antiossidante e antinfiammatorio, cercando di individuarne il target molecolare.

## **SCOPO DELLA TESI**

Studio delle modificazioni delle caratteristiche morfologiche e funzionali del preadipocita e dell'adipocita maturo con valutazione degli effetti di stress ossidativo e/o di un trattamento con un agente flavonoide con proprietà di tipo senolitico.

## ABSTRACT

Aging is associated with pathological age-related processes as inflammatory low-grade state, atherosclerosis, Alzheimer's disease, type II diabetes and osteoarthritis diseases. A deep analysis of the tissue-specific senescence process could allow the identification of therapeutic targets to modulate the aging process itself.

In this study, premature senescence model was developed *in vitro* through treatment with oxygen peroxide ( $H_2O_2$ ) in murine 3T3-L1 preadipocytes before and after induction to mature adipocytes.

$H_2O_2$  treated cells showed characteristic senescence-associated features including senescence-associated beta-galactosidase activity (SA- $\beta$ -gal), activation of reactive oxygen species (ROS) development of senescence-associated secretory phenotype (SASP), induction of cell cycle inhibitors P-21 as well as induction of pro-inflammatory transduction factor NF $\kappa$ B and a downregulation of deacetylase SIRT1. We found that stimulation with  $H_2O_2$  results in an induction of miR-155-5p expression in preadipocytes and in mature adipocytes.

The treatment with quercetin (20  $\mu$ M) showed significant decrease in the number of  $\beta$ -galactosidase positive cell along with the suppression of ROS, NF $\kappa$ B and SASP factor in both cell models. In addition, quercetin treatment also upregulated protein expression of SIRT1 and decreased miR-155-5p expression.

These results suggest that quercetin acts as a potential senolytic agent in both preadipocytes and adipocytes cell models, inhibiting ROS production and pro-inflammatory miR-155-5p.

# 1. INTRODUZIONE

## 1.1 Modificazione del tessuto adiposo con l'invecchiamento

Il tessuto adiposo (TA) è definito come un unico complesso organo in grado di produrre e secernere diverse adipochine e citochine in grado di regolare una serie di processi metabolici come l'adipogenesi, il metabolismo del glucosio, il sistema renina-angiotensina, l'angiogenesi, la risposta immunitaria e l'omeostasi cellulare. Fisiologicamente l'organo adiposo è distribuito in depositi sottocutanei e viscerali che convergono nella regolazione dell'omeostasi energetica. Il deposito sottocutaneo comprende la zona sottocutanea superficiale, profonda e intermuscolare mentre i depositi viscerali sono localizzati nella cavità addominale e in quella toracica [1].

Il tessuto adiposo bianco ha la principale funzione di immagazzinare energia sotto forma di trigliceridi per rilasciare acidi grassi durante il digiuno e/o al bisogno. Le molecole bioattive prodotte e secrete influenzano diversi parametri fisiologici tra cui l'appetito, il dispendio energetico, la sensibilità all'insulina, la funzione vascolare, l'immunità e la coagulazione [1].

La distribuzione del tessuto adiposo varia con il tempo: in particolare tra i 40-65 anni si assiste ad un aumento della percentuale della massa grassa corporea [2]. Dalla mezza età in poi, la distribuzione del tessuto adiposo subisce un cambiamento con redistribuzione dal tessuto adiposo sottocutaneo al tessuto viscerale con incremento della presenza di insulino-resistenza e sindrome metabolica [3]. In fasce di età più avanzate, si assiste ad una generale diminuzione della massa grassa [4], il tessuto adiposo diviene disfunzionale e redistribuito in sede ectopica ovvero nel muscolo, nelle cellule  $\beta$ -pancreatiche, nel cuore e nel midollo osseo [5][6][7]. La redistribuzione del grasso nell'anziano è associata ad un aumentato rischio dell'insorgenza di sindrome metabolica, diabete di tipo II, ipertensione, aterosclerosi e di altre conseguenze cliniche rilevanti [8][9].

L'infiltrazione del grasso nel muscolo è una condizione patologica definita miosteatosi tipica dell'invecchiamento correlata a una diminuzione della forza del muscolo e a maggior rischio di disabilità [10].

L'incremento di tessuto adiposo nel pancreas è stato osservato in uno studio condotto su circa 2000 soggetti di età differente, sottoposti a tomografia computerizzata. Tale

studio ha messo in evidenza come, a partire dai 60 anni, il volume del pancreas gradualmente diminuisce mentre il deposito di massa grassa all'interno di tale organo aumenta in entrambi i sessi [11].

Il grasso intra-miocardico e il grasso epicardico, fisiologicamente situati rispettivamente all'interno e attorno al cuore, hanno suscitato l'interesse di molti studi clinici. In particolare, il grasso intra-muscolare è correlato a ipertrofia ventricolare e a complicanze cardiache [12]. Il tessuto adiposo epicardico è considerato grasso viscerale e studi clinici hanno evidenziato il possibile aumento durante l'invecchiamento di entrambi i distretti indipendentemente dall'obesità del soggetto [13].

Un ulteriore distretto in cui il tessuto adiposo ectopico aumenta con l'età è il midollo spinale [14]. Fisiologicamente il tessuto adiposo è presente all'interno del midollo spinale con una % che varia dal 30% in età pediatrica fino al 90% negli anziani [15]; la sua funzione non è ancora del tutto nota ma può fungere non solo da tessuto di riempimento, ma può anche rappresentare una risorsa energetica e un fattore necessario alla differenziazione cellulare delle linee ematopoietiche midollari [16].

## **1.2 Caratteristiche del tessuto adiposo bianco**

Sotto il profilo istologico, l'adipocita bianco è uniloculare, accumula acidi grassi dopo i pasti per fornire all'organismo energia sotto forma di trigliceridi neutri. I trigliceridi intracellulari sono rapidamente idrolizzati in glicerolo e acidi grassi liberi dagli enzimi lipasi e trasportati nei tessuti per essere  $\beta$ -ossidati nei mitocondri. È stato dimostrato che la mobilitazione dei lipidi è modificata in topi vecchi rispetto a topi giovani a causa dell'alterazione di geni che codificano le apolipoproteine; in risposta a stress esterni come il digiuno, topi giovani mantengono l'omeostasi dell'energia attivando le lipoproteine mentre topi vecchi non sono in grado di adattarsi a tale stimolo [18].

L'incremento di acidi grassi a disposizione degli organi associato ad una  $\beta$ -ossidazione difettiva comporta lipotossicità con effetti sistemici citotossici [19]. Gli acidi grassi saturi, infatti, come il palmitico e lo stearato sono molto più tossici rispetto agli acidi grassi insaturi (palmitolo, oleato o linoleato) poiché sono la base per la produzione di ceramide [20]. Gli adipociti prevengono la lipotossicità sequestrando gli acidi grassi sotto forma di trigliceridi.

### 1.3 Adipogenesi e invecchiamento

I preadipociti, la cui presenza nel tessuto adiposo varia dal 15% al 50%, si differenziano in adipociti maturi permettendo un continuo *turn over* del tessuto adiposo. Tuttavia, con l'avanzare dell'età la funzionalità di tali cellule diviene difettiva. In modelli *in vivo*, preadipociti isolati da ratti anziani trattati con oleato accumulano lipidi in piccole quantità e presentano un aumento dell'attività apoptotica rispetto a preadipociti di ratti giovani. Tali preadipociti mostrano inoltre, una significativa diminuzione dell'espressione di geni coinvolti nella differenziazione adipocitaria [21].

Fisiologicamente, le cellule mesenchimali presenti nel tessuto adiposo hanno capacità replicativa e si differenziano in adipociti maturi in risposta a determinati stimoli. Ormoni come insulina, glucocorticoidi e fattori paracrini e autocrini stimolano l'espressione di fattori di trascrizione come *proliferator activated receptor-γ* (PPAR- $\gamma$ ) e *CCAAT/enhancer binding protein* (C/EBP) da parte di preadipociti per differenziarsi in adipociti maturi. L'invecchiamento e lo stress cellulare modificano la funzionalità delle cellule mesenchimali, non solo dei preadipociti *in situ*, ma anche al di fuori del tessuto adiposo a formare cellule parzialmente differenziate definite cellule MAD (*mesenchymal adipocyte-like default cells*) a livello del muscolo e del midollo osseo nelle persone anziane [22]. Tali cellule possono contribuire alla formazione di grasso ectopico durante l'invecchiamento.

In definitiva, un'alterazione fisiopatologica del tessuto adiposo bianco comporta la secrezione da parte delle cellule di citochine pro-infiammatorie e chemochine che alterano il sistema immunitario *in situ* richiamando monociti e attivando i macrofagi. I fattori successivamente rilasciati dai macrofagi inducono il rilascio di acidi grassi dalle cellule adipose limitrofe impedendo la differenziazione dei preadipociti, causando la formazione di cellule MAD. Tutti questi processi contribuiscono alla lipotossicità del tessuto adiposo disfunzionale, aumentando lo stress cellulare e generando ulteriore infiammazione che si ripercuote a livello sistemico, amplificandone il fenomeno.

Non solo la capacità di differenziazione ma anche di replicazione dei preadipociti subisce un declino durante l'invecchiamento [23][24].

Tuttavia, è stato ipotizzato che la diminuzione dei depositi di grasso con l'invecchiamento è conseguenza della riduzione della dimensione degli adipociti e non del numero delle cellule adipose [25][26]. È stato dimostrato che, cellule progenitrici

di adipociti provenienti da individui anziani non sono in grado di accumulare lipidi e di rispondere allo stimolo insulinico allo stesso modo di cellule provenienti da individui giovani, contribuendo alla formazione di cellule piccole, insulino-resistenti e disfunzionali.

Inoltre, in esperimenti condotti *in vitro*, si è visto che preadipociti isolati da individui anziani trattati con medium di differenziamento accumulano lipidi in gocce di diametro molto più piccolo rispetto alle cellule isolate da soggetti giovani [25]. Tale fenomeno è stato attribuito alla diminuzione dell'espressione di fattori di trascrizione coinvolti nell'adipogenesi quali C/EBP- $\beta$  che coopera con C/EBP- $\alpha$  e PPAR- $\gamma$  [26]. Il processo di differenziazione viene concluso in seguito all'espressione di fattori anti-adipogenici come *liver inhibitor protein* (C/EBP- $\beta$ -LIP) e CHOP *C/EBP homologous protein* (CHOP) che formano eterodimeri con i membri della famiglia C/EBP a livello di promotori specifici bloccando l'adipogenesi. In particolare, *CUG triplet repeat RNA binding protein* (CUGBP) lega triplette specifiche di mRNA presenti in C/EBP- $\beta$ -LIP attivando fattori anti-adipogenici che permettono la formazione di proteine attive. È stato dimostrato che, durante l'invecchiamento l'espressione di C/EBP- $\alpha$  diminuisce in cellule adipose di ratto e l'over-espressione *in vitro* di tale gene ripristina la capacità di differenziamento completo [27]. Inoltre, il fattore anti-adipogenico C/EBP- $\beta$ -LIP aumenta durante l'adipogenesi sia *in vitro* che *in vivo* durante l'invecchiamento e tale caratteristica è dovuta all'aumento dell'attività di CUGBP [28]. Inibendo CUGBP nei preadipociti di ratti invecchiati, si assiste ad un incremento dell'accumulo lipidico rispetto a topi giovani *wild type*. Inoltre, si è visto che *tumor necrosis factor- $\alpha$*  (TNF- $\alpha$ ), secreto a livello del tessuto adiposo disfunzionale, incrementa l'attività della proteina CUGBP nei preadipociti e di CHOP esercitando funzione anti-adipogenica; il silenziamento di TNF- $\alpha$  nei preadipociti coltivati *in vitro* comporta l'abbassamento del livello di CHOP e il successivo aumento dell'accumulo lipidico [29].

## 1.4 Invecchiamento e infiammazione cronica

Dalla scoperta dell'ormone leptina nel 1994, è stato attribuito al tessuto adiposo un ruolo endocrino nella regolazione dell'omeostasi energetica di molti processi fisiologici [20]. Da studi sull'uomo emerge che l'alterazione del rilascio dal tessuto adiposo di tali molecole bioattive, chiamate adipochine, è correlata a insorgenza di insulino-resistenza, sindromi metaboliche, patologia cardiovascolare e incremento di morbilità e mortalità (vedi grafico 1). Molte adipochine esercitano infatti effetti pro-infiammatori e pro-aterogeni come leptina, resistina, interleuchin-6 (IL-6),  $TNF-\alpha$ , *monocyte chemoattractant protein-1* (MCP-1), visfatina e RBP-4.

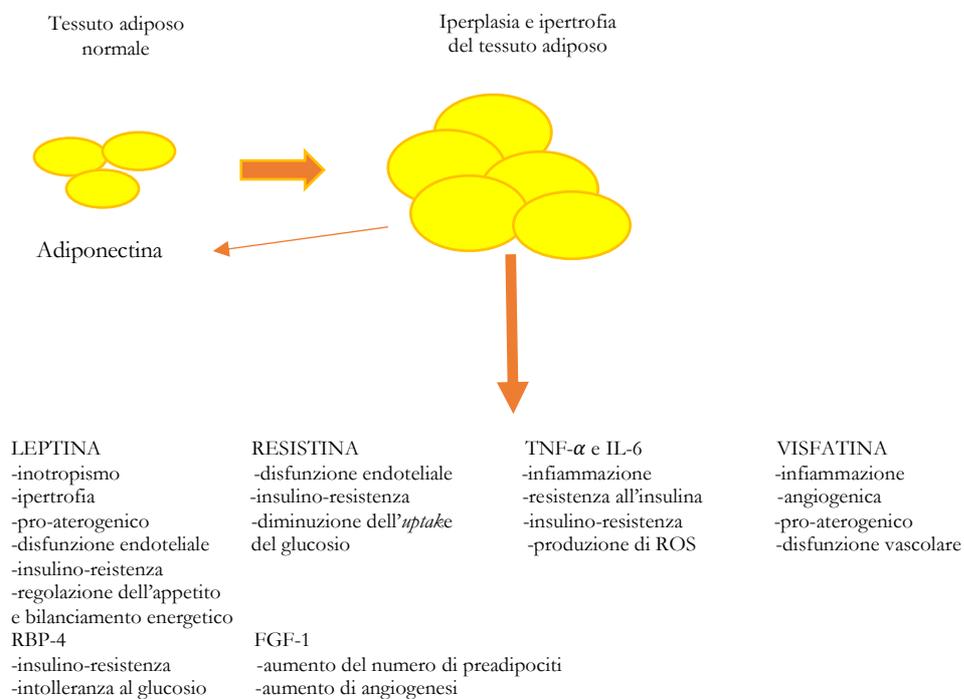


Grafico 1

Peptide prodotti dal tessuto adiposo e loro funzioni modificato da [30]

L'infiammazione sterile, ovvero l'infiammazione presente in assenza di un noto e identificabile agente infettivo, è una caratteristica dell'invecchiamento del tessuto adiposo, il quale contribuisce in larga percentuale all'infiammazione cronica sistemica riscontrata in tale fase della vita adulta [1]. Una serie di sostanze e/o stimoli endogeni, tra cui l'eccesso di elementi nutrizionali come gli acidi grassi o prodotti del catabolismo

cellulare, possono essere la causa dell'infiammazione nel tessuto adiposo durante l'invecchiamento. [31].

Le citochine e le chemochine secrete dal tessuto adiposo giocano un ruolo fondamentale nel reclutamento delle cellule del sistema immunitario: i macrofagi presenti, definiti *adipose tissue macrophage* (ATM), rappresentano una fonte importante di IL-6 la cui produzione aumenta con l'invecchiamento [20]. Il numero di macrofagi ATM aumenta nel tessuto adiposo sottocutaneo attorno ai 30-35 anni di età per poi rimanere stabile durante l'invecchiamento [32] ma ciò che si diversifica con l'invecchiamento è il rapporto tra macrofagi proinfiammatori M1 e antinfiammatori M2. È stato dimostrato che lo sbilanciamento tra i sottotipi di macrofagi regola l'infiammazione locale del tessuto adiposo: si assiste infatti ad una diminuzione dei macrofagi M2 locali [33]. Tale fenomeno è stato correlato a una diminuzione dell'espressione di PPAR- $\gamma$  a livello locale. Durante l'invecchiamento nei topi, la popolazione di cellule T, in particolare le cellule T regolatorie (*Tregs*), producono alti livelli di segnali proinfiammatori come ad esempio interferone- $\gamma$  e granzima B, proteasi citotossica [34].

Alcuni studi hanno dimostrato anche che le cellule MAD esercitano un ruolo importante nell'insorgenza dell'infiammazione a livello del tessuto adiposo. Studi hanno dimostrato che le citochine proinfiammatorie e le chemochine sono espresse principalmente da preadipociti rispetto ad adipociti. Chung e colleghi riportano che preadipociti umani stimolati con lipopolissacaride (LPS) esprimono alti livelli di citochine pro-infiammatorie (IL-6, TNF- $\alpha$  e IL-1 $\beta$ ) e chemochine (IL-8; *interleuchin-8* e MCP-1). Il segnale è mediato dall'attivazione del fattore di trascrizione NF $\kappa$ B e da MAPK. Co-culture di preadipociti e adipociti differenziati a diversi stati di maturazione, comportano la diminuzione dell'espressione del fattore adipogenico PPAR- $\gamma$  e dell'*uptake* del glucosio [35].

Tale esperimento pilota suggerisce che i preadipociti stressati iniziano il processo infiammatorio richiamando i macrofagi in sede adiposa conferendo disfunzionalità metabolica al tessuto che diviene insulino-resistente [35].

I *toll-like receptors* (TLR) sono una famiglia di recettori fondamentali per la risposta innata contro patogeni esterni e microorganismi la cui attivazione comporta l'espressione di targets infiammatori. Il TLR4 è costitutivamente espresso nei preadipociti e negli adipociti; in contrasto, il TLR2 è indotto solo nei preadipociti in

seguito a stimolo con LPS [36]. La stimolazione dei TLRs inizia una cascata di segnali intracellulari che comportano l'attivazione di NF $\kappa$ B che, fungendo da fattore di trascrizione, attiva protein-kinasi specifiche e citochine infiammatorie. Nel tessuto adiposo, gli acidi grassi saturi interagiscono con TLR4 presenti nei macrofagi dando inizio alla cascata infiammatoria [37].

Preadipociti isolati da tessuto adiposo sottocutaneo da pazienti giovani e da pazienti anziani mostrano una differente risposta alla differenziazione ed è stata stabilita una correlazione tra tale capacità e la concentrazione di sTNFR2 (*tumor necrosis factor receptor 2*) nel plasma [38].

L'infiammazione del tessuto adiposo è stata recentemente relazionata anche allo stress del reticolo endoplasmatico (RE) delle cellule; in particolare marcatori come BIP, CHOP, phospho-IRE1- $\alpha$  e XBP-1 sono elevati nel tessuto adiposo di topi vecchi rispetto al tessuto proveniente da topi giovani. Tale condizione riflette una maggiore infiammazione che viene alleviata con l'uso di molecole chimiche definite chaperoni molecolari, come ad esempio *chaperone 4-phenyle-butyric acid*, che comporta la diminuzione dell'espressione di IL-6 e MCP-1 da parte delle cellule stromali e di TNF- $\alpha$  dai macrofagi residenti nel tessuto adiposo di topi vecchi e giovani [39]. Successivamente, lo stesso gruppo dimostra che l'infiammazione del tessuto adiposo invecchiato è innescata anche da una autofagia aberrante che comporta la presenza di aggregati proteici dannosi e organelli disfunzionali nelle cellule: cellule della frazione stromale trattate con taspigargina, induttore di stress del reticolo endoplasmatico, mostrano un incremento di fattori correlati all'autofagia. Il trattamento con bafilomicina A1 (baf), una ATPasi di tipo H che induce autofagia, comporta un aumento dell'espressione di CHOP in cellule 3T3-L1[40]. Cellule SVF invecchiate non solo mostrano un'autofagia aberrante ma un aumento del livello di IL-6 e MCP-1. Tali risultati dimostrano una relazione tra l'autofagia cellulare e il processo di invecchiamento [40].

## 1.5 Invecchiamento e stress ossidativo

Le specie reattive dell'ossigeno (ROS) sono una serie di intermedi metabolici prodotti durante il metabolismo dell'ossigeno nelle cellule. I ROS sono suddivisibili in due

categorie principali: i radicali liberi, come il superossido ( $O_2^{\bullet-}$ ) e il radicale ossidrilico ( $OH^{\bullet}$ ), e molecole non radicali, come il perossido d'idrogeno ( $H_2O_2$ ) [41]. La presenza dei radicali liberi negli organismi viventi comporta conseguenze negative, come il danneggiamento diretto o indiretto del DNA cellulare, la modificazione strutturale delle proteine e dei lipidi [42]. Tutti gli organismi aerobi posseggono meccanismi per contrastare gli effetti della produzione fisiologica di radicali dell'ossigeno ovvero enzimi antiossidanti come la superossido-dismutasi (SOD), la catalasi (CAT) e il glutatione-perossidasi (GPx).

In condizioni patologiche, l'incremento dello stress ossidativo comporta l'attivazione di fattori di trascrizione come NF $\kappa$ B, STAT-3 e AP-1 che orchestrano l'inizio e l'amplificazione della cascata infiammatoria [43][44]. Studi recenti hanno dimostrato che l'induzione di stress ossidativo in 3T3-L1 comporta l'attivazione di MCP-1 e RANTES. Inoltre, modelli di adipociti *in vitro* stimolati con  $H_2O_2$  mostrano una ridotta produzione di GLUT-4 (*glucose transporter*), gene che concorre al mantenimento dell'insulino-sensibilità nella cellula [45]. Lo stesso gruppo ha dimostrato che l'esposizione di adipociti differenziati a  $H_2O_2$  comporta una mancata traslocazione della proteina GLUT4 dal citoplasma alla membrana [46].

È stato dimostrato il trattamento cronico con  $H_2O_2$  ad adipociti 3T3-L1 comporta un'alterazione dell'omeostasi cellulare e l'instaurarsi di insulino resistenza [47].

Un recentissimo lavoro mostra come il trattamento con  $H_2O_2$  in 3T3-L1 induca senescenza cellulare guidata dall'aumento del fattore di trascrizione NF $\kappa$ B seguito dall'aumento dell'espressione di geni SASP (IL-6, MCP-1, TNF- $\alpha$ ). Inoltre, la morfologia delle cellule subisce un aumento nel diametro [48].

## **1.6 Senescenza cellulare e fenotipo SASP (*senescence-associated secretory phenotype*)**

Viene definita senescenza cellulare l'arresto irreversibile della progressione cellulare. Tale fenomeno può avvenire o per senescenza replicativa o in risposta a determinati stress. La senescenza replicativa si verifica dopo un determinato numero di divisione

mitotiche mentre la senescenza indotta da stress avviene durante l'esposizione ad alti livelli di radicali dell'ossigeno, irradiazione e insulti infiammatori [1][49].

Le caratteristiche delle cellule senescenti sono la forma allargata e appiattita, positività al saggio di  $\beta$ -galattosidasi ( $\beta$ -gal), l'espressione di marcatori di senescenza come *cyclin-dependent kinase inhibitor* (cdkn1a o P21) e *cyclin dependent kinase inhibitor 2A* (cdkn2a o p16), la secrezione di citochine, chemochine e metallo-proteinasi [50]. La produzione di citochine, di chemochine e la modificazione della matrice extra-cellulare da parte di cellule senescenti porta alla progressiva morte di cellule limitrofe rimodellando il tessuto e richiamando cellule del sistema immunitario. La senescenza cellulare necessita di tempi lunghi per essere completamente stabilita e comporta un *loop* autocrino che coinvolge i ROS, IL-6, il TGF- $\beta$  e altri segnali [51][52]. Con l'avanzare dell'età, si assiste all'aumentare del numero di cellule senescenti in molti distretti corporei tra cui la pelle, il fegato, i reni, il sistema cardiovascolare e il tessuto adiposo [53] e la composizione del fenotipo secretorio varia in base al tipo cellulare, al tipo di tessuto e all'induttore iniziale di senescenza.

Altre caratteristiche delle cellule senescenti sono la positività al  *$\gamma$ -phosphorylated histone-2AX* ( $\gamma$  H2AX) [53] a livello dell'etero-cromatina rilevata col *4',6-diamidino-2-phenylindole* (DAPI) e l'accorciamento dei telomeri [55].

L'accorciamento dei telomeri nel tessuto adiposo è associato significativamente all'ipertrofia degli adipociti, a bassi livelli di adiponectina circolante e all'alterato metabolismo del glucosio e dei lipidi. Questa associazione è stata dimostrata sia nei pazienti obesi che in pazienti affetti da diabete di tipo 2 [56].

Sebbene le cellule senescenti siano resistenti all'apoptosi, l'attivazione del sistema immunitario contribuisce alla rimozione di tali cellule ma nell'invecchiamento la risposta mediata dai macrofagi è compromessa e ciò contribuisce potenzialmente a un maggior accumulo di cellule senescenti [57].

È stato recentemente dimostrato che preadipociti isolati dalla frazione stromale di grasso viscerale di pazienti anziani, mostrano positività per marcatori di senescenza ( $\beta$ -gal e P21) e fenotipo SASP rispetto a preadipociti isolati da pazienti giovani [58]. Inoltre, tale fenotipo viene revertito utilizzando inibitori della via JAK/STAT come ad esempio inibitori di JAK o siRNA [58]. Il medium condizionato di tali cellule comporta l'espressione di MCP-1 in preadipociti provenienti da individui giovani ed esprimenti bassi livelli di P-21 [58]. Inoltre, in esperimenti di co-coltura, è stato dimostrato che,

cellule progenitrici provenienti da tessuto adiposo senescente, hanno un effetto negativo anche sulle cellule adipose non senescenti con riduzione della capacità di formare gocce lipidiche e insulino-resistenza [58]. La somministrazione di inibitori della via di JAK in topi vecchi comporta la riduzione dell'infiammazione sistemica e aumenta le funzioni fisiche [58].

Studi successivi hanno dimostrato che preadipociti invecchiati secernano activina A, la quale inibisce l'adipogenesi in progenitori non senescenti. La rimozione di activina A, comporta il parziale accumulo lipidico delle cellule progenitrici esposte a cellule senescenti e l'aumento di marcatori adipogenici [59]. La rimozione *in vivo* di cellule senescenti secernenti activina A attraverso approcci genetici, preserva la funzionalità del tessuto adiposo, previene la redistribuzione ectopica del tessuto adiposo tipica dell'invecchiamento e migliora i parametri metabolici a livello sistemico nei topi [59].

## 1.7 miRNA e tessuto adiposo

I microRNA (miRNA) sono piccoli RNA che regolano l'espressione di RNA messaggeri (mRNA) a livello post trascrizionale nella maggior parte dei tipi cellulari [60]. La struttura di tali miRNA è caratterizzata dalla presenza di 6-8 nucleotidi che permettono la complementarità con la sequenza in 3'-UTR del mRNA target. Il legame permette il reclutamento del complesso *RNA-induced silencing complex* (RISC) che veicola la degradazione del mRNA target [61].

Negli ultimi decenni, è stata data molta attenzione al ruolo dei miRNA nei processi metabolici disfunzionali del tessuto adiposo murino ed umano in particolare al loro ruolo nell'adipogenesi [62] nel metabolismo lipidico [63], nell'insulino-resistenza [64] e nell'infiammazione [65]. Le cellule che costituiscono il tessuto adiposo possono rilasciare miRNA che esercitano un effetto in altri tessuti bersaglio con un meccanismo "simil-endocrino" [66].

Uno studio pilota ha evidenziato la correlazione inversa tra l'espressione di miR-92a e l'attività del tessuto adiposo bruno valutato con la tecnologia PET/CT in uno studio eseguito in 41 individui sani. Tale miRNA è presente anche negli esosomi presenti nel siero provenienti dagli stessi soggetti [67]. La possibilità di individuare i miRNA circolanti e relazionarli con l'attività del tessuto adiposo implica la possibilità di utilizzare tali molecole come *biomarkers* di patologie. Ad esempio, lo screening di

campioni di plasma provenienti da gruppi di bambini normopeso, sovrappeso e obesi, ha permesso di evidenziare la diversa espressione di miR-31-5p, miR-2355-5p e miR-206 in relazione al grado di obesità. In questo studio, la concentrazione plasmatica di miR-486-5p, miR-486-3p, miR-142-3p, miR-130b e miR-423-5p è stata associata al *body mass index* (BMI), alla distribuzione del grasso, all'insulino-resistenza, alla proteina C reattiva e ai lipidi circolanti di bambini seguiti per 3 anni. Questi risultati conferiscono un potenziale ruolo dei miRNA circolanti come *biomarkers* nella diagnosi di sindromi metaboliche nell'infanzia che si verifica con l'invecchiamento [68].

L'aumento della stocasticità dell'espressione genica durante l'invecchiamento avviene in molti tessuti e questo potrebbe essere la causa della perdita della capacità di fare fronte ai cambiamenti e dell'abilità di rispondere a stimoli esterni [69].

L'espressione di DICER, complesso proteico coinvolto nel processamento dei miRNA, diminuisce durante l'invecchiamento nel tessuto adiposo di topo, nell'intestino di *C. elegans* e nei preadipociti umani [70]. Topi DICER *knockout* nel tessuto adiposo, che mostrano quindi una riduzione dell'espressione di tale proteina nel sottocutaneo, nel tessuto adiposo perigonadale e nel tessuto adiposo bruno sono lipodistrofici con una marcata diminuzione della massa di tessuto adiposo bianco, un aumento dell'infiammazione rispetto a topi *wild type* e insorgenza di insulino-resistenza [71]. Inoltre, preadipociti murini *knockdown* per DICER sviluppano senescenza prematura mentre la restrizione calorica, fenomeno noto per estendere la durata della vita nel topo, previene la down-regolazione di DICER [71].

Il processamento di miRNA specifici nel tessuto adiposo quindi, può rappresentare non solo un *biomarker*, ma anche un potenziale target per modulare il processo di invecchiamento e di alcune patologie età-correlate.

Il miR-155 viene descritto come miRNA multifunzionale poiché è stato associato a processi di regolazione del sistema immunitario come l'ematopoiesi [72], il cancro [73] e la differenziazione delle cellule B e T [74]. Il miR-155 è stato recentemente associato all'infiammazione mediata da stress ossidativo in cellule endoteliali in cui l'attivazione di miR-155-5p mediata dal TNF- $\alpha$  gioca un ruolo fondamentale [75].

Nel contesto del tessuto adiposo disfunzionale, la letteratura indica che adipociti murini *in vitro* stimolati con TNF- $\alpha$  aumentano non solo i livelli di NF $\kappa$ B ma anche di miR-155 [76]. Adipociti murini coltivati *in vitro* e stimolati con acido palmitico sono associati ad un aumento di espressione di miR-155-5p [77].

Uno studio recente ha inoltre dimostrato che topi *knock-out* per il miR-155-5p non sviluppano obesità in condizioni di dieta ipercalorica mantenendo la risposta fisiologica all'insulina e una ridotta infiammazione sistemica [78].

## 1.8 Sirtuine e invecchiamento

Le sirtuine (SIRT) costituiscono una famiglia di proteine ad attività de-acetilasi NAD<sup>+</sup> dipendenti in grado di deacetilare proteine istoniche e diversi fattori trascrizionali [79]. Nel 1999, Kaeberlein e colleghi osservarono che l'over-espressione del gene *silent information regulator 2* (Sir2) nel lievito aumentava la longevità dell'innesto di lievito [80]. Questo studio ha permesso di ipotizzare che il gene Sir2 fosse un fattore di longevità universale. Successivamente, è stato dimostrato che l'over-espressione dell'omologo di Sir2 in *C. elegans* e *Drosophila* estendeva la longevità anche in questi organismi [81][82]. Inoltre, è stato documentato che l'utilizzo del resveratrolo, un polifenolo presente nel vino rosso, può attivare Sir2 e prolungare la longevità nel lievito [83].

È stato dimostrato che SIRT1 costituisce sia un regolatore cruciale del metabolismo energetico e di funzioni fondamentali per la sopravvivenza cellulare, controllando la biogenesi mitocondriale e i substrati metabolici durante i processi di ossidazione [84]. Essendo attivato da NAD<sup>+</sup>, la cui concentrazione diminuisce in molti tessuti durante l'invecchiamento [85][86] è ritenuto un sensore del metabolismo omeostatico. Numerosi lavori della recente letteratura mostrano che la mancata regolazione di SIRT1 è associata a molte patologie correlate all'invecchiamento, a sindromi metaboliche, a patologie cardiovascolari e neurodegenerative.

Ad oggi, SIRT1 non è più considerato come un elisir di lunga vita ma piuttosto come regolatore fondamentale di funzioni metaboliche in grado di contribuire in maniera importante allo stato di salute durante l'invecchiamento [87]. Per questo motivo, SIRT1 è stato proposto come potenziale target terapeutico per il trattamento delle patologie età correlate [88].

Nel tessuto adiposo bianco, SIRT1 è in grado di regolare l'adipogenesi attraverso la de-acetilazione di PGC-1 [89], la lipolisi e il metabolismo cellulare [90][91]. L'over-espressione di SIRT1 nel tessuto adiposo di topo previene l'insorgenza dell'insulino-resistenza in topi vecchi [90] e topi *knock-out* per SIRT1 nel tessuto adiposo sviluppano

intolleranza al glucosio e insulino-resistenza in condizioni di dieta ipercalorica [91]. Questo indica che la funzionalità di SIRT1 nel tessuto adiposo è un fattore chiave per il mantenimento del bilancio energetico e della sensibilità all'insulina.

La capacità di SIRT1 di mantenere le proprietà fisiologiche del tessuto adiposo potrebbe essere la conseguenza delle sue capacità antinfiammatorie infatti, è stato dimostrato che la delezione di SIRT1 in adipociti *in vitro*, comporta l'inibizione della traslocazione di GLUT4 in risposta all'insulina e l'aumento della fosforilazione di JNK con conseguente richiamo di macrofagi [92].

Studi clinici hanno dimostrato l'esistenza di una correlazione tra il decremento dell'espressione di SIRT1 e di adiponectina e alterata tolleranza glucidica sia in donne con diabete di tipo 2 [93] sia in topi nutriti con dieta ipercalorica [94].

Uno studio recentissimo condotto su biopsie di tessuto adiposo raccolto da pazienti normopeso e pazienti obesi ha mostrato una correlazione tra la diminuzione dell'espressione di SIRT1 e di PPAR- $\gamma$  e l'aumento di BMI proponendo tale proteina come *biomarker* dell'obesità [95].

Rajamani e colleghi hanno mostrato che cellule staminali isolate dal tessuto adiposo (*adipose-derived stem cell*, ADSC) rese senescenti con l'acqua ossigenata presentano una diminuzione della proteina SIRT1 e l'insorgenza del fenotipo SASP [96].

## 1.9 Possibili modulatori della senescenza

Gli interventi sinora oggetti di studio per il loro potenziale incremento della longevità, tra cui l'identificazione di mutazioni di geni specifici (per esempio l'asse GH/IGF-1), la dieta (restrizione calorica) e interventi farmacologici (metformina, 17- $\alpha$ -estradiolo) possono direttamente o indirettamente avere come target il tessuto adiposo. Per esempio, si è visto che topi geneticamente resistenti all'ormone della crescita sono più longevi rispetto a topi *wild type* e presentano minor deposizione ectopica lipidica. I preadipociti di tali topi coltivati ex-vivo sono meno senescenti rispetto alle cellule *wild type* e presentano una funzione metabolica maggiore [97]. La restrizione calorica, il cui effetto sulla longevità è stato dimostrato a partire dalla *Drosophila* fino ai primati, agisce parzialmente attraverso la riduzione della massa del tessuto adiposo e a livello molecolare incrementando l'autofagia e i meccanismi di riparazione del DNA riducendo la senescenza cellulare [98]. Il 17- $\alpha$ -estradiolo, che è stato dimostrato

indurre maggior longevità in topi maschi, porta a diminuzione della massa di tessuto adiposo viscerale riducendone l'infiammazione [99]. Anche la metformina è stata associata ad un aumento della vita nei roditori, riducendo la massa di tessuto adiposo [100]. L'effetto di metformina nell'uomo è stato recentemente dimostrato attraverso uno studio in cui l'utilizzo di tale farmaco in pazienti diabetici sembra associarsi ad un incremento della longevità rispetto a controlli non diabetici; tali risultati devono comunque essere interpretati sulla base di una percentuale di soggetti-controllo in cui l'insorgenza di diabete di tipo II può essere insorta prima della manifestazione dei sintomi ovvero a diagnosi compiuta [101][102].

La ricerca scientifica degli ultimi decenni ha mostrato crescente interesse all'identificazione di nuovi approcci terapeutici per il trattamento delle malattie legate all'età. In tal senso, una questione importante verte sulla possibilità di individuare degli interventi in grado di prevenire i danni causati dall'invecchiamento. La ridotta performance fisica e l'incapacità di rispondere agli stress rappresentano tra le principali cause alla base di numerosi processi patologici legati all'invecchiamento. I meccanismi fisiopatologici tissutali e cellulari alla base di tali alterazione età-correlate non è stata completamente chiarita. Attualmente vi è grande interesse circa l'identificazione di strategie in grado di modulare i meccanismi che implicano la senescenza cellulare, verosimilmente alla base di tanti processi patologici età-correlati.

Molteplici studi sperimentali hanno dimostrato la capacità di alcune sostanze naturali di esercitare il loro effetto sui meccanismi cellulari implicati nella senescenza, essendo capaci di prevenirla, indurla o addirittura di far trasformare cellule senescenti in cellule normali, in relazione al composto utilizzato, alla sua concentrazione e al tipo cellulare studiato.

Rispetto a tutti gli altri composti riportati dalla letteratura corrente come potenziali modulatori della senescenza cellulare, la quercetina e i tocotrienoli sembrano essere tra i fitocomposti che contemporaneamente soddisfano le seguenti condizioni: possono indurre apoptosi in cellule tumorali inducendone la senescenza o il blocco del ciclo cellulare, possono ritardare la senescenza in cellule primarie normali e possono revertire l'attivazione di *pathway* attivati in cellule senescenti e pre-senescenti.

### 1.9.1 Flavonoidi, la quercetina.

I flavonoidi sono composti fenolici isolati da molte piante vascolarizzate. Nelle piante agiscono come antiossidanti, antimicrobici, fotorecettori, come attrattori visivi, data la loro colorazione [103].

Estratti contenenti flavonoidi vengono usati come integratori e coadiuvanti nel trattamento di malattie infiammatorie e per il cancro [104][105].

La struttura chimica dei flavonoidi è data dall'unione di unità polichetidica (3 x 2 AcCoA) ed una unità fenil propanoica: si genera un sistema tricyclico, basato su un anello benzilico (A), sostituito con gruppi fenolici presenti nelle posizioni 5 e 7, un secondo anello di tipo piranosico (C) fuso con il precedente e variamente sostituito, un terzo anello (B) di tipo benzilico spesso sostituito nelle posizioni 3' e 4' e legato all'anello centrale in posizione 2 (grafico 2).

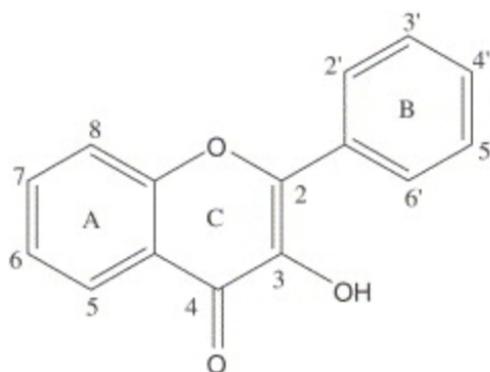


Grafico 2

Struttura base dei Flavonoidi

La diversa funzionalizzazione dell'anello centrale (C) genera le varie classificazioni e le relative denominazioni: catechine, flavani, flavoni, antociani. Nel caso in cui il radicale benzilico B sia legato in posizione 3, si ottengono i corrispondenti isoflavonoidi. All'aumentare della coniugazione corrisponde un incremento della colorazione, secondo la sequenza flavani (incolori), flavoni (gialli), antociani (rossi/violacei).

Tuttora i flavonoidi sono oggetto di studi volti a identificare i meccanismi molecolari responsabili della loro attività biologica. L'interesse è principalmente rivolto all'analisi

dell'attività antiossidante dovuta alla capacità dei flavonoidi di ridurre la formazione di radicali liberi. Sono stati fatti numerosi studi *in vitro* in cui si è stabilita una relazione tra struttura e attività antiossidante [106].

Recentemente si è visto che i flavonoidi possono esercitare anche una attività modulatoria in modo indipendente dalla classica capacità antiossidante, attraverso l'azione selettiva su diverse molecole come protein-chinasi e lipid-chinasi appartenenti a varie cascate di segnale come ad esempio: fosfoinositol 3- chinasi (PI3-chinasi), Akt/PKB, protein chinasi C (PKC) e MAP chinasi. [107].

L'inibizione o l'attivazione di queste vie possono interferire con la funzionalità cellulare alterando lo stato di fosforilazione di diverse molecole target e/o modulando l'espressione genica. Infatti, l'azione selettiva su alcune di queste vie può avere un effetto positivo nel trattamento di cancro e malattie correlate all'infiammazione e neurodegenerazione.

Tra i vari polifenoli alcuni sono stati studiati per il loro effetto biologico sugli adipociti, in particolare quercetina, epicatechina ed epigallocatechina che presentano una forte capacità antiossidante.

Recentemente maggiore attenzione è focalizzata all'analisi della biodisponibilità e del metabolismo dei polifenoli, fattori cruciali per stabilire la loro capacità di raggiungere la sede di interesse ove esplicare la loro attività biologica [108]. Parallelamente numerosi studi riportano un'azione dei polifenoli sul tessuto adiposo, principalmente sulla differenziazione dei preadipociti e la modulazione della produzione di citochine pro-infiammatorie da parte di adipociti maturi [109].

Nell'ambito dello studio di composti in grado di interferire con i *pathway* metabolici dell'invecchiamento del tessuto adiposo troviamo in particolare la quercetina (3, 3', 4', 5, 7-pentahydroxyl-flavone). Studi *in vitro* hanno dimostrato la capacità di quercetina di ritardare la senescenza in diversi modelli cellulari: fibroblasti senescenti trattati con quercetina per 5 giorni consecutivi sono stati in grado di riprendere lo stato proliferativo rispetto alle colture di controllo [110]. Il trattamento con quercetina può agire direttamente sulle vie di trasduzione del segnale che coinvolgono Nrf2/keap1, che rappresentano le principali vie intracellulari per la risposta allo stress, associate ai processi di infiammazione e carcinogenesi. Inoltre, ci sono molti studi che propongono l'uso di quercetina anche per indurre forme di morte apoptotica e non-apoptotica in cellule tumorali. L'attività antitumorale è stata dimostrata nel *range* 1-50  $\mu\text{M}$  in una

moltitudine di modelli cellulari di cancro (glioma, osteosarcoma, etc.) [111][112]. In tutti gli studi quercetina si è dimostrata in grado di interferire con vie intracellulari che sono importanti sia per la sopravvivenza del cancro che per la sua progressione, quali le vie di regolazione del ciclo cellulare, l'interazione con i siti di legame dei recettori degli estrogeni di tipo II e l'inibizione della tirosin-chinasi [113].

Le differenti attività esercitate da quercetina a livello cellulare includono anche gli effetti regolatori che esercita sui miRNA [114]: è stata dimostrata la capacità di tale molecola di modulare 48 miRNA coinvolti nella metastasi (miR-146a/b, 503 and 194), nella proliferazione cellulare (miR-125a, 142–3p, 155, let-7 family, 302c, 195, 26a, 503 and 215) e nell'induzione di apoptosi (miR-125a, 27a, 605, 26b, let-7g, 34a, 491 and 16) [115][116][117].

Inoltre, è nota la sua azione antinfiammatoria in macrofagi murini stimolati con LPS con riduzione dell'attivazione di NF $\kappa$ B e dell'espressione di miR-155-5p [118].

La rimozione delle cellule senescenti con tali composti potrebbe rappresentare una strategia promettente per prevenire o diminuire l'impatto di diverse malattie età-correlate, favorendo quello che viene comunemente definito *successful aging* ovvero invecchiamento di successo. Tuttavia, prima che si possano aprire nuovi scenari nella medicina preventiva anti-aging è necessario che queste ipotesi vengano verificate e testate con appropriati modelli sperimentali.

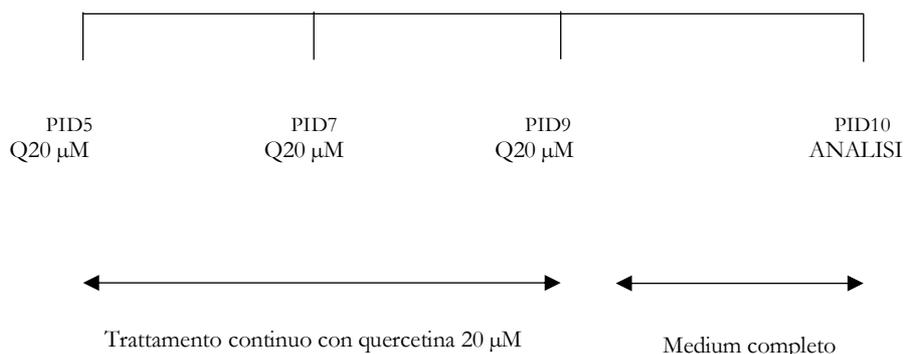
## 2. MATERIALI E METODI

### 2.1 Colture cellulari

Cellule 3T3-L1 (ECACC Sigma-Aldrich) sono state coltivate in incubatore a 37°C in 5% CO<sub>2</sub> con terreno DMEM/GlutaMAX (Gibco) addizionato con FBS al 10% e soluzione di antibiotico e antimicotico (Sigma). Ad una confluenza dell'80%, le cellule sono state staccate con tripsina/EDTA (Gibco) e sedimentate in piastre da 6 *wells* nel numero di 3000 cellule/cm<sup>2</sup> (Becton Dickinson) contenenti vetrini sterili (Menzel-glaser Thermo Scientific). Dopo due giorni di confluenza, le cellule sono state indotte con medium di differenziamento costituito da DMEM/F12 contenente 10% di FBS, 1% di antibiotico/antimicotico, 0.2 mM di IBMX, 10 µM di rosiglitazone, 1 µM di dexamethasone e 1,72 µM insulin mantenuto per 3 giorni. Dopo 3 giorni di induzione (PID3; *post induction day*), il terreno è stato sostituito con terreno costituito da DMEM/F12 arricchito di FBS al 10%, 1% di soluzione di antibiotico/antimicotico e 1,72 µM di insulina (Sigma) fino a PID5. A partire da PID5 le cellule sono state mantenute con terreno DMEM/F12 arricchito di FBS al 10% e 1% di soluzione di antibiotico/antimicotico cambiato a giorni alterni. Gli adipociti sono considerati maturi a pid10.

## 2.2 Trattamento con quercetina in adipociti.

Gli adipociti sono stati trattati inizialmente con quercetina (CAS-N: 6151-25-3) 20  $\mu$ M ogni 48 ore per valutare l'attività antiossidante come da schema 1. Le cellule sono state analizzate a pid10.



Schema 1

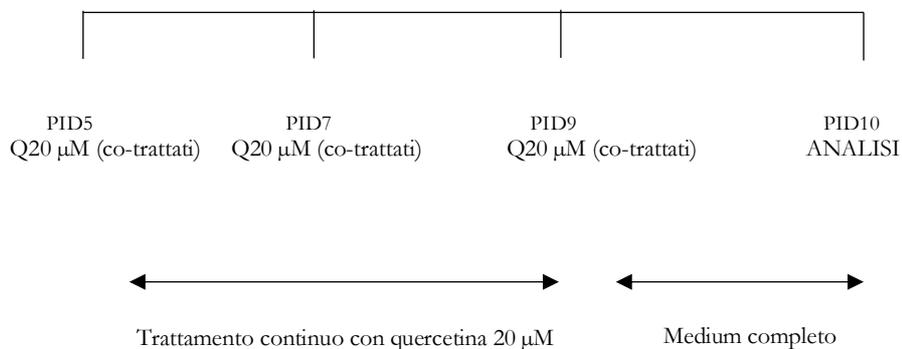
Trattamento con quercetina 20  $\mu$ M in adipociti maturi.

## 2.3 Stimolazione con perossido di idrogeno e trattamento con quercetina in adipociti

Gli adipociti a partire da pid5 sono stati stimolati con perossido di idrogeno (30%w/w in H<sub>2</sub>O; SIGMA) (150  $\mu$ M) per 3 ore per tre giorni consecutivi. Alla fine delle tre ore, ciascun pozzetto è stato lavato molto delicatamente due volte con PBS e addizionato di terreno completo.

Nei campioni co-trattati, è stata aggiunta quercetina 20  $\mu$ M finale disciolta in DMSO a partire dal primo trattamento con perossido di idrogeno. Alla fine di ciascun trattamento con perossido di idrogeno, dopo i lavaggi con PBS, in tali pozzetti è stata aggiunta quercetina 20  $\mu$ M. Il giorno dopo, è stato aggiunto perossido di idrogeno. Lo schema è stato seguito per tre giorni. Le cellule quindi sono state trattate con quercetina 20  $\mu$ M per 72 ore.

Le cellule sono state raccolte per le analisi a pid10 come mostrato in schema 2.



Schema 2

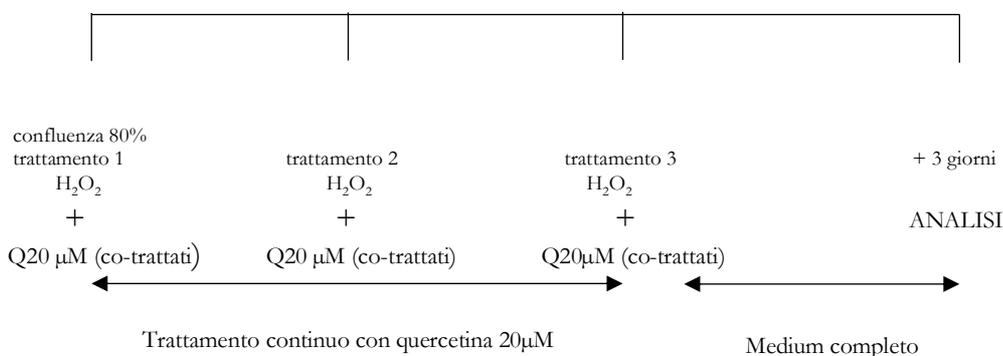
Trattamenti con idrossido di idrogeno e quercetina in adipociti.

#### 2.4 Stimolazione con perossido di idrogeno e trattamento con quercetina in preadipociti.

I preadipociti, una volta raggiunto l'80% di confluenza, sono stati stimolati con perossido di idrogeno (150  $\mu\text{M}$ ) per 3 ore per tre giorni consecutivi. Alla fine delle tre ore, ciascun pozzetto è stato lavato molto delicatamente due volte con PBS e addizionato di terreno completo.

Nei co-trattati, è stata aggiunta quercetina 20  $\mu\text{M}$  finale disciolta in DMSO a partire dal primo trattamento con perossido di idrogeno. Alla fine di ciascun trattamento con perossido di idrogeno, dopo i lavaggi con PBS, in tali pozzetti è stata aggiunta quercetina 20  $\mu\text{M}$ . Il giorno dopo, è stato aggiunto perossido di idrogeno. Lo schema è stato seguito per tre giorni. Le cellule quindi sono state trattate con quercetina 20  $\mu\text{M}$  per 72 ore.

Le cellule sono state raccolte per le analisi dopo tre giorni alla fine del terzo trattamento come mostrato in schema 3.



Schema 3

T Trattamenti con idrossido di idrogeno e quercetina in preadipociti.

## 2.5 Morfologia degli adipociti

Dopo aver lavato i pozzetti con PBS 0,1 M a pH 7,4 le cellule sono state fissate con formalina al 10% per 10 minuti, lavate due volte con acqua bi-distillata e colorate con soluzione pronta di Oil Red O filtrata (Bio-Optica) per 20 minuti a temperatura ambiente. Le cellule sono state lavate due volte con acqua bi-distillata e colorate con soluzione di ematosilina di Mayer (Mayer's Hematoxylin, Bio-Optica,) per 1 minuto a temperatura ambiente e lavate con acqua bi-distillata. I vetrini sono stati montati con montante acquoso (Aqueous Mount Quick Medium, Bio-Optica).

Le cellule sono state osservate al microscopio EVOS FL Auto Cell Imaging System (Thermofisher Scientific, USA) a 200x e 400x di ingrandimento. Sono state quindi acquisite 10 immagini a 200x di ingrandimento scelte random in cui sono state contate le cellule espresse su  $mm^2$ ; inoltre è stata calcolata l'area di 50 cellule scelte random. Per calcolare il numero e l'area delle cellule è stato utilizzato il software ImageJ versione 1.51n (NIH, Bethesda).

## 2.6 Quantificazione area dei preadipociti

Mediante software ImageJ versione 1.51n (NIH, Bethesda, MD, USA) è stata misurata l'area di 100 preadipociti direttamente nei pozzetti delle colture cellulari su immagini acquisite a 100x di ingrandimento mediante microscopio Leica modello DMi1 (Leica). I risultati sono stati espressi come media  $\pm$  DS.

## 2.7 Saggio di senescenza dell'attività $\beta$ -galattosidasi

Le cellule senescenti sono state individuate utilizzando il *Senescence Detection Kit* (Abcam, Cambridge). Brevemente, le cellule sono state coltivate in vetrini posti su piastre da 6 *wells* e dopo il periodo di trattamento specifico, le cellule sono state lavate delicatamente con 2 ml di PBS per ciascun vetrino e fissate con 1 ml di soluzione di fissaggio per 10 minuti a temperatura ambiente. Successivamente, le cellule sono state lavate con 2 ml di PBS. È stata aggiunta la soluzione di beta-galattosidasi ai vetrini. Per la visualizzazione del colore azzurro, i preadipociti sono stati mantenuti overnight a 37 °C mentre gli adipociti sono stati mantenuti per 5 ore alle stesse condizioni di temperatura. In entrambi i casi, è stato necessario proteggere le piastre dalla luce e per eliminare gli effetti della CO<sub>2</sub> all'interno dell'incubatore, le piastre sono state chiuse con parafilm.

Le cellule sono state lavate con 1 ml di PBS e contro-colorate con *nuclear fast red* per la colorazione dei nuclei. Successivamente, le cellule sono state osservate al microscopio EVOS FL Auto Cell Imaging System (ThermoFisher Scientific, USA) a 200x di ingrandimento ed è stata calcolata la percentuale di cellule beta-galattosidasi positive sul totale delle cellule. Le immagini sono state analizzate con il software ImageJ versione 1.51n (NIH, Bethesda, MD, USA) e sono stati considerati 10 campi rappresentativi.

## 2.8 Analisi dei radicali dell'ossigeno

I radicali dell'ossigeno intracellulari sono stati individuati con *The Image-iT Live Green Reactive Oxygen Species (ROS) Detection Kit* (Thermo Fisher Scientific, USA). Dopo aver eseguito i trattamenti imposti dalle condizioni sperimentali, le cellule sono state lavate una volta con 1 ml di terreno HBSS/Ca/Mg preriscaldato e incubate con 25  $\mu$ M

carboxy- H<sub>2</sub>DCFDA per 30 minuti a 37°C lontano dalla luce. A 5 minuti dal termine dell'incubazione è stato aggiunto Hoechst 33342 alla concentrazione finale di 1 µM. Successivamente, le cellule sono state lavate gentilmente 3 volte con terreno HBSS/Ca/Mg e i vetrini montati con *Antifade Mounting Medium - Prolong Fluorescence* (Boster Biological Technology, Valley Ave in Pleasanton). Le cellule sono state osservate al microscopio EVOS FL *Auto Cell Imaging System* (Thermofisher Scientific, USA) a 200x e 400x di ingrandimento. Le immagini sono state analizzate con il software ImageJ versione 1.51n (NIH, Bethesda, MD, USA): la media dell'intensità della fluorescenza è stata calcolata su 50 cellule positive per i ROS a 200x di ingrandimento. Il background è stato ottenuto misurando l'intensità della fluorescenza nelle regioni al di fuori delle cellule. La fluorescenza cellulare totale è stata calcolata sottraendo il background dalla densità integrata (CTCF= ID- background) [119].

## **2.9 Estrazione di RNA, retrotrascrizione ed espressione genica (Real-time PCR, RT-PCR)**

L'RNA totale è stato estratto mediante il kit *miRNeasy Mini Kit* (Qiagen) come da guida. Gli adipociti sono dapprima stati lisati mediante colonna Qiashredder (Qiagen). La reazione di retrotrascrizione del cDNA è stata effettuata utilizzando il kit First Strand cDNA Synthesis Kit (Origene) utilizzando il seguente protocollo: 5 minuti a 22°C, 30 minuti a 42 °C e 5 minuti a 85°C in un termociclatore Ep Gradient S thermal cycler (Eppendorf). La reazione di retrotrascrizione dei miRNA è stata eseguita mediante il kit *TaqMan MicroRNA Reverse Transcription Kit* utilizzando 10 ng di RNA totale e la sonda specifica per il miR-155-5p e per il normalizzatore U6 snRNA (Thermofisher Scientific) con il seguente protocollo: 30 minuti a 16°C, 30 minuti a 42°C e 5 minuti a 85 °C. La reazione di amplificazione degli mRNA è stata svolta col macchinario CFX96 Real-Time utilizzando la SsoAdvanced Universal SYBR Green Supermix (Bio-Rad), come da guida. Brevemente, la reazione di RT-PCR è stata eseguita in un volume totale di 20 µl amplificando 50 ng di cDNA per 40 cicli alle seguenti condizioni sperimentali: 5 secondi a 95 °C e 30 secondi a 60 °C. Le coppie di primers utilizzate sono state disegnate per l'amplificazione di un amplicone esone-esone di 150 bp.

IL-6 (FW- agacaaagccagagtccttca; RW- gagcattggaaattggggta)

MCP-1 (FW- aggtccctgtcatgcttctg; RW- gctgctggatcctcttctgt),

P-21 (FW- gtaggacacttcagggtttt; RW- ttgtcgtgtcttgactct),

ADIPOQ: (FW-ggagatgcaggctcttctgg-3'; RW-cgaatgggtacattgggaac),

PPAR $\alpha$  (FW-cataaagtccttcccgtga; RW- gaaactggcaccttgaaaa).

La reazione di amplificazione dei miRNA è stata svolta col macchinario CFX96 Real-Time utilizzando la TaqMan Universal PCR Master Mix (ThermoFisher Scientific), come da guida. Brevemente, la reazione di RT-PCR è stata eseguita in un volume totale di 20  $\mu$ l amplificando 0,5 ng di miRNA specificatamente retro-trascritto per 40 cicli alle seguenti condizioni sperimentali: 50 °C 2 minuti e 95°C 10 minuti per l'attivazione dell'enzima e a 95 °C per 15 secondi e 60°C per 1 minuto per 40 cicli.

Il livello di espressione degli mRNA è stato valutato utilizzando un gene controllo interno; per i preadipociti il gene GAPDH (FW-aactttggcattgtggaag; RW-acacattgggggtaggaaca) mentre per gli adipociti maturi è stato utilizzato il TBP (cat #10025636). L'espressione relativa è stata calcolata utilizzando la formula  $2^{-\Delta\Delta Ct}$ . Ciascuna analisi è stata condotta in duplicato.

## 2.10 Analisi delle proteine mediante Western Blot

Le proteine sono state estratte dai pellet cellulari utilizzando Pierce RIPA buffer (codice prodotto 89901, ThermoFisher) addizionato con il cocktail di inibitori di proteasi (complete, Roche Cat.No 11697498001). La quantificazione delle proteine totali è stata eseguita mediante il Pierce BCA Protein Assay (ref. 23225, ThermoFisher scientific). Una concentrazione complessiva di proteina pari a 25 ng per ciascun campione è stata caricata in gel-SDS al 7,5% di acrilamide. La corsa è stata eseguita alle seguenti condizioni: 100V per 90 minuti utilizzando il *running* buffer al 0,1% di SDS. Le proteine sono state blottate in membrana di PVDF (Immobilon P, Millipore, Bedford MA) a 100V costanti. Il filtro è stato incubato per 1 ora a temperatura ambiente, in una soluzione di bloccaggio (BSA (Albumin Bovim Serum, Sigma) 5%, Tris-HCl pH 7.5 10 mM, NaCl 100mM, Tween 20 0,1%). La membrana è stata poi incubata per tutta la notte a 4°C in agitazione, con un anticorpo primario monoclonale nella soluzione di bloccaggio. La membrana è stata lavata tre volte per 10 minuti in una soluzione contenente TBS addizionato a Tween 20 allo 0,1%. Il filtro è stato incubato per 1 ora in agitazione e a temperatura ambiente con l'anticorpo secondario coniugato con una perossidasi, diluito nella soluzione di bloccaggio. Quindi il filtro è stato

nuovamente lavato (3 volte per 10 minuti) dall'eccesso di anticorpo. Le bande sulla membrana sono state rilevate utilizzando la chemiluminescenza che si sviluppa in seguito alla reazione enzimatica della perossidasi in presenza di acqua ossigenata e luminolo. Come substrato è stato utilizzato il kit di rivelazione ECL (ECL Select™ western Blotting Detection Reagent GE healthcare) secondo le proporzioni raccomandate dal fornitore. I complessi antigene-anticorpo che hanno reagito con i substrati, sono stati rivelati mediante Bio-Rad ChemiDoc XRS. Gli anticorpi utilizzati sono: NFκB p65 (D14E12) XP® Rabbit mAb #8242; SirT1 (D1D7) Rabbit mAb #9475, Anti-rabbit IgG, HRP-linked antibody #7074.

## **2.11 Analisi statistica**

I dati sono presentati come medie  $\pm$  errore standard (SE) per ciascuna condizione sperimentale. Le variabili che non presentano una distribuzione normale sono state trasformate in logaritmo prima dell'analisi. Le differenze tra i gruppi sono state valutate da analisi ANOVA. È stato calcolato il p-value per determinare la significatività statistica. Tutte le analisi sono state condotte utilizzando il pacchetto SPSS.

### 3. RISULTATI

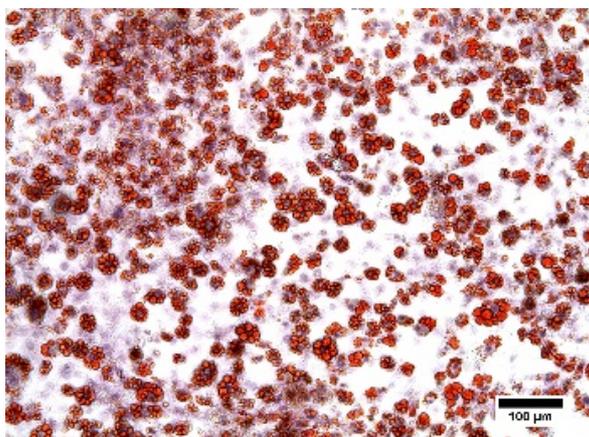
#### 3.1 Il trattamento con quercetina modula il profilo infiammatorio e la senescenza in adipociti maturi 3T3-L1 *in vitro*.

Allo scopo di valutare l'effetto di quercetina sul processo di senescenza in adipociti maturi *in vitro*, è stato condotto un esperimento pilota in cui adipociti 3T3-L1 a 5 giorni dall'induzione (pid5) sono stati esposti ad un trattamento con quercetina 20  $\mu$ M ripetuto a giorni alterni fino a 9 giorni dall'induzione (pid9) per un totale di tre volte. Le cellule sono state analizzate a pid10, in una fase morfologica e funzionale corrispondente all'adipocita maturo. Il trattamento con quercetina a tale concentrazione non presenta attività citotossica in quanto il numero di adipociti non subisce significative variazioni rispetto ai controlli (figura 1). In questo modello, dopo esposizione a quercetina, si assiste ad una significativa diminuzione dell'attività dell'enzima  $\beta$ -gal e quindi della senescenza rispetto al controllo ( $p < 0,05$ ) (figura 2).

È stata quindi valutata l'attività della quercetina per la produzione cellulare di ROS. Come si vede dalle immagini in microscopia a fluorescenza, dopo il trattamento con quercetina 20  $\mu$ M gli adipociti presentano una significativa riduzione dell'accumulo intracellulare di ROS rispetto ai controlli non trattati ( $p < 0,01$ ) (figura 3).

Inoltre, il profilo di espressione genica ci permette di confermare l'attività antinfiammatoria esercitata dalla sostanza: l'mRNA di IL-6 e di MCP-1 risulta ridotto negli adipociti trattati con quercetina rispetto al controllo (figura 4A). Il fattore di trascrizione NF $\kappa$ B totale risulta ridotto in Western Blot negli adipociti trattati rispetto ai controlli confermando l'attività antinfiammatoria esercitata da quercetina nel nostro modello cellulare. Mediante Western Blot è stata valutata la modulazione di SIRT1, deacetilasi istonica attiva in processi correlati alla risposta allo stress e alla regolazione del ciclo cellulare. Nel nostro modello cellulare, SIRT1 risulta aumentata negli adipociti trattati con il flavonoide (figura 4B).

PID10CTR



PID10QUER

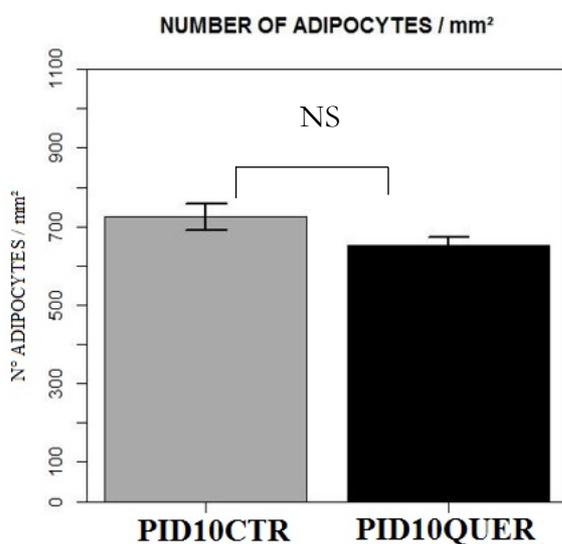
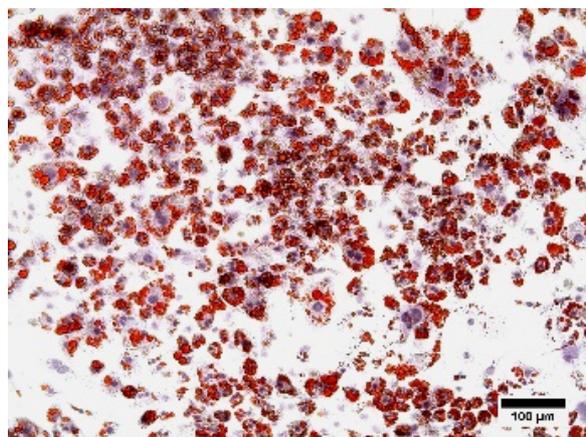
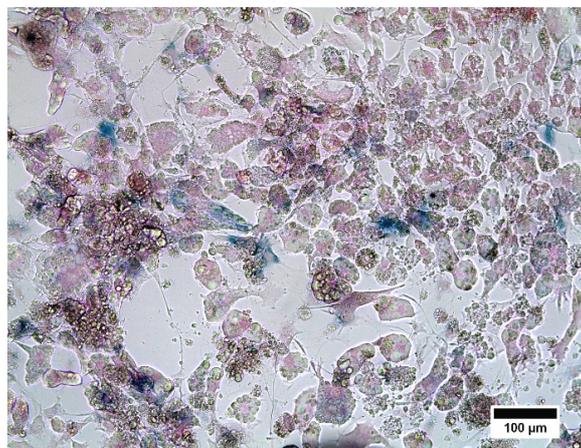


Figura 1

Colorazione RedOil ed ematossilina per la valutazione della morfologia di adipociti a pid10 (PID10CTR), dopo stimolazione con quercetina 20  $\mu$ M (PID10QUERC). (Scala = 100  $\mu$ m). I valori in grafico sono rappresentati come media  $\pm$  DS. (PID= *post induction day*)

PID10CTR



PID10QUER

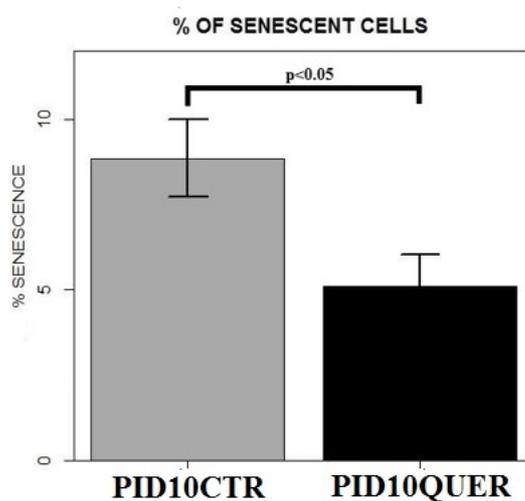
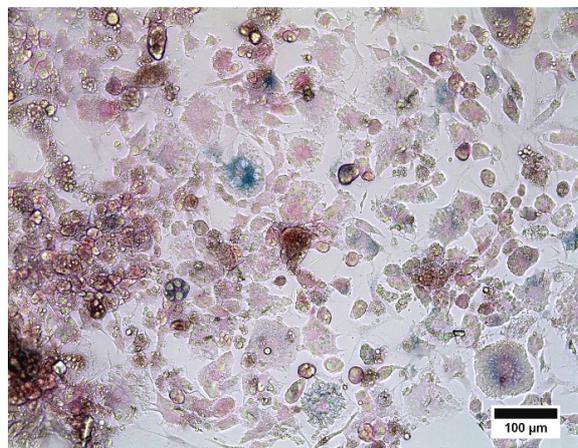


Figura 2

Valutazione della senescenza della cellula adiposa con colorazione specifica per  $\beta$ -galattosidasi. Immagini rappresentative della senescenza cellulare in adipociti a PID10 (PID10CTR) ed a PID10 trattati con quercetina 20  $\mu$ M (PID10QUER). (Scala = 100  $\mu$ m). I valori in grafico sono rappresentati come media  $\pm$  DS. (PID= *post induction day*)

PID10CTR

PID10QUER

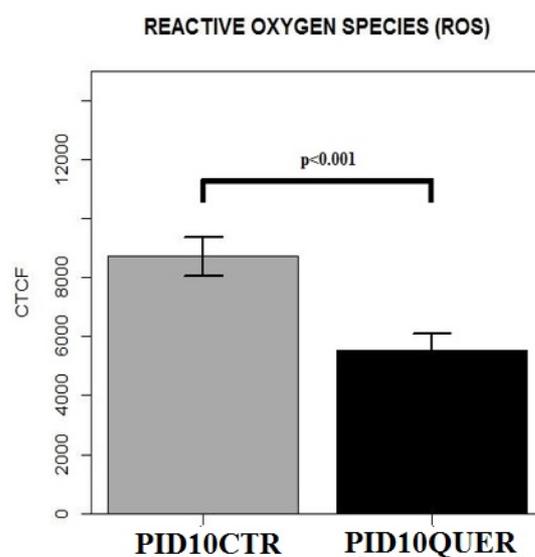
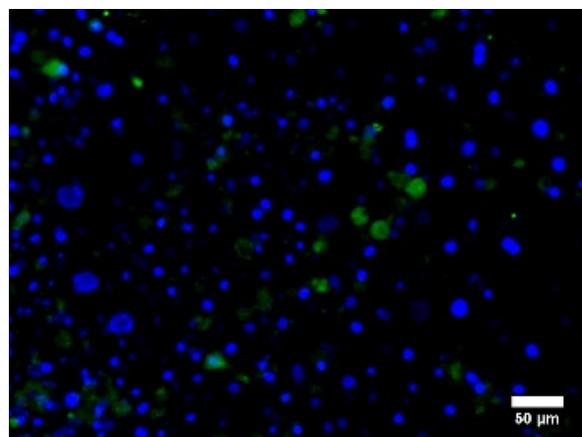
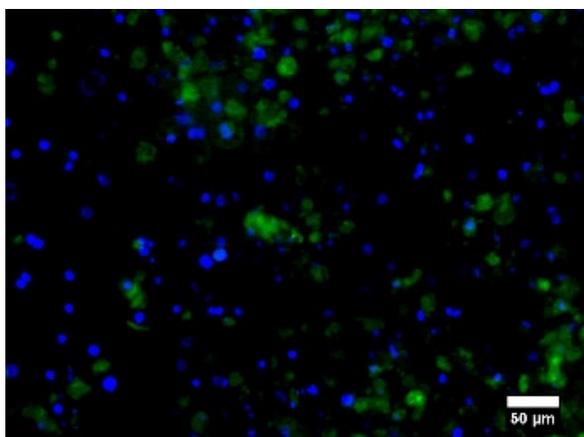


Figura 3

Immagini significative dell'accumulo di ROS intracellulari (in verde) in cellule adipose 3T3-L1 a PID10 ed a PID10 trattate con quercetina 20 $\mu$ M (PID10QUERC). (Scala = 50  $\mu$ m). I valori in grafico sono rappresentati come media  $\pm$  DS. (PID= *post induction day*). (CTCF= ID- background).

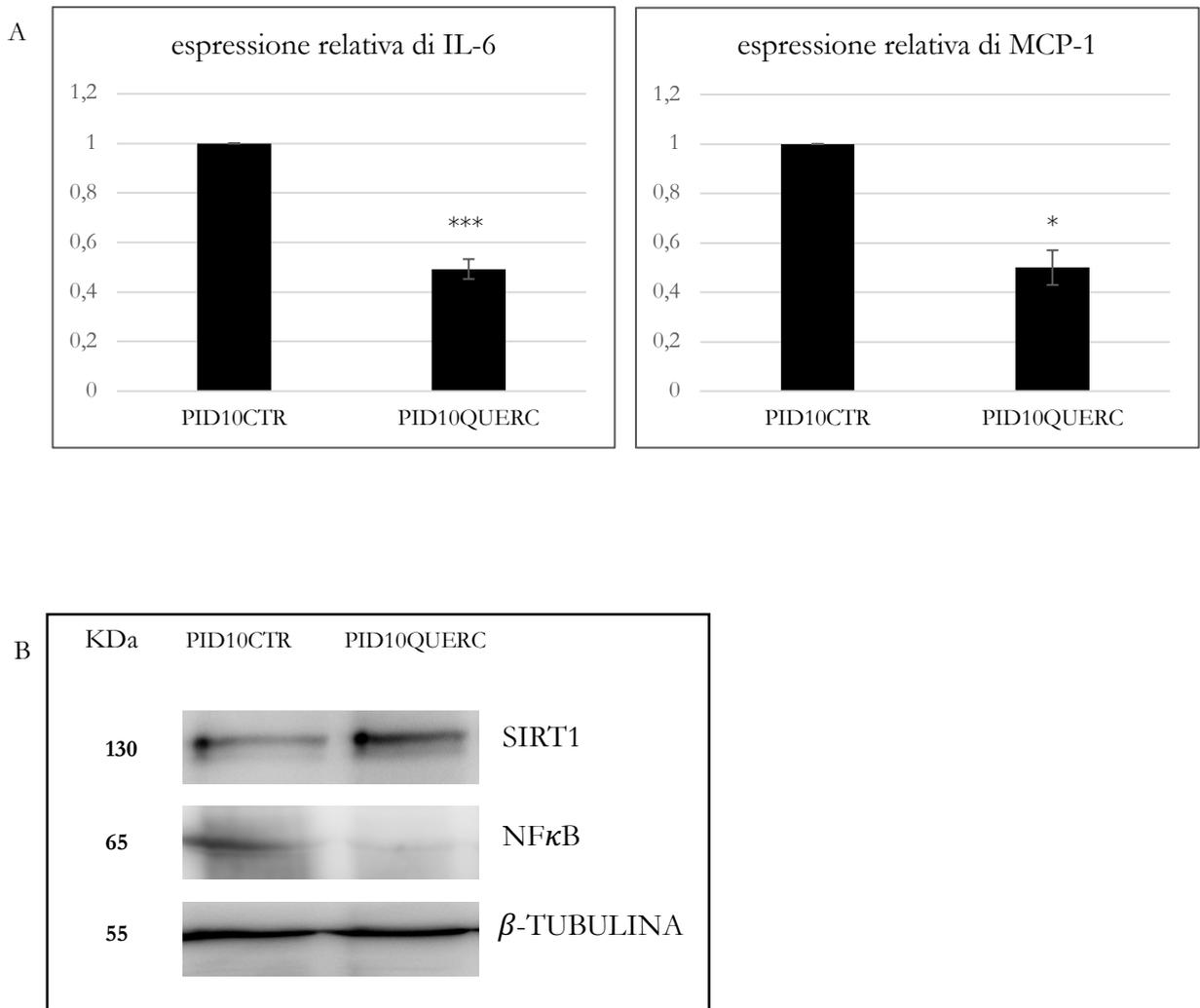


Figura 4

A) Espressione genica relativa di fattori SASP: IL-6 e MCP-1 in cellule adipose 3T3-L1 a PID10 e a PID10 dopo trattamento con quercetina 20  $\mu$ M (PID10QUERC). Come calibratore è stato considerato il controllo a PID10. Il grafico rappresenta la media delle espressioni  $\pm$  DS. (\*\*\*) $p < 0,001$ , \*  $p < 0,05$ )

B) Western Blot di NFκB e di SIRT1 normalizzati su tubulina.

### 3.2 Effetti del trattamento con quercetina sul processo di senescenza prematura indotta in adipociti maturi 3T3-L1 *in vitro*.

Adipociti 3T3-L1 sono stati sottoposti a stimolazione con H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (150 μM) per tre ore e per tre giorni consecutivi a partire da pid5 fino a pid7. Da pid7 a pid10 le cellule sono state mantenute in medium completo. Le cellule sono state raccolte a pid10 per permettere l'istaurarsi della senescenza.

Come si può notare in figura 5, il numero di adipociti maturi risulta significativamente diminuito nel campione trattato con H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> rispetto al controllo (figura 5). L'esposizione degli adipociti maturi ad H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> induce una senescenza prematura, aumentando significativamente il numero di cellule β-galattosidasi positive (p<0,01) (figura 6). In questo stesso modello, come atteso si verifica un aumento significativo di ROS (p<0,05) (figura 7) e una diminuzione dell'espressione genica di SOD-1 rispetto al controllo (figura 8A). Gli adipociti maturi trattati con H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> presentano inoltre un fenotipo SASP con un aumento dell'espressione genica di IL-6 e MCP-1 negli adipociti trattati rispetto al controllo (figura 8A). Inoltre, l'espressione di PPARγ e di adipoQ risulta inibita dal trattamento con H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (figura 8A). Mediante Western Blot, il fattore di trascrizione NFκB è visibilmente indotto dalla stimolazione con H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> rispetto al controllo mentre risulta modulata negativamente la proteina SIRT1 (figura 8B). In questo modello cellulare, si assiste inoltre ad un aumento significativo dell'espressione di miR-155-5p negli adipociti maturi trattati con H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> rispetto ai controlli (figura 8A). In questo modello di senescenza cellulare prematura, il trattamento con quercetina 20 μM in adipociti pretrattati con H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> comporta una significativa riduzione di cellule positive alla β-galattosidasi (p<0,01) rispetto ai controlli trattati unicamente con H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (figura 6). Inoltre, si osserva un trend di riduzione dell'espressione del gene P21 (figura 8A). Il profilo generale degli adipociti risulta inoltre modulato positivamente in quanto si assiste all'aumento di PPAR-γ e adipoQ nel campione co-trattato con quercetina (figura 8A).

L'accumulo intracellulare di ROS negli adipociti trattati con quercetina subisce una riduzione significativa rispetto al campione stimolato con la sola H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (figura 7) e parallelamente l'espressione di SOD1 aumenta rispetto al trattato con la sola H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (figura 8A). Dopo trattamento con quercetina, si assiste ad una significativa diminuzione dei geni SASP quali IL-6, MCP-1 (figura 8A) rispetto agli adipociti

sottoposti alla sola H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> oltreché al fattore di trascrizione NFκB (figura 8B). In questo modello *in vitro* il trattamento con quercetina aumenta l'attività dell'enzima antiossidante SOD-1 e l'attività di SIRT1 (figura 8B) rispetto ai controlli trattati con H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>.

Infine, il trattamento con quercetina modula l'espressione di miR-155-5p negli adipociti trattati con quercetina e pretrattati con H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> riportando i livelli di espressione simili ai livelli del controllo (figura 8A).

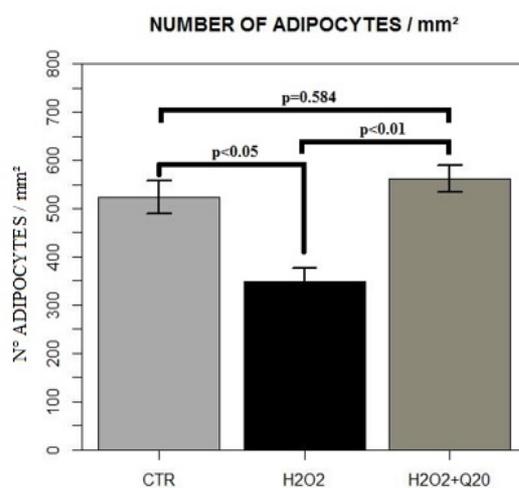
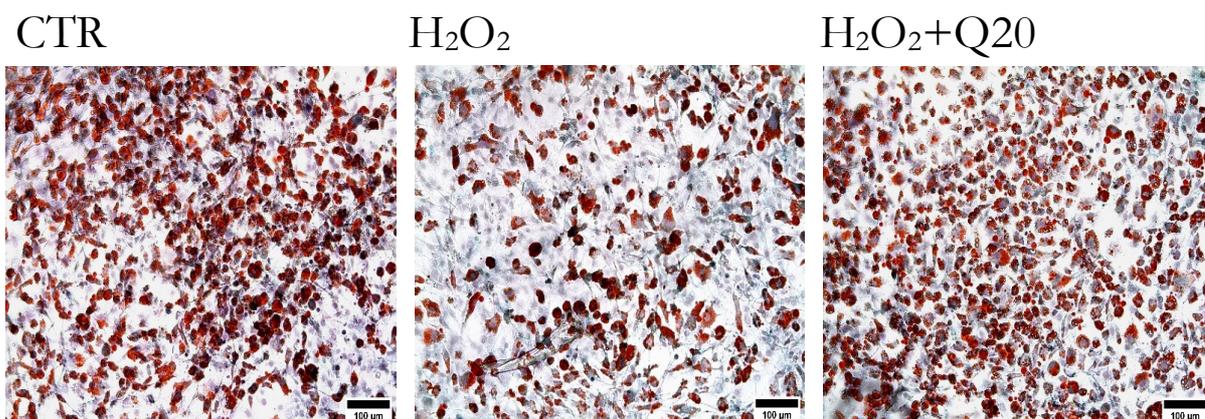


Figura 5

Colorazione RedOil ed ematossilina per la valutazione della morfologia di adipociti a pid10 senza alcun trattamento (CTR), adipociti trattati con  $H_2O_2$  150  $\mu M$  ( $H_2O_2$ ) e trattati con  $H_2O_2$  150  $\mu M$  e con quercetina 20  $\mu M$  ( $H_2O_2$  +Q20). (Scala = 100  $\mu m$ ). I valori in grafico sono rappresentati come media  $\pm$  DS.

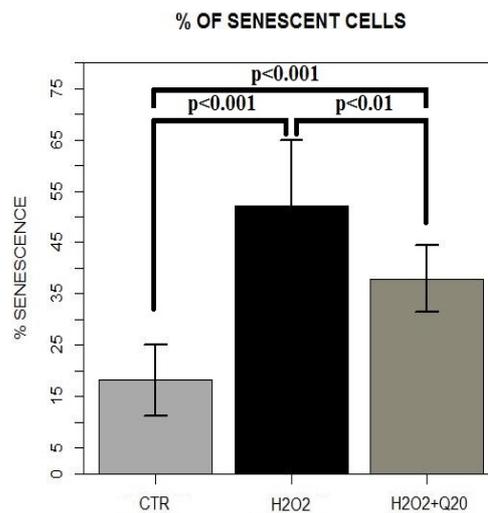
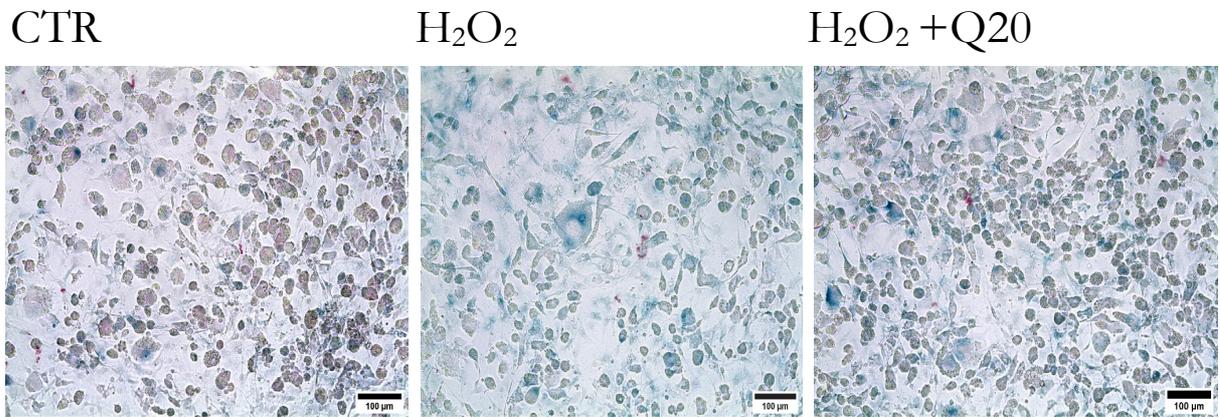


Figura 6

Valutazione della senescenza della cellula adiposa con colorazione specifica per  $\beta$ -galattosidasi. Immagini significative della senescenza cellulare in adipociti controllo a pid10 (CTR), stimolati con H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 150  $\mu$ M (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) e trattati con H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 150  $\mu$ M e con quercetina 20  $\mu$ M (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> +Q20). (Scala = 100  $\mu$ m). I valori in grafico sono rappresentati come media  $\pm$  DS.

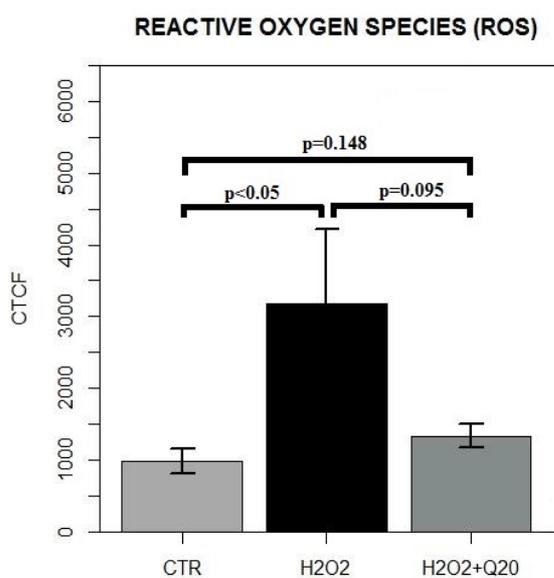
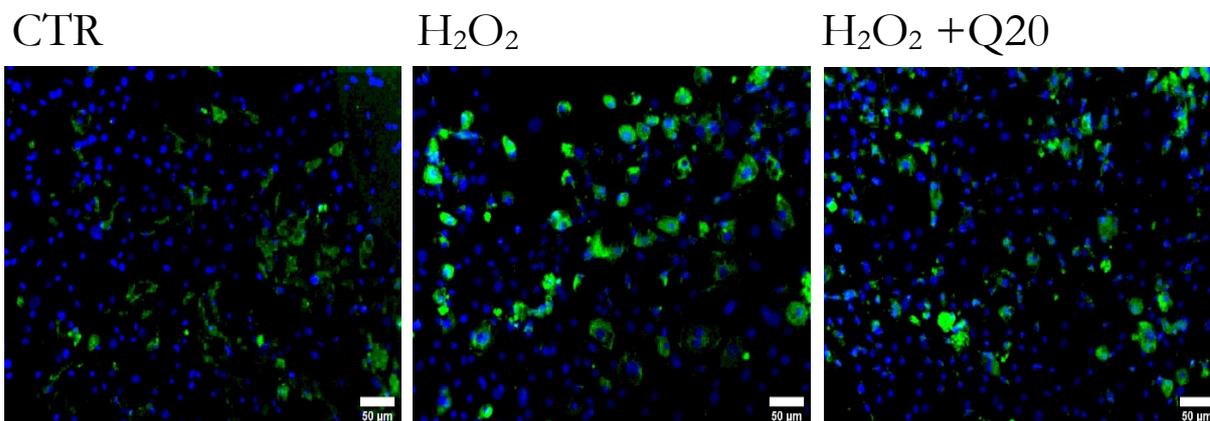
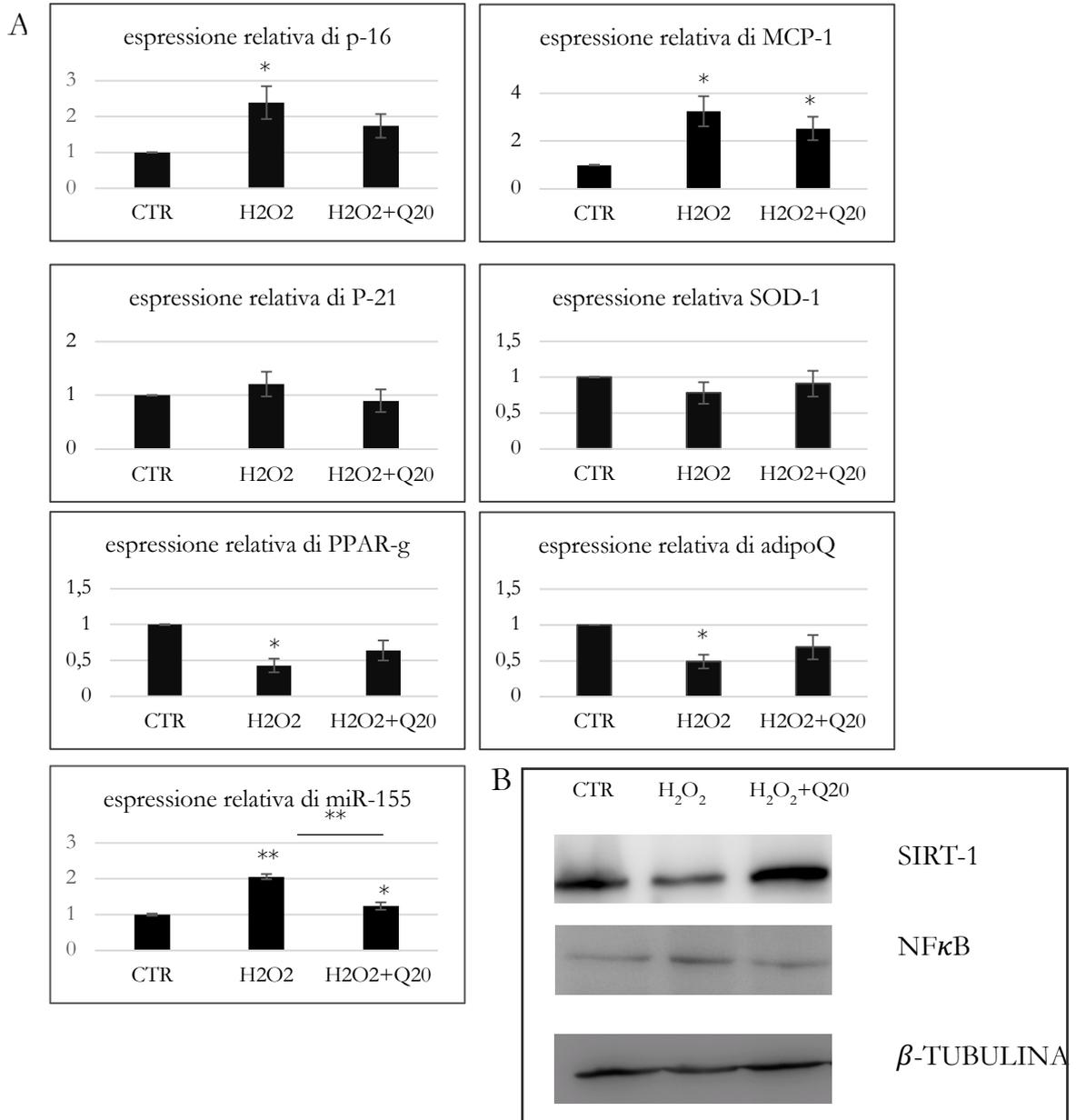


Figura 7  
 Immagini significative dell'accumulo di ROS intracellulari in cellule adipose 3T3-L1 controllo (CTR), trattate con H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 150 μM (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) e trattate con H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 150 μM e con quercetina 20 μM (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>+Q20). (Scala= 50 μm). I valori in grafico sono rappresentati come media ± DS. (CTCF= ID- background).



**Figura 8**

A) Espressione genica relativa a IL-6, MCP-1, p-21, PPAR- $\gamma$ , adiponQ e SOD in cellule adipose 3T3-L1 a pid10 (CTR) e trattate con H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 150 $\mu$ M (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) e trattate con H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 150 $\mu$ M e con quercetina 20  $\mu$ M (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> +Q20). È inoltre rappresentata l'espressione di miR-155-5p. Come calibratore è stato considerato il controllo (CTR). I valori in grafico sono rappresentati come media  $\pm$  DS. (\*\*\*) $p < 0,001$ , \*\*  $p < 0,01$ , \* $p < 0,05$ ).

B) Western Blot di NF $\kappa$ B totale e di SIRT1 normalizzati su tubulina.

### 3.3 Effetti del trattamento con quercetina sul processo di senescenza prematura in preadipociti 3T3-L1 *in vitro*.

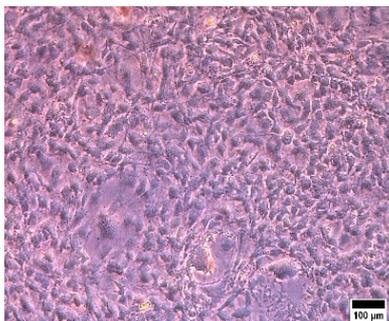
Preadipociti 3T3-L1, una volta raggiunta l'80% della confluenza, sono stati sottoposti a stimolazione con H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (150 μM) per tre ore e per tre giorni consecutivi. I campioni trattati anche con quercetina, sono stati sottoposti a trattamento per 36 ore come da schema presente nei materiali e metodi. Le cellule sono state raccolte dopo tre giorni dall'ultimo trattamento in modo da permettere l'instaurarsi della senescenza.

Le cellule 3T3-L1 stimulate con H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 150 μM mostrano caratteristiche tipiche del fenotipo SASP. Il trattamento delle cellule agisce accrescendo significativamente la dimensione delle cellule ( $p < 0,001$ ) (figura 9) e la positività all'attività beta-galattosidasi ( $p < 0,05$ ) rispetto alle cellule non stimulate con H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (figura 10). In questo stesso modello, si verifica come atteso l'aumento dell'espressione del gene P-21 (figura 12A) e di ROS intracellulari ( $p < 0,01$ ) (figura 11) rispetto alle cellule non trattate. Inoltre, il trattamento con H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> conferisce un fenotipo secretorio SASP alle cellule, con un aumento dell'espressione genica di IL-6 e di MCP-1 rispetto ai controlli (figura 12A). In aggiunta, mediante Western Blot, il fattore di trascrizione pro-infiammatorio NFκB è visibilmente indotto dalla stimolazione con H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> mentre risulta diminuita la proteina SIRT1. Si assiste anche all'aumento significativo del miRNA pro-infiammatorio miR-155-5p (figura 12A).

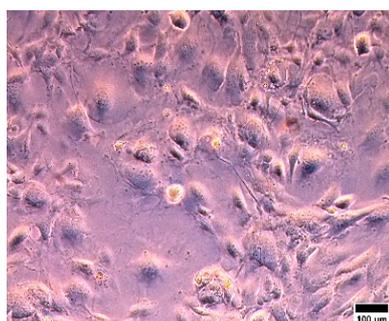
Il trattamento con quercetina 20 μM sembra proteggere dall'effetto mediato dal trattamento con H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> in quanto l'area delle cellule è minore rispetto al trattato con la sola H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (figura 9) e l'attività β-gal è inibita raggiungendo una percentuale di cellule positive inferiore al controllo ( $p < 0,05$ ) (figura 10). Contemporaneamente, si assiste all'abbassamento dell'espressione del gene P-21 ( $p < 0,005$ ) e delle citochine pro-infiammatorie IL-6 ( $p < 0,005$ ) e MCP-1 ( $p < 0,005$ ) (figura 12A) nei campioni trattati con H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> e quercetina.

Il trattamento con quercetina modula l'espressione di miR-155-5p che subisce una significativa diminuzione ( $p < 0,01$ ) (figura 12A). Nei campioni trattati con il flavonoide, si assiste anche alla modulazione di NFκB che viene inibito dal trattamento mentre si osserva un aumento di SIRT1 (figura 12B).

CTR



H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>



H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>+Q20

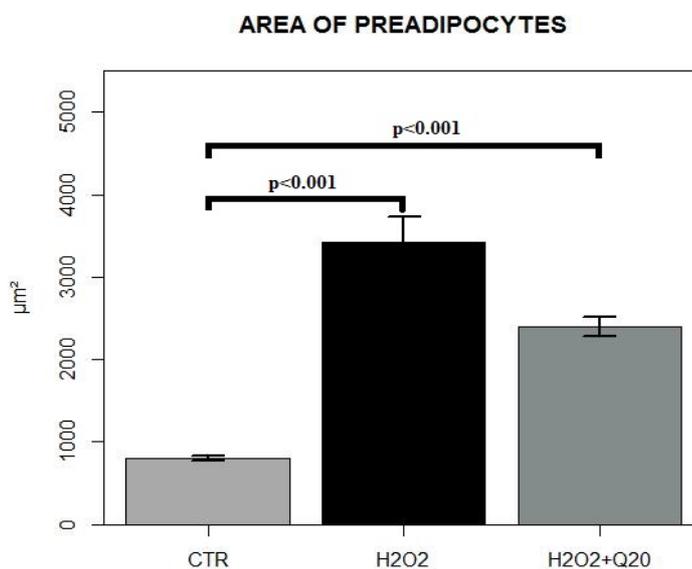
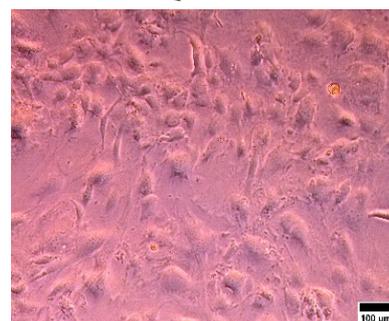
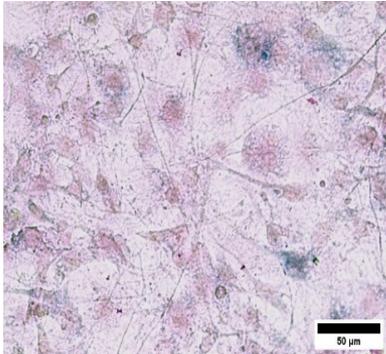


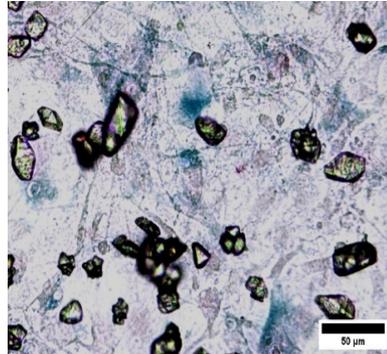
Figura 9

Morfologia di preadipociti 3T3-L1 in condizioni basali (CTR), stimolati con H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 150 μM (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) e trattati con H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 150 μM e con quercetina 20 μM (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>+Q20) visualizzati al microscopio ottico Leica. (Scala= 100x). I valori in grafico sono rappresentati come media ± DS.

CTR



H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>



H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>+Q20

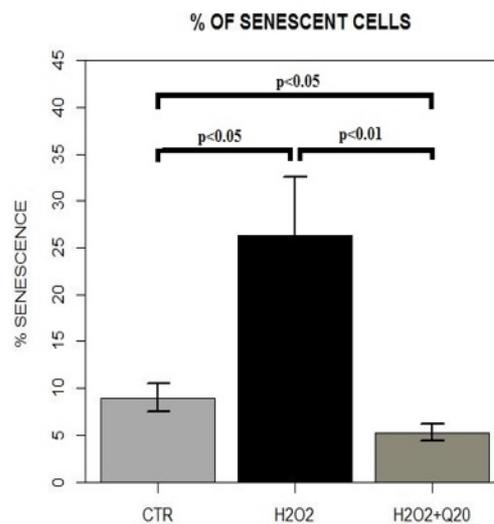
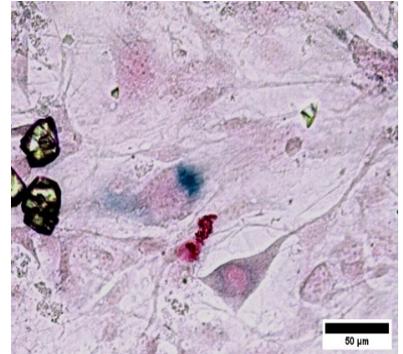
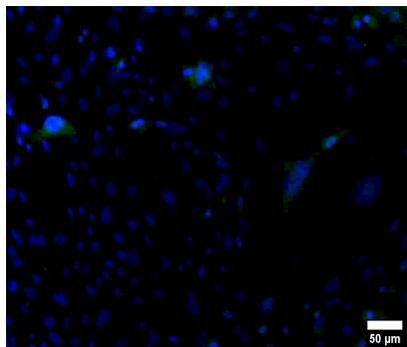


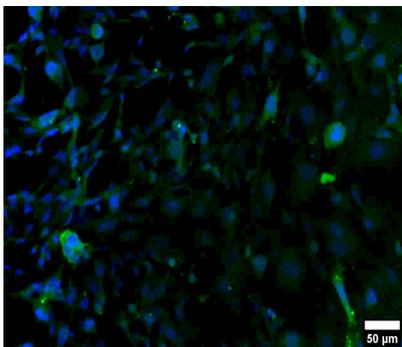
Figura 10

Valutazione della senescenza di preadipociti 3T3-L1 con colorazione specifica per  $\beta$ -galattosidasi. Immagini significative della senescenza cellulare in preadipociti controllo (CTR), stimolati con H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 150  $\mu$ M (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) e trattati con H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 150  $\mu$ M e con quercetina 20  $\mu$ M. (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>+Q20). (Scala = 100  $\mu$ m). I valori in grafico sono rappresentati come media  $\pm$  DS.

CTR



H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>



H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>+Q20

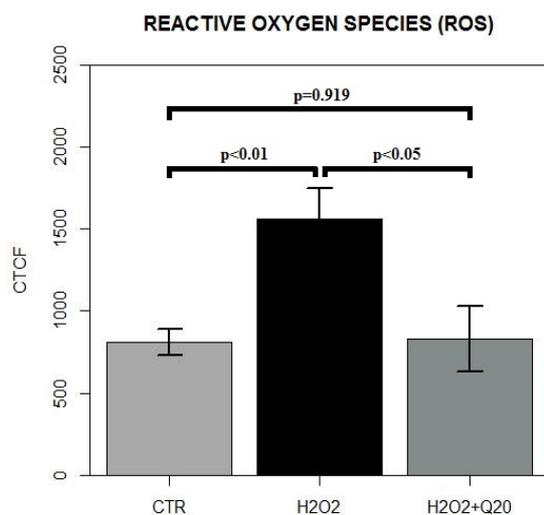
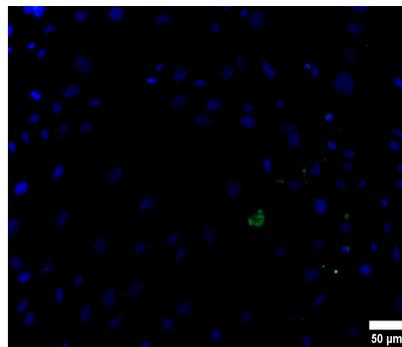


Figura 11

Immagini significative dell'accumulo di ROS intracellulari in cellule preadipociti 3T3-L1 controllo (CTR), stimulate con H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 150 μM (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) e trattate con H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 150 μM e con quercetina 20 μM (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>+Q20). (Scala= 50 μm). I valori in grafico sono rappresentati come media ± DS. (CTCF= ID- background).

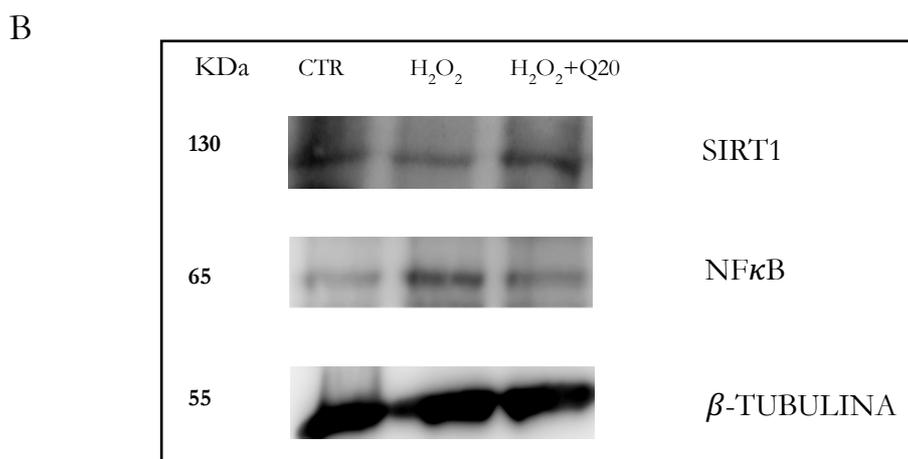
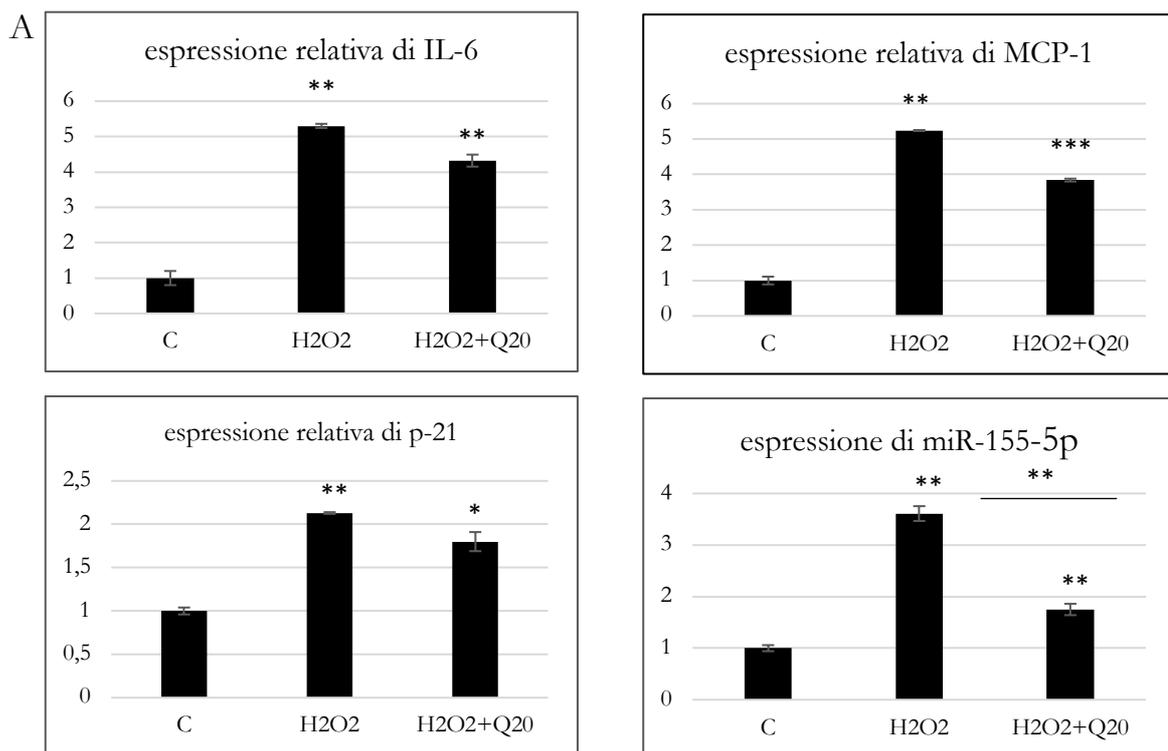


Figura 12

A) Espressione genica relativa di preadipociti 3T3-L1 (CTR), stimulate con H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 150 μM e trattate con H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 150 μM e con quercetina 20 μM (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>+Q20) di fattori SASP: P-21, IL-6 e MCP-1. È rappresentata l'espressione di miR-155-5p normalizzato. Come calibratore è stato considerato il controllo (CTR). I valori in grafico sono rappresentati come media ± DS. (\*\*\*)p<0,001, \*\* p<0,01, \*p<0,05).

B) Western Blot di NFκB totale e di SIRT1 normalizzati su tubulina.

## 4. DISCUSSIONE

L'aumentata aspettativa di vita nei paesi industrializzati ha determinato anche un significativo aumento dell'incidenza di malattie età-associate quali le malattie neurodegenerative, il diabete, le malattie cardiovascolari e i tumori.

Negli ultimi anni è stato ipotizzato ed investigato un ruolo del TA disfunzionale nell'alterazione dell'omeostasi sistemica, alla base della fisiopatologia di molte complicanze metabolico-degenerative associate all'invecchiamento. Nonostante numerosi studi pubblicati in letteratura suggeriscano per la cellula adiposa un ruolo fondamentale nella fisiopatologia della disfunzione del TA, molti aspetti delle modificazioni che si stabiliscono negli adipociti con l'invecchiamento sono stati finora chiariti solo in parte.

Lo studio dei meccanismi fisiopatologici alla base dell'invecchiamento ha evidenziato come il numero delle cellule che vanno incontro a fenomeni di senescenza tenda ad aumentare con l'età e come il loro caratteristico fenotipo secretorio SASP sia in grado di alimentare uno stato pro-infiammatorio cronico-sistemico, che caratterizza l'invecchiamento, compromettendo la capacità rigenerativa delle cellule staminali e aumentando di conseguenza il rischio di sviluppare le patologie età-correlate.

La ricerca si è quindi focalizzata sull'identificazione di molecole, sia di sintesi che naturali, capaci o di eliminare le cellule senescenti (senolitici) o almeno di ridurre il fenotipo secretorio (anti-SASP). In particolare, considerando che le cellule senescenti contribuiscono alla genesi di uno stato infiammatorio sistemico attraverso stimoli pro-ossidanti e pro-infiammatori, è stato ipotizzato che i polifenoli, sostanze naturali che esercitano azioni antiossidanti e antinfiammatorie, possano rappresentare molecole "anti-senescenza".

In questo studio è stato dapprima messo a punto un modello di senescenza cellulare indotta in preadipociti e in adipociti murini, attraverso l'utilizzo di perossido di idrogeno per poi andare a testare le proprietà anti-senescenza di quercetina, molecola già conosciuta per le sue proprietà antidiabetiche e antiossidanti. Basandoci sulla letteratura, è stata dapprima scelta la concentrazione di utilizzo in modo da non indurre apoptosi vista la nota capacità di quercetina di indurre apoptosi se somministrata ad alte concentrazioni.

Il modello cellulare di senescenza di preadipociti e adipociti maturi è stato confermato in entrambi i casi dall'aumentato numero di cellule  $\beta$ -galattosidasi positive e dall'aumento dell'espressione del gene P-21; nel caso dei preadipociti (cellule in grado di dividersi e di replicarsi) la stimolazione con perossido di idrogeno induceva la perdita della capacità replicativa come mostrato in figura 9. Inoltre, in entrambe i modelli cellulari, si assisteva ad un aumento dell'espressione di fattori SASP e di NF $\kappa$ B, fattore di trascrizione che promuove la trascrizione di geni pro-infiammatori. L'utilizzo di perossido di idrogeno ci ha permesso di indurre un significativo accumulo di radicali dell'ossigeno a livello intracellulare. Un altro significativo marker di senescenza indotta è la diminuzione, in entrambi i modelli cellulari, della produzione della proteina SIRT1, de-acetilasi coinvolta in processi regolatori del metabolismo energetico e della sopravvivenza cellulare.

Tra le sirtuine, SIRT1 è quella per cui è stato descritto un ruolo di riduzione nell'invecchiamento cellulare, agendo sulla senescenza indotta da p21. Questa attività è stata dimostrata per cellule mesenchimali prelevate dal TA di donatori di diverse età [120]. In particolare, SIRT1 riduce i livelli di espressione di p53, che è il fattore di trascrizione per p21. p21 è un inibitore dei complessi ciclina-CDK (Ciclin dependent Kinase) Cdk2/ciclinaE, necessari per il passaggio della cellula dalla fase G1 (Gap-1) alla fase S (sintesi) del ciclo cellulare. Un'elevata espressione di p21, secondaria ad elevati livelli di p53, porta quindi ad un blocco del ciclo cellulare in fase G1, per cui la cellula viene a trovarsi in una condizione di arresto replicativo, che è tipica delle cellule senescenti [120]. I risultati che abbiamo ottenuto suggeriscono che quercetina possa limitare l'invecchiamento delle cellule adipose *in vitro* agendo sul meccanismo di invecchiamento indotto da p21.

Uno dei dati più originali e forse di maggiore interesse emersi in questo studio è rappresentato dalla modulazione dell'espressione del miR-155-5p in questo modello di invecchiamento precoce. La scelta di analizzare in particolare questo miRNA si è basata sulla letteratura; Eguchi e colleghi hanno infatti dimostrato che adipociti 3T3-L1 sottoposti a una stimolazione mediante l'utilizzo di acido palmitico presentavano un maggior rilascio di miR-155-5p rispetto al controllo. Inoltre, miR-155-5p è associato a stati infiammatori in diversi modelli cellulari sia murini che umani. Choi e colleghi hanno inoltre dimostrato la modulazione del miR-155-5p dopo trattamento con perossido di idrogeno in cellule endoteliali ombelicali umane.

Come noto, quercetina e altri flavonoidi, sostanze naturali normalmente presenti nella dieta, sono in grado di esercitare attività biologiche ad ampio spettro grazie alle loro capacità antiossidanti e antinfiammatorie. Essendo molecole funzionalmente pleiotropiche, esercitano la loro azione su più targets cellulari attraverso meccanismi indipendenti mediante la modulazione dell'attività di fattori di trascrizione e di altri regolatori come ad esempio i miRNA.

L'efficacia di quercetina come senolitico in specifico sulla cellula adiposa invecchiata è un dato nuovo con solo poche evidenze in letteratura. Gli studi sinora pubblicati in letteratura sono stati effettuati solo sul preadipocita su cui peraltro esplica un'azione blanda, se non in associazione con un altro senolitico, come dasatinib [121].

Questo lavoro conferma anche come quercetina possa essere efficace come senolitico a dosaggi medio-bassi, intorno ai 20  $\mu\text{M}$  per quanto riguarda nello specifico il TA [121]. Finora, questo composto era stato utilizzato negli studi in vitro principalmente in altri due range di concentrazioni. Da un lato, infatti, gli studi su cellule adipose 3T3-L1 nel contesto dell'obesità si sono avvalsi di dosaggi  $< 10 \mu\text{M}$  [122, 123]; dall'altro, studi su diverse linee cellulari nel contesto della ricerca oncologica, hanno impiegato dosaggi elevati:  $> 30 \mu\text{M}$  (più frequentemente  $> 50 \mu\text{M}$ ) [124]. Nel nostro modello sperimentale di senescenza precoce, il trattamento con quercetina di adipociti e preadipociti stimolati con perossido di idrogeno ha permesso di dimostrare una attività senolitica e di confermare la capacità antiossidante e antinfiammatoria del fitocomposto in studio. Nel nostro modello dopo trattamento con quercetina si assisteva infatti ad una diminuzione significativa di cellule  $\beta$ -galattosidasi positive, ad una diminuzione di NF $\kappa$ B, con conseguente riduzione dell'espressione di geni infiammatori. Infine il trattamento con quercetina determinava una aumentata produzione della proteina SIRT1, considerato fattore positivo per l'attività fisiologica cellulare.

In entrambi i modelli di invecchiamento precoce, il trattamento con quercetina inibiva l'espressione di miR-155-5p che può essere considerato un modulatore positivo di infiammazione.

Una analisi del database online miRDB ha permesso di ipotizzare eventuali target molecolari modulati da miR-155-5p; se si considera che l'invecchiamento precoce veniva indotto dopo stimolazione con perossido di ossigeno, è possibile ipotizzare come gene target di miR.155-5p il *factor erythroid derived 2, like 2* (nfe2l2; gene ID: 18024;

alias: nrf2). Tale gene codifica per un fattore di trascrizione, membro della famiglia delle proteine bZIP (basic leucine zipper); tale fattore di trascrizione è in grado di regolare geni che contengono nel loro promotore la sequenza ARE (*antioxidant response element*) che codificano proteine coinvolte nella risposta all'infiammazione indotta dallo stress ossidativo. Il miR-155-5p si lega nella sequenza 3' UTR a livello dell'amminoacido 148 della sequenza amminoacidica di nfe2l2 con un target score di 93.

È possibile ipotizzare quindi nel nostro modello che l'incremento di miR-155-5p in risposta al perossido di idrogeno porterebbe a silenzierebbe il fattore positivo nrf2 lasciando posto alla produzione di NFκB.

La quercetina, in grado di modulare negativamente miR-155-5p, potrebbe ristabilire la produzione di nrf2 che agisce a monte della risposta antiossidante e antinfiammatoria come mostrato nella figura 13.

La modulazione di tale miRNA agisce positivamente anche nel metabolismo lipidico degli adipociti maturi: il co-trattamento con quercetina, abbassando l'espressione di miR-155-5p, regola positivamente i geni PPAR-γ e adipoQ come mostrato in figura 8A a dimostrare gli effetti positivi già ottenuti su topi deleti del miR-155 in cui si assiste ad una diminuzione di accumulo di tessuto adiposo anche in risposta ad una dieta ipercalorica.

In conclusione, dai risultati di questa tesi emerge quindi che preadipociti e adipociti sottoposti in coltura a invecchiamento precoce sono caratterizzati, oltre che da cambiamenti morfologici, anche da modificazioni funzionali e metaboliche. La cellula adiposa invecchiata acquisirebbe un fenotipo pro-infiammatorio compatibile con il fenotipo SASP di recente definizione, che contribuirebbe alla disfunzione del TA ed alla diffusione del processo di invecchiamento a livello tissutale e sistemico.

Inoltre, viste le modificazioni in termini morfologici e funzionali che si osservano negli adipociti sottoposti a trattamento con H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, si può affermare che lo stress ossidativo verosimilmente ha un ruolo di modulazione sulle proprietà della cellula adiposa che invecchia, contribuendo a renderla ancora più disfunzionale.

Infine, i cambiamenti morfologici, funzionali e metabolici che si osservano negli preadipociti e adipociti con invecchiamento precoce sottoposti a trattamento con quercetina, suggeriscono che questa molecola possa avere un ruolo di attenuazione dell'invecchiamento delle cellule adipose stesse.

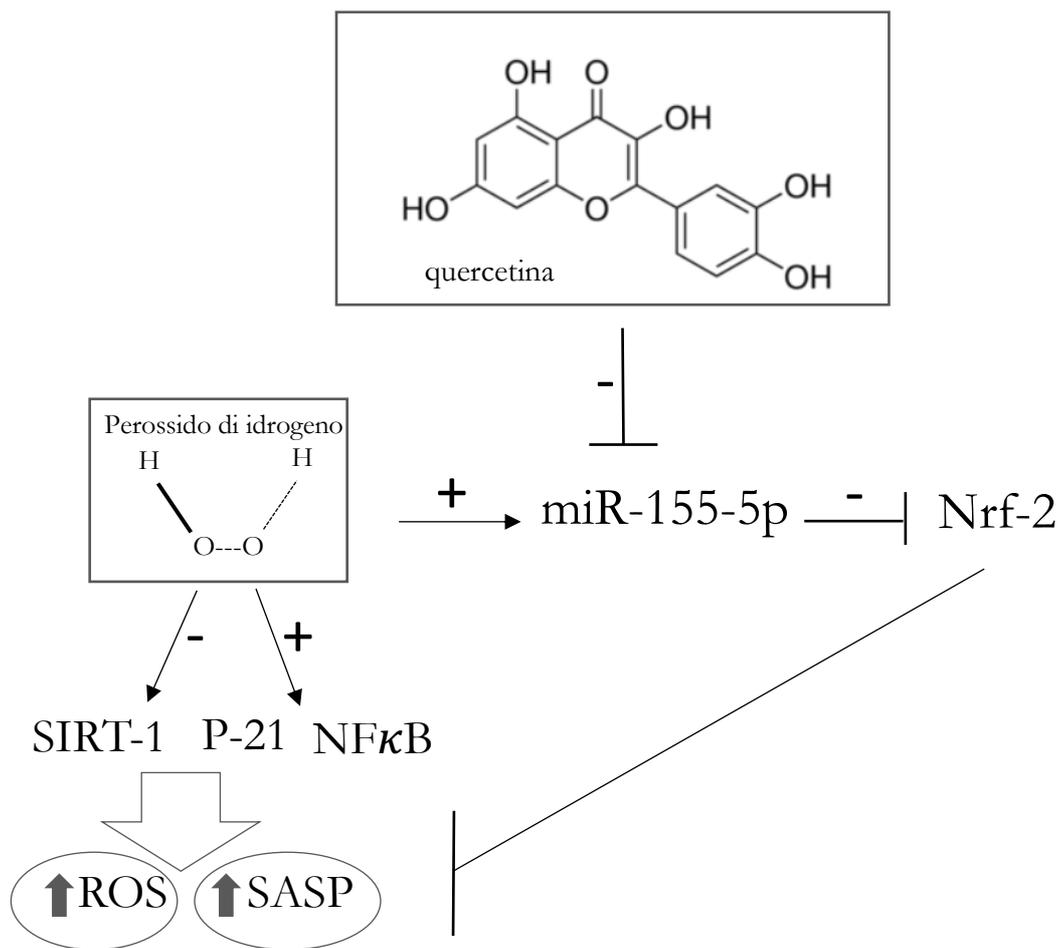


Figura 13  
Rappresentazione della ipotetica via molecolare di segnale.

## 5. BIBLIOGRAFIA

1. Tchkonina T, Morbeck DE, Von Zglinicki T, Van Deursen J, Lustgarten J, Scoble H, Khosla S, Jensen MD, Kirkland JL. *Aging Cell*. 2010 Oct;9(5):667-84.
2. Guo SS, Zeller C, Chumlea WC, Siervogel RM. *Am J Clin Nutr*. 1999 Sep;70(3):405-11.
3. Fox CS, Massaro JM, Hoffmann U, Pou KM, Maurovich-Horvat P, Liu CY, Vasan RS, Murabito JM, Meigs JB, Cupples LA, D'Agostino RB Sr, O'Donnell CJ. *Circulation*. 2007 Jul 3;116(1):39-48.
4. Fantin F, Di Francesco V, Fontana G, Zivelonghi A, Bissoli L, Zoico E, Rossi A, Micciolo R, Bosello O, Zamboni M. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci*. 2007 Dec;62(12):1375-81.
5. Zamboni M, Armellini F, Harris T, Turcato E, Micciolo R, Bergamo-Andreis IA, Bosello O. *Am J Clin Nutr*. 1997 Jul;66(1):111-5.
6. DeNino WF, Tchernof A, Dionne IJ, Toth MJ, Ades PA, Sites CK, Poehlman ET. *Diabetes Care*. 2001 May;24(5):925-32.
7. Heilbronn L, Smith SR, Ravussin E. *Int J Obes Relat Metab Disord*. 2004 Dec;28 Suppl 4:S12-21.
8. Goodpaster BH, Krishnaswami S, Resnick H, Kelley DE, Haggerty C, Harris TB, Schwartz AV, Kritchevsky S, Newman AB. *Diabetes Care*. 2003 Feb;26(2):372-9.
9. Goodpaster BH, Krishnaswami S, Harris TB, Katsiaras A, Kritchevsky SB, Simonsick EM, Nevitt M, Holvoet P, Newman AB. *Arch Intern Med*. 2005 Apr 11;165(7):777-83.
10. Katsiaras A, Newman AB, Kriska A, Brach J, Krishnaswami S, Feingold E, Kritchevsky SB, Li R, Harris TB, Schwartz A, Goodpaster BH. *J Appl Physiol* (1985). 2005 Jul;99(1):210-6.
11. Saisho Y, Butler AE, Meier JJ, Monchamp T, Allen-Auerbach M, Rizza RA, Butler PC. *Clin Anat*. 2007 Nov;20(8):933-42.
12. Sharma S, Adrogue JV, Golfman L, Uray I, Lemm J, Youker K, Noon GP, Frazier OH, Taegtmeier H. *FASEB J*. 2004 Nov;18(14):1692-700.
13. Silaghi A, Piercecchi-Marti MD, Grino M, Leonetti G, Alessi MC, Clement K, Dadoun F, Dutour A. *Obesity (Silver Spring)*. 2008 Nov;16(11):2424-30.
14. Kugel H, Jung C, Schulte O, Heindel W. *J Magn Reson Imaging*. 2001 Feb;13(2):263-8.
15. Liney GP, Bernard CP, Manton DJ, Turnbull LW, Langton CM. *J Magn Reson Imaging*. 2007 Sep;26(3):787-93.
16. Gimble JM, Robinson CE, Wu X, Kelly KA. *Bone*. 1996 Nov;19(5):421-8.
17. Cinti S. *Proc Nutr Soc*. 2001 Aug;60(3):319-28.
18. Araki S, Okazaki M, Goto S. *Gerontology*. 2004 Jul-Aug;50(4):206-15.
19. Bays HE, González-Campoy JM, Bray GA, Kitabchi AE, Bergman DA, Schorr AB, Rodbard HW, Henry RR. *Expert Rev Cardiovasc Ther*. 2008 Mar;6(3):343-68.
20. Wu D, Ren Z, Pae M, Guo W, Cui X, Merrill AH, Meydani SN. *J Immunol*. 2007 Oct 1;179(7):4829-39.

21. Guo W, Pirtskhalava T, Tchkonina T, Xie W, Thomou T, Han J, Wang T, Wong S, Cartwright A, Hegardt FG, Corkey BE, Kirkland JL. *Am J Physiol Endocrinol Metab.* 2007 Apr;292(4):E1041-51.
22. Araki S, Okazaki M, Goto S. *Gerontology.* 2004 Jul-Aug;50(4):206-15
23. Cartwright MJ, Tchkonina T, Kirkland JL. *Exp Gerontol.* 2007 Jun;42(6):463-71.
24. Kirkland JL, Hollenberg CH, Gillon WS.
25. Bertrand HA, Lynd FT, Masoro EJ, Yu BP. *J Gerontol.* 1980 Nov;35(6):827-35
26. Tang QQ, Zhang JW, Daniel Lane M. *Biochem Biophys Res Commun.* 2004 Jun 18;319(1):235-9.
27. Karagiannides I, Tchkonina T, Dobson DE, Steppan CM, Cummins P, Chan G, Salvatori K, Hadzopoulou-Cladaras M, Kirkland JL. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol.* 2001 Jun;280(6):R1772-80.
28. Karagiannides I, Thomou T, Tchkonina T, Pirtskhalava T, Kypreos KE, Cartwright A, Dalagiorgou G, Lash TL, Farmer SR, Timchenko NA, Kirkland JL. *J Biol Chem.* 2006 Aug 11;281(32):23025-33. Epub 2006 Jun 5.
29. Tchkonina T, Pirtskhalava T, Thomou T, Cartwright MJ, Wise B, Karagiannides I, Shpilman A, Lash TL, Becherer JD, Kirkland JL. *Am J Physiol Endocrinol Metab.* 2007 Dec;293(6):E1810-9
30. Adamczak M, Wiecek A. *Semin Nephrol.* 2013 Jan;33(1):2-13.
31. Chen GY, Nuñez G. *Nat Rev Immunol.* 2010 Dec;10(12):826-37.
32. Ortega Martinez de Victoria E, Xu X, Koska J, Francisco AM, Scalise M, Ferrante AW Jr, Krakoff J. *Diabetes.* 2009 Feb;58(2):385-93.
33. Garg SK, Delaney C, Shi H, Yung R. *Crit Rev Immunol.* 2014;34(1):1-14.
34. Lumeng CN, Liu J, Geletka L, Delaney C, Delproposto J, Desai A, Oatmen K, Martinez-Santibanez G, Julius A, Garg S, Yung RL. *J Immunol.* 2011 Dec 15;187(12):6208-16.
35. Chung S, Lapoint K, Martinez K, Kennedy A, Boysen Sandberg M, McIntosh MK. *Endocrinology.* 2006 Nov;147(11):5340-51.
36. Lin Y, Lee H, Berg AH, Lisanti MP, Shapiro L, Scherer PE. *J Biol Chem.* 2000 Aug 11;275(32):24255-63.
37. Suganami T, Tanimoto-Koyama K, Nishida J, Itoh M, Yuan X, Mizuarai S, Kotani H, Yamaoka S, Miyake K, Aoe S, Kamei Y, Ogawa Y. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2007 Jan;27(1):84-91.
38. Caso G, McNurlan MA, Mileva I, Zemlyak A, Mynarcik DC, Gelato MC. *Metabolism.* 2013 Mar;62(3):337-40.
39. Ghosh AK, Garg SK, Mau T, O'Brien M, Liu J, Yung R. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci.* 2015 Nov;70(11):1320-9.
40. Ghosh AK, Mau T, O'Brien M, Garg S, Yung R. *Aging (Albany NY).* 2016 Oct 24;8(10):2525-2537.
41. Kamata H, Hirata H. *Cell Signal.* 1999 Jan;11(1):1-14.
42. Murphy MP. *Biochem Biochem J.* 2009 Jan 1;417(1):1-13.

43. Vitseva OI, Tanriverdi K, Tchkonina TT, Kirkland JL, McDonnell ME, Apovian CM, Freedman J, Gokce N. *Obesity* (Silver Spring). 2008 May;16(5):932-7
44. He G, Yu GY, Temkin V, Ogata H, Kuntzen C, Sakurai T, Sieghart W, Peck-Radosavljevic M, Leffert HL, Karin M. *Cancer Cell*. 2010 Mar 16;17(3):286-97.
45. Pessler D, Rudich A, Bashan N. *Diabetologia*. 2001 Dec;44(12):2156-64.
46. Tirosh A, Potashnik R, Bashan N, Rudich A. *J Biol Chem*. 1999 Apr 9;274(15):10595-602.
47. Ma M, Quan Y, Li Y, He X, Xiao J, Zhan M, Zhao W, Xin Y, Lu L, Luo L. *Mol Med Rep*. 2018 Jul;18(1):807-814.
48. Kumar R, Sharma A, Kumari A, Gulati A, Padwad Y, Sharma R. *Biogerontology*. 2019 Apr;20(2):171-189.
49. Tchkonina T, Zhu Y, van Deursen J, Campisi J, Kirkland JL. *J Clin Invest*. 2013 Mar;123(3):966-72.
50. Coppé JP, Patil CK, Rodier F, Sun Y, Muñoz DP, Goldstein J, Nelson PS, Desprez PY, Campisi J. *PLoS Biol*. 2008 Dec 2;6(12):2853-68.
51. Lee AC, Fenster BE, Ito H, Takeda K, Bae NS, Hirai T, Yu ZX, Ferrans VJ, Howard BH, Finkel T. *J Biol Chem*. 1999 Mar 19;274(12):7936-40.
52. Jeyapalan JC, Sedivy JM. *Mech Ageing Dev*. 2008 Jul-Aug;129(7-8):467-74.
53. He S, Sharpless NE. *Cell*. 2017 Jun 1;169(6):1000-1011.
54. Wang C, Jurk D, Maddick M, Nelson G, Martin-Ruiz C, von Zglinicki T. *Aging Cell*. 2009 Jun;8(3):311-23.
55. Wang Z, Wei D, Xiao H. *Methods Mol Biol*. 2013;1048:135-44.
56. Monickaraj F, Gokulakrishnan K, Prabu P, Sathishkumar C, Anjana RM, Rajkumar JS, Mohan V, Balasubramanyam M. *Clin Biochem*. 2012 Nov;45(16-17):1432-8.
57. Sebastián C, Herrero C, Serra M, Lloberas J, Blasco MA, Celada A. *J Immunol*. 2009 Aug 15;183(4):2356-64.
58. Xu M, Tchkonina T, Ding H, Ogorodnik M, Lubbers ER, Pirtskhalava T, White TA, Johnson KO, Stout MB, Mezera V, Giorgadze N, Jensen MD, LeBrasseur NK, Kirkland JL. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2015 Nov 17;112(46):E6301-10.
59. Xu M, Palmer AK, Ding H, Weivoda MM, Pirtskhalava T, White TA, Sepe A, Johnson KO, Stout MB, Giorgadze N, Jensen MD, LeBrasseur NK, Tchkonina T, Kirkland JL. *Elife*. 2015 Dec 19;4:e12997.
60. Bartel DP. *Cell*. 2004 Jan 23;116(2):281-97.
61. Brennecke J, Stark A, Russell RB, Cohen SM. *PLoS Biol*. 2005 Mar;3(3):e85.
62. Xie H, Lim B, Lodish HF. *Diabetes* 2009; **58**: 1050–1057
63. Sun T, Fu M, Bookout AL, Kliever SA, Mangelsdorf DJ. *Mol Endocrinol* 2009; **23**: 925–931.
64. Esau C, Davis S, Murray SF, Yu XX, Pandey SK, Pear M, Watts L, Booten SL, Graham M, McKay R, Subramaniam A, Propp S, Lollo BA, Freier S, Bennett CF, Bhanot S, Monia BP. *Cell Metab*. 2006 Feb;3(2):87-98.
65. Xie H, Lim B, Lodish HF. *Diabetes*. 2009 May;58(5):1050-7.
66. Thomou T, Mori MA, Dreyfuss JM, Konishi M, Sakaguchi M, Wolfrum C, Rao TN, Winnay JN, Garcia-Martin R, Grinspoon SK, Gorden P, Kahn CR. *Nature*. 2017 Feb 23;542(7642):450-455.

67. Chen Y, Buyel JJ, Hanssen MJ, Siegel F, Pan R, Naumann J, Schell M, van der Lans A, Schlein C, Froehlich H, Heeren J, Virtanen KA, van Marken Lichtenbelt W, Pfeifer A. *Nat Commun.* 2016 Apr 27;7:11420.
68. Iacomino G, Russo P, Stillitano I, Lauria F, Marena P, Ahrens W, De Luca P, Siani A. *Genes Nutr.* 2016 Mar 21;11:7.
69. Cinti S *Proc Nutr Soc.* 2001 Aug;60(3):319-28
70. Mori MA, Raghavan P, Thomou T, Boucher J, Robida-Stubbs S, Macotela Y, Russell SJ, Kirkland JL, Blackwell TK, Kahn CR. *Cell Metab.* 2012 Sep 5;16(3):336-47.
71. Mori MA, Thomou T, Boucher J, Lee KY, Lallukka S, Kim JK, Torriani M, Yki-Järvinen H, Grinspoon SK, Cypess AM, Kahn CR. *J Clin Invest.* 2014 Aug;124(8):3339-51
72. O'Connell RM, Taganov KD, Boldin MP, Cheng G, Baltimore D. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2007 Jan 30;104(5):1604-9.
73. Gironella M, Seux M, Xie MJ, Cano C, Tomasini R, Gommeaux J, Garcia S, Nowak J, Yeung ML, Jeang KT, Chaix A, Fazli L, Motoo Y, Wang Q, Rocchi P, Russo A, Gleave M, Dagorn JC, Iovanna JL, Carrier A, Pébusque MJ, Dusetti NJ. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2007 Oct 9;104(41):16170-5.
74. Kluiver J, Poppema S, de Jong D, Blokzijl T, Harms G, Jacobs S, Kroesen BJ, van den Berg A. *J Pathol.* 2005 Oct;207(2):243-9.
75. Choi S, Kim J, Kim JH, Lee DK, Park W, Park M, Kim S, Hwang JY, Won MH, Choi YK, Ryoo S, Ha KS, Kwon YG, Kim YM. *Exp Mol Med.* 2017 Nov 24;49(11):e403.
76. Karkeni E, Astier J, Tourniaire F, El Abed M, Romier B, Gouranton E, Wan L, Borel P, Salles J, Walrand S, Ye J, Landrier JF. Karkeni E, Astier J, Tourniaire F, El Abed M, Romier B, Gouranton E, Wan L, Borel P, Salles J, Walrand S, Ye J, Landrier JF.
77. Eguchi A, Lazic M(1), Armando AM, Phillips SA, Katebian R, Maraka S, Quehenberger O, Sears DD, Feldstein AE. *J Mol Med (Berl).* 2016 Nov;94(11):1241-1253.
78. Gaudet AD, Fonken LK, Gushchina LV, Aubrecht TG, Maurya SK, Periasamy M, Nelson RJ, Popovich PG. *Sci Rep.* 2016 Mar 8;6:22862.
79. Haigis MC, Sinclair DA. *Annu Rev Pathol.* 2010;5:253-95.
80. Kaerberlein M, McVey M, Guarente L. *Genes Dev.* 1999 Oct 1;13(19):2570-80.
81. Tissenbaum HA, Guarente L. *Nature.* 2001 Mar 8;410(6825):227-30.
82. Rogina B, Helfand SL. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2004 Nov 9;101(45):15998-6003.
83. Howitz KT, Bitterman KJ, Cohen HY, Lamming DW, Lavu S, Wood JG, Zipkin RE, Chung P, Kisielewski A, Zhang LL, Scherer B, Sinclair DA. *Nature.* 2003 Sep 11;425(6954):191-6.
84. Guarente L *Cold Spring Harb Symp Quant Biol.* 2011;76:81-90.
85. Braidly N, Guillemin GJ, Mansour H, Chan-Ling T, Poljak A, Grant R. *PLoS One.* 2011 Apr 26;6(4):e19194.
86. Stein LR, Imai S. *EMBO J.* 2014 Jun 17;33(12):1321-40.
87. Baur JA, Ungvari Z, Minor RK, Le Couteur DG, de Cabo R. *Nat Rev Drug Discov.* 2012 Jun 1;11(6):443-61

88. Khan SA, Sathyanarayan A, Mashek MT, Ong KT, Wollaston-Hayden EE, Mashek DG. *Diabetes*. 2015 Feb;64(2):418-26.
89. Jin Q, Zhang F, Yan T, Liu Z, Wang C, Ge X, Zhai Q. *Cell Res*. 2010 Apr;20(4):470-9.
90. Xu C, Bai B, Fan P, Cai Y, Huang B, Law IK, Liu L, Xu A, Tung C, Li X, Siu FM, Che CM, Vanhoutte PM, Wang Y. *Am J Transl Res*. 2013 May 24;5(4):412-26.
91. Chalkiadaki A, Guarente L. *Cell Metab*. 2012 Aug 8;16(2):180-8.
92. Yoshizaki T, Milne JC, Imamura T, Schenk S, Sonoda N, Babendure JL, Lu JC, Smith JJ, Jirousek MR, Olefsky JM. *Mol Cell Biol*. 2009 Mar;29(5):1363-74.
93. Song YS, Lee SK, Jang YJ, Park HS, Kim JH, Lee YJ, Heo YS. *Diabetes Res Clin Pract*. 2013 Sep;101(3):341-8.
94. Pfluger PT, Herranz D, Velasco-Miguel S, Serrano M, Tschöp MH. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2008 Jul 15;105(28):9793-8.
95. Martínez-Jiménez V, Cortez-Espinosa N, Rodríguez-Varela E, Vega-Cárdenas M, Briones-Espinoza M, Ruíz-Rodríguez VM, López-López N, Briseño-Medina, Turiján-Espinoza E, Portales-Pérez DP. *Diabetes Metab Syndr*. 2019 Jan - Feb;13(1):582-589
96. Rajamani K, Lin YC, Wen TC, Hsieh J, Subeq YM, Liu JW, Lin PC, Harn HJ, Lin SZ, Chiou TW. *Cell Transplant*. 2015;24(3):493-507
97. Stout MB, Tchkonina T, Pirtskhalava T, Palmer AK, List EO, Berryman DE, Lubbers ER, Escande C, Spong A, Masternak MM, Oberg AL, LeBrasseur NK, Miller RA, Kopchick JJ, Bartke A, Kirkland JL. *Aging (Albany NY)*. 2014 Jul;6(7):575-86
98. Fontana L, Klein S. *JAMA*. 2007 Mar 7;297(9):986-94.
99. Stout MB, Steyn FJ, Jurczak MJ, Camporez JG, Zhu Y, Hawse JR, Jurk D, Palmer AK, Xu M, Pirtskhalava T, Evans GL, de Souza Santos R, Frank AP, White TA, Monroe DG, Singh RJ, Casacang-Verzosa G, Miller JD, Clegg DJ, LeBrasseur NK, von Zglinicki T, Shulman GI, Tchkonina T, Kirkland JL. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci*. 2017 Jan;72(1):3-15.
100. Martin-Montalvo A, Mercken EM, Mitchell SJ, Palacios HH, Mote PL, Scheibye-Knudsen M, Gomes AP, Ward TM, Minor RK, Blouin MJ, Schwab M, Pollak M, Zhang Y, Yu Y, Becker KG, Bohr VA, Ingram DK, Sinclair DA, Wolf NS, Spindler SR, Bernier M, de Cabo R. *Nat Commun*. 2013;4:2192.
101. Bannister CA, Holden SE, Jenkins-Jones S, Morgan CL, Halcox JP, Scherthaner G, Mukherjee J, Currie CJ. *Diabetes Obes Metab*. 2014 Nov;16(11):1165-73.
102. Harris MI, Klein R, Welborn TA, Knudman MW. *Diabetes Care*. 1992 Jul;15(7):815-9.
103. Gomes A, Fernandes E, Lima JL, Mira L, Corvo ML. *Curr Med Chem*. 2008;15(16):1586-605.
104. Pietta PG. *J Nat Prod*. 2000 Jul;63(7):1035-42.
105. Amaral S, Mira L, Nogueira JM, da Silva AP, Helena Florêncio M. *Bioorg Med Chem*. 2009 Mar 1;17(5):1876-83.
106. Spencer JP, Abd-el-Mohsen MM, Rice-Evans C. *Arch Biochem Biophys*. 2004 Mar 1;423(1):148-61.
107. Schroeter H, Spencer JP, Rice-Evans C, Williams RJ. *Biochem J*. 2001 Sep 15;358(Pt 3):547-57.

108. Boesch-Saadatmandi C, Loboda A, Wagner AE, Stachurska A, Jozkowicz A, Dulak J, Döring F, Wolffram S, Rimbach G. *J Nutr Biochem*. 2011 Mar;22(3):293-9.
109. Hsu CL, Yen GC. *J Agric Food Chem*. 2007 Oct 17;55(21):8404-10.
110. Chondrogianni N, Kapeta S, Chinou I, Vassilatou K, Papassideri I, Gonos ES. *Exp Gerontol*. 2010 Oct;45(10):763-71.
111. Braganhol E, Zamin LL, Canedo AD, Horn F, Tamajusuku AS, Wink MR, Salbego C, Battastini AM. *Anticancer Drugs*. 2006 Jul;17(6):663-71.
112. Xie X, Yin J, Jia Q, Wang J, Zou C, Brewer KJ, Colombo C, Wang Y, Huang G, Shen J. *Oncol Rep*. 2011 Sep;26(3):687-93.
113. Murakami A, Ashida H, Terao J. *Cancer Lett*. 2008 Oct 8;269(2):315-25.
114. Wang D, Sun-Waterhouse D, Li F, Xin L, Li D. *Crit Rev Food Sci Nutr*. 2018 Feb 15:1-13.
115. Noratto GD, Kim Y, Talcott ST, Mertens-Talcott SU. *Fitoterapia*. 2011 Jun;82(4):557-69.
116. Lam TK, Shao S, Zhao Y, Marincola F, Pesatori A, Bertazzi PA, Caporaso NE, Wang E, Landi MT. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*. 2012 Dec;21(12):2176-84.
117. Lou G, Liu Y, Wu S, Xue J, Yang F, Fu H, Zheng M, Chen Z. *Cell Physiol Biochem*. 2015;35(6):2192-202.
118. Boesch-Saadatmandi C, Loboda A, Wagner AE, Stachurska A, Jozkowicz A, Dulak J, Döring F, Wolffram S, Rimbach G. *J Nutr Biochem*. 2011 Mar;22(3):293-9.
119. Zoico E, Darra E, Rizzatti V, Tebon M, Franceschetti G, Mazzali G, Rossi AP, Fantin F, Zamboni M. *Int J Obes (Lond)*. 2018 Mar;42(3):344-352.
120. Khanh VC, Zulkifli AF, Tokunaga C, Yamashita T, Hiramatsu Y, Ohneda O. *Biochem Biophys Res Commun*. 2018 Jun 7;500(3):682-690.
121. Zhu Y, Tchkonina T, Pirtskhalava T, Gower AC, Ding H, Giorgadze N, Palmer AK, Ikeno Y, Hubbard GB, Lenburg M, O'Hara SP, LaRusso NF, Miller JD, Roos CM, Verzosa GC, LeBrasseur NK, Wren JD, Farr JN, Khosla S, Stout MB, McGowan SJ, Fuhrmann-Stroissnigg H, Gurkar AU, Zhao J, Colangelo D, Dorronsoro A, Ling YY, Barghouthy AS, Navarro DC, Sano T, Robbins PD, Niedernhofer LJ, Kirkland JL. *Aging Cell*. 2015 Aug;14(4):644-58.
122. Vazquez Prieto MA, Bettaieb A, Rodriguez Lanzi C, Soto VC, Perdicaro DJ, Galmarini CR, Haj FG, Miatello RM, Oteiza PI. *Mol Nutr Food Res*. 2015 Apr;59(4):622-33.
123. Noh HJ, Kim CS, Kang JH, Park JY, Choe SY, Hong SM, Yoo H, Park T, Yu R. *J Med Food*. 2014 May;17(5):550-7.
124. Hwang EC, Gandhi S, Jung JH, Imamura M, Kim MH, Pang R, Dahm P. *Cochrane Database Syst Rev*. 2018 Oct 11;10:CD007360.