



UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI PISA

Scuola di Specializzazione in Biochimica Clinica

***Ormoni tiroidei e tessuto adiposo:
effetti dell'obesità e dello stato funzionale
tiroideo periferico***

Relatori:

Dott.ssa Monica Nannipieri

Prof. Antonio Lucacchini

Candidata:

Dott.ssa Daria Colligiani

Anno Accademico 2012/2013

*Dedicato
a mia madre Anna,
a mio fratello Elio
e al mio fidanzato, Riccardo.*

*“Everything seems impossible until it's done”
N. Mandela*

Indice

Indice	3
Riassunto	5
Introduzione	8
1. L'obesità	9
1.1 Classificazione e aspetti clinici dell'obesità	9
1.2 Aspetti sociali ed economici	11
2. Conseguenze dell'obesità su organi e apparati	12
2.1 L'insulina	12
2.2 L'insulino-resistenza	14
2.3 Infiammazione e insulino-resistenza	15
2.4 Il diabete mellito di tipo 2 (T2DM)	15
2.5 La steatoepatite non-alcoolica (NAFLD)	17
3. La chirurgia dell'obesità	18
4. L'organo adiposo	21
4.1 La plasticità dell'organo adiposo	22
4.2 Effetti della temperatura ambientale sull'organo adiposo	22
4.3 La teoria della transdifferenziazione	23
4.4 Effetti dell'eccesso calorico sull'organo adiposo	24
4.5 Istopatologia dell'organo adiposo obeso	26
5. La tiroide e la regolazione del bilancio energetico	28
5.1 Anatomia e fisiologia della tiroide	28
5.2 Azione degli ormoni tiroidei sul fegato	31
5.3 Azione degli ormoni tiroidei sul tessuto muscolare cardiaco	32
5.4 Azione degli ormoni tiroidei sul tessuto adiposo	33
5.5 La funzione tiroidea nell'obesità severa	35
6. Scopo della tesi	36

Materiali e metodi	37
1. Metodi utilizzati	38
1.1 Quantificazione dell'espressione genica delle deiodinasi nel tessuto adiposo viscerale umano mediante real-time PCR	38
<i>Estrazione dell'RNA totale</i>	38
<i>Sintesi del cDNA</i>	38
<i>Selezione dei primers di real-time PCR e loro messa a punto</i>	39
<i>Principi della quantificazione relativa dell'espressione genica delle deiodinasi</i>	40
<i>Condizioni di real-time PCR</i>	42
<i>Analisi dei dati di real-time PCR</i>	42
<i>Elettroforesi su gel d'acrilammide e colorazione all'argento</i>	42
1.2 Quantificazione degli ormoni tiroidei intratissutali mediante spettrometria di massa	43
<i>Estrazione degli analiti</i>	43
<i>Derivatizzazione</i>	44
<i>Curve di calibrazione</i>	45
<i>Principi della spettrometria di massa accoppiata all'HPLC</i>	45
<i>La ionizzazione elettrospray</i>	46
<i>La spettrometria di massa a triplo quadrupolo</i>	47
<i>Metodo di analisi</i>	48
<i>Strumentazione e reagenti</i>	49
2. Materiali utilizzati	49
2.1 Studi sull'uomo: partecipanti e disegno sperimentale	49
2.2 Studi sul ratto: modello animale e disegno sperimentale	50
3. Analisi statistica	51
 Risultati	 52
1. Studi sull'uomo	53
2. Studi sul ratto	55
 Discussione	 58
 Riferimenti bibliografici	 63
 Ringraziamenti	 75

Riassunto

L'organo adiposo è estremamente plastico: gli adipociti bruni e bianchi che compongono i suoi depositi viscerali e sottocutanei possono transdifferenziare uno nell'altro conferendo al tessuto proprietà termogeniche o di riserva energetica a seconda delle necessità.

Il bilancio energetico è principalmente regolato dalla ghiandola tiroidea mediante un classico asse ipotalamico-ipofisario. A livello periferico, l'azione degli ormoni tiroidei T3 e T4 è mediata dalle deiodinasi tissutali D1, D2 e D3 e da specifici recettori nucleari (TR).

L'obesità è una patologia multifattoriale in cui la deposizione di grasso nei tessuti magri induce uno stato congiunto di infiammazione e insulino-resistenza: il profilo infiammatorio delle persone obese (IMC ≥ 30 kg/m²) è alla base di patologie come il diabete di tipo 2 (T2DM) e la steatosi epatica non alcolica (NAFLD). Nei pazienti con obesità severa (IMC ≥ 40 kg/m²) l'approccio chirurgico risulta essere il più efficace nell'indurre un importante calo ponderale che possa essere mantenuto nel tempo.

Le informazioni relative alla condizione tiroidea nell'obesità severa sono discordanti: molti lavori descrivono un'elevata concentrazione plasmatica di TSH (*Thyroid Stimulating Hormone*) e di fT3 in soggetti obesi, mentre altri non confermano tali dati. Alcuni lavori riportano anche una ridotta espressione genica dei relativi recettori (TSHR, TR α 1) nel tessuto adiposo. L'inversione di tendenza che si osserva dopo perdita di peso suggerisce un ruolo dell'obesità nel regolare l'asse tiroideo, piuttosto che il contrario.

Scopo principale del presente progetto di tesi è stato quindi quello di valutare in soggetti eutiroidei con obesità grave e/o T2DM le concentrazioni nel tessuto adiposo viscerale di T3 e T4 e l'espressione genica delle deiodinasi (D1, D2, D3) in relazione alle concentrazioni di ormoni circolanti e confrontarli con i soggetti sani di controllo.

Scopo secondario è stato quello di valutare *in vivo* nell'animale (ratto) in varie condizioni di funzione tiroidea (ipertiroidismo o ipotiroidismo), le concentrazioni di ormoni tiroidei in diversi distretti del tessuto adiposo (viscerale e sottocutaneo).

A tal fine, l'espressione genica relativa delle tre deiodinasi nell'uomo è stata quantificata nel tessuto adiposo viscerale di 57 Obesi-NGT, 48 Obesi-IGT/T2DM e in 19 controlli mediante real-time PCR. I dati sono stati integrati con i valori relativi a profilo lipidico, dosaggi ormonali (fT3, fT4, TSH) e misurazioni antropometriche. Per un sottogruppo di pazienti (26 Obesi-NGT, 14 Obesi-IGT/T2DM, 4 controlli) T3 e T4 sono stati dosati mediante spettrometria di massa (HPLC-MS-MS) previa estrazione di tipo liquido-liquido degli analiti dal tessuto omogenato ed opportunamente trattato.

La medesima procedura è stata seguita per i dosaggi ormonali nei tessuti adiposi viscerali e sottocutanei di 16 ratti Wistar: 3 ipertiroidi, 4 ipotiroidi, 4 trattati con T3 esogena (2 ad alto dosaggio e 2 a basso dosaggio), 5 controlli. Sul sangue periferico sono stati dosati fT3 e fT4

circolanti.

I dati ottenuti sull'uomo indicano variazioni non significative dell'espressione genica e dei dosaggi ormonali intratissutali nei 3 gruppi di soggetti a fronte di fT3 più elevati in circolo in soggetti obesi, indipendentemente dalla presenza di diabete. Il rapporto di conversione T3/T4 è correlato positivamente con l'espressione genica di D1 e D2.

Nel ratto, l'ipotiroidismo o l'ipertiroidismo indotti sono confermati sia dai livelli degli ormoni circolanti che di quelli tissutali, sia nel viscerale che nel sottocutaneo. Inoltre, mentre T3 e T4 sono significativamente più concentrate nel sottocutaneo rispetto al viscerale, il rapporto di conversione T3/T4 subisce un'inversione di tendenza. Si osserva infine una correlazione positiva tra i rapporti di conversione plasmatico e tissutale in entrambi i depositi adiposi.

Nel loro insieme, i dati ottenuti indicano un'ottima corrispondenza metodologica tra i dosaggi plasmatici e tissutali ed un'elevata affidabilità della real-time PCR confermando la buona messa a punto delle procedure utilizzate. In un'ottica futura, sarebbe interessante approfondire le differenze nel captare/convertire gli ormoni tiroidei da parte dei depositi adiposi studiati, magari analizzando l'attività deiodasica periferica.

Introduzione

1. L'obesità

L'obesità è una condizione medica in cui si osserva un accumulo di grasso corporeo in eccesso che può avere effetti negativi sulla salute e, di conseguenza, sull'aspettativa di vita. È tipica, ma non esclusiva, delle cosiddette società “del benessere” ed è ormai riconosciuta come una patologia multifattoriale in quanto è quasi sempre correlata ad altre malattie che possono interessare molti distretti dell'organismo (diabete mellito di tipo 2, disfunzioni cardiocircolatorie, steatosi epatica non alcolica ecc.).

Il termine *obesità* deriva dal latino *obesitas* che significa “grasso, grosso o paffuto”. *Es*um è il participio passato di *edere* (mangiare) con *ob* (per, a causa di) aggiunto. Non a caso la principale causa dell'obesità è l'assunzione di una quantità eccessiva di energia alimentare a cui si possono aggiungere altri fattori come la mancanza di attività fisica e la predisposizione genetica. L'eccesso di calorie assunte deriva soprattutto dall'aumentato consumo di carboidrati piuttosto che di grassi¹.

La disponibilità di energia alimentare pro capite è molto cambiata nel corso del tempo e varia significativamente da una regione all'altra del pianeta² determinando la prevalenza della malattia degli ultimi anni³ (Fig. 1).

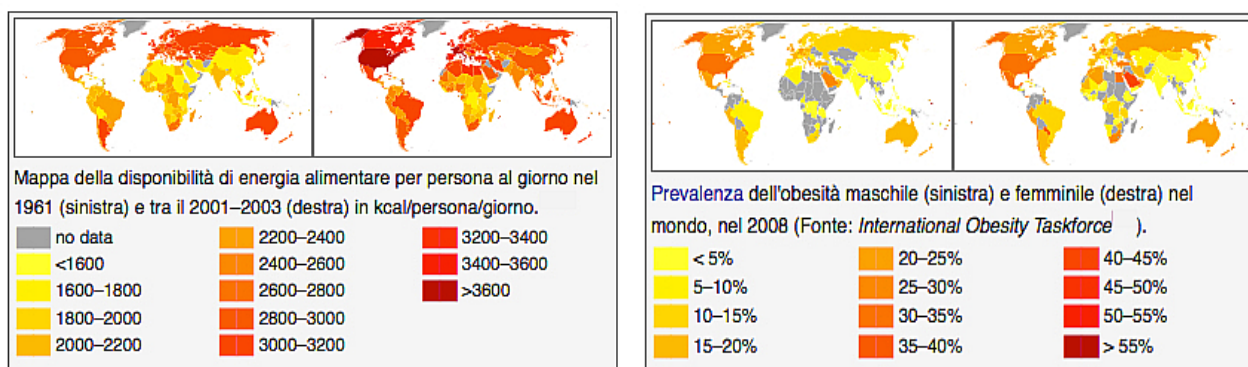


Fig. 1^{2,3} Tra il 1970 e la fine degli anni 90 la quantità di alimenti acquistati è aumentata in tutto il mondo: in testa troviamo gli Stati Uniti con 3654 calorie pro capite. Il consumo ha continuato ad aumentare tanto che dal 1971 al 2000, sempre negli Stati Uniti, i tassi di obesità sono aumentati dal 14,5 % al 30,9 %. Nel 1997 l'Organizzazione Mondiale della Sanità riconosce l'obesità come un'epidemia globale. Nel 2005 si stima che 400 milioni di adulti siano obesi con un tasso maggiore in Stati Uniti, Australia e Canada. Oggi la patologia è in aumento anche nei paesi in via di sviluppo. L'unica regione dove l'obesità non è frequente è l'Africa subsahariana.

Ogni anno 28 milioni di persone muoiono per le conseguenze di sovrappeso e obesità⁴. Questi numeri sono costantemente in crescita e destano molta preoccupazione nell'opinione pubblica dal momento che le conseguenze negative della patologia iniziano già nella prima infanzia. Alcuni esperti presagiscono che durante la prima metà del ventunesimo secolo, negli Stati Uniti ci sarà una diminuzione dell'aspettativa di vita alla nascita⁵.

1.1 Classificazione e aspetti clinici dell'obesità

Lo strumento antropometrico più comunemente usato per classificare l'obesità è il *IMC* (*Indice di*

Massa Corporea) che si esprime come il rapporto tra il peso corporeo e il quadrato dell'altezza (kg/m^2). Gli individui con $\text{IMC} < 18.5 \text{ kg}/\text{m}^2$ sono considerati sottopeso mentre quelli con un IMC compreso tra 18.5 e $24.9 \text{ kg}/\text{m}^2$ sono classificati come aventi un peso normale o accettabile. Gli individui con un IMC che va da 25 a $29.9 \text{ kg}/\text{m}^2$ sono classificati come sovrappeso mentre l'obesità è presente quando il IMC raggiunge $\geq 30 \text{ kg}/\text{m}^2$. Oltre quel valore, l'obesità si divide in 3 categorie: il grado 1 (IMC da 30 a $34.9 \text{ kg}/\text{m}^2$), il grado 2 (IMC da 35 a $39.9 \text{ kg}/\text{m}^2$), e il grado 3 (IMC $\geq 40 \text{ kg}/\text{m}^2$)⁶. La American Heart Association ha poi proposto sottogruppi di obesità supplementari introducendo l'obesità di grado 4, che corrisponde a $\text{IMC} \geq 50 \text{ kg}/\text{m}^2$ e il grado 5 per $\text{IMC} \geq 60 \text{ kg}/\text{m}^2$ ^{7,8} (Fig.2).

Classification of body weight.	
Underweight	BMI $< 18.5 \text{ kg}/\text{m}^2$
Normal or acceptable weight	BMI 18.5–24.9 kg/m^2
Overweight	BMI 25–29.9 kg/m^2
Obese	BMI $\geq 30 \text{ kg}/\text{m}^2$
Grade 1	BMI 30–34.9 kg/m^2
Grade 2	BMI 35.0–39.9 kg/m^2
Grade 3	BMI $\geq 40 \text{ kg}/\text{m}^2$ (severe, extreme, or morbid obesity)
Grade 4	BMI $\geq 50 \text{ kg}/\text{m}^2$
Grade 5	BMI $\geq 60 \text{ kg}/\text{m}^2$

Fig.2⁹ Classificazione dell'obesità in base al IMC (o BMI, Body Mass Index)

Un elevato IMC è associato allo sviluppo di fattori di rischio cardiovascolare come ipertensione, dislipidemia, insulino-resistenza e diabete mellito di tipo 2 che portano a disturbi cardiovascolari (CVD, *CardioVascular Disease*) come la malattia coronarica (CHD, *Coronary Heart Disease*) e l'ictus ischemico¹⁰⁻¹². Lo sviluppo di queste comorbilità è proporzionale al IMC. La più alta incidenza di CVD nei pazienti obesi sembra essere collegata a disfunzione endoteliale e infiammazione subclinica, oltre al peggioramento dei fattori di rischio di CVD¹³. L'accumulo di grasso corporeo in eccesso porta infatti ad una serie di cambiamenti metabolici che interessano i sistemi che modulano l'infiammazione¹⁴.

Oltre a contribuire al CVD come un fattore di rischio indipendente, l'obesità favorisce alterazioni in altri fattori di rischio intermedi come la dislipidemia, l'ipertensione, l'intolleranza al glucosio, la condizione infiammatoria ecc¹². L'eccesso calorico cronico induce l'accumulo di acidi grassi liberi nel tessuto adiposo finché la sua capacità di contenimento arriva alla saturazione, portando ad una fuoriuscita di lipidi che vengono quindi accumulati nei tessuti normalmente magri come il fegato, i muscoli e nei depositi adiposi intra-addominali o viscerali. Tale deposizione di grasso “ectopico” induce uno stato congiunto di infiammazione e insulino-resistenza¹⁵. Nell'obesità infatti sono alterati i livelli di molti mediatori dell'infiammazione. In primo luogo, i livelli di *proteina c-reattiva (CRP)*

circolante e di *fattore di necrosi tumorale (TNF)* (prodotti dal tessuto adiposo) sono aumentati, ma altri mediatori (come IL-6 e -1β) e ormoni (come adiponectina e leptina) sono anche noti come potenziali contributori al profilo infiammatorio osservato nell'obesità, in particolare nell'obesità addominale^{15,16} (Fig.3).

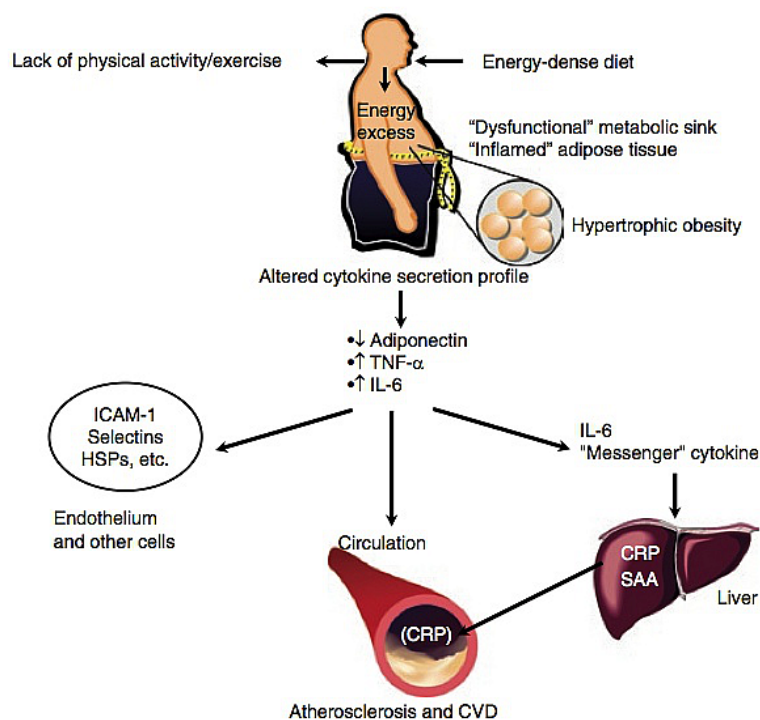


Fig. 3¹⁷ Il tessuto adiposo "infiammato" nell'obesità viscerale

1.2 Aspetti sociali ed economici

Secondo l'Organizzazione Mondiale della Sanità in un futuro non molto lontano il sovrappeso e l'obesità potrebbero sostituire quelli che oggi sono considerati i principali problemi di salute pubblica ovvero la denutrizione e le malattie infettive¹⁸. Pertanto, l'approccio al problema da parte degli organismi di sanità pubblica consiste nell'intervenire sulla componente ambientale del fenomeno i cui principali fattori sono la dieta e l'attività fisica. I contesti su cui si può intervenire sono tre: a "monte" del problema con l'osservazione dei cambiamenti della società, nel "mezzo" con tentativi mirati a modificare il comportamento degli individui e il loro stile di vita, a "valle" con il trattamento delle persone colpite dall'obesità¹⁹. Si cerca quindi di incentivare l'uso delle mense scolastiche dove vengono serviti cibi selezionati e promuovere l'utilizzo di parchi pubblici e piste ciclabili e pedonali²⁰.

Le persone obese purtroppo devono far fronte a svantaggi occupazionali, oltre che ai loro problemi di salute. Alcune ricerche dimostrano che costoro hanno meno probabilità di essere assunte per un lavoro o di essere promosse²¹. Inoltre, vengono anche mediamente pagate meno dei loro omologhi

non-obesi. Le donne obese, in media, rendono il 6 % in meno e gli uomini obesi circa il 3 % in meno²².

Non meno importante dell'aspetto sociale della malattia è il suo impatto economico su tutti i livelli della società. Solo degli Stati Uniti la stima della spesa per i prodotti dietetici va dai 40 miliardi ai 100 miliardi di dollari l'anno²³. Le compagnie aeree devono affrontare costi maggiori del carburante e pressioni per aumentare la larghezza di posti a sedere²⁴.

È stato dimostrato che i programmi di prevenzione dell'obesità hanno ridotto il costo del trattamento delle malattie correlate ad essa. Tuttavia, le persone vivono di più e di conseguenza aumentano i costi delle spese mediche da essi sostenute. I ricercatori concludono pertanto che le problematiche relative all'obesità possono migliorare, ma è improbabile che si possano ridurre le spese sanitarie globali²⁵.

2. Conseguenze dell'obesità su organi e apparati

Come accennato in precedenza, l'eccesso calorico cronico porta all'accumulo di grasso in luoghi ectopici dell'organismo ovvero in tessuti normalmente magri come il fegato, i muscoli e nei depositi adiposi intra-addominali o viscerali inducendo uno stato congiunto di infiammazione e insulino-resistenza¹⁴ (*Fig.3*). In uno studio pubblicato nel 1947 fu osservato per la prima volta che è la distribuzione del grasso ectopico, più che l'eccesso di grasso di per sé, ad aumentare il rischio nei pazienti obesi/sovrappeso di sviluppare disfunzioni metaboliche come il diabete mellito, la steatosi epatica non alcolica, disturbi cardiovascolari ecc.²⁶ Nel recente studio *IDEA (International Day for the Evaluation of Abdominal Obesity)* è stato chiaramente dimostrato che, indipendentemente dal IMC, è la circonferenza del giro vita (un marcatore semplice dell'accumulo di grasso addominale) ad essere fortemente associata alla prevalenza del diabete di tipo 2²⁷.

Nei prossimi paragrafi prenderemo in esame più nel dettaglio l'impatto dell'obesità e dell'accumulo di grasso ectopico sulla funzionalità di organi di nostro interesse: il tessuto adiposo e il fegato. Focalizzeremo quindi la nostra attenzione sui meccanismi patogenetici del diabete mellito di tipo 2 (T2DM) e della steatoepatite non alcolica (NAFLD). Prima però è bene parlare dell'insulina e dell'insulino-resistenza, nonché della condizione infiammatoria sistemica che caratterizza l'obesità e che è alla base di entrambe le patologie sopra citate.

2.1 L'insulina

L'insulina è un importante ormone pancreatico prodotto dalle β -cellule delle isole di Langerhans che viene rilasciato nella circolazione sanguigna dopo un pasto, in risposta all'aumento del glucosio plasmatico. Viene immagazzinata nel citoplasma all'interno di vacuoli in attesa di essere rilasciata

tramite esocitosi nel circolo sanguigno, grazie al quale raggiungerà circa i 2/3 delle cellule dell'intero organismo, ossia quelle che presentano i recettori specifici per l'ormone (prevalentemente adipociti, epatociti e cellule muscolari striate) (Fig.4); fanno eccezione le cellule del sistema nervoso centrale.

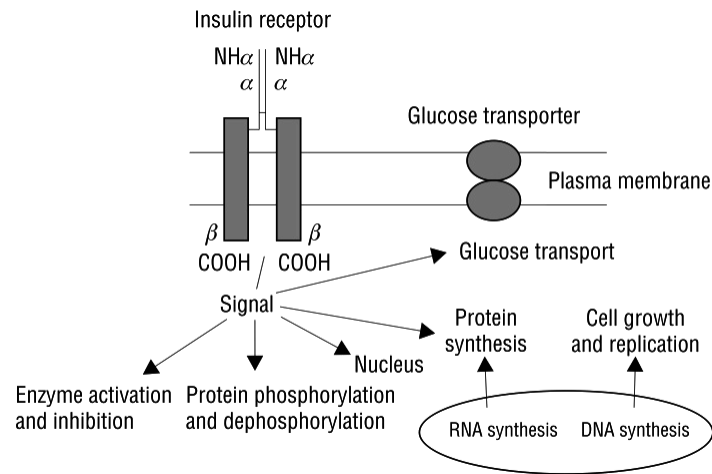


Fig.4²⁸ Struttura e funzione del recettore dell'insulina. È un eterodimero composto da due subunità α, extracellulari, e da due subunità β, transmembrana. La porzione citoplasmatica delle subunità β è dotata di attività tirosino-chinasica e contiene una regione con proprietà autofosforilanti. Una volta avvenuto il legame dell'insulina con le subunità α, le subunità β si autofosforilano e viene rilasciato uno dei tanti segnali che innescano il pathway di risposta cellulare all'ormone.

Le cellule bersaglio dell'insulina possono così assorbire il glucosio e utilizzarlo come “carburante”, convertirlo in altre molecole o immagazzinarlo. L'insulina non regola solo l'assorbimento del glucosio da parte delle cellule ma ne regola anche la glicogenosintesi e la gluconeogenesi affinché possa essere immagazzinato nel fegato e nel muscolo. Quando il livello di glucosio nel sangue si abbassa si assiste ad una minore produzione di insulina da parte delle β-cellule e alla contemporanea riconversione del glicogeno a glucosio che ritorna in circolo. L'ormone responsabile di questo processo è il *glucagone* che agisce quindi in maniera opposta all'insulina. Il fegato è il principale responsabile della concentrazione di glucosio nella condizione di digiuno perché modula la quantità di insulina che dal pancreas arriverà alla circolazione sistemica. L'iperglicemia a digiuno è scongiurata finché la produzione di glucosio epatico è sensibile all'insulina e/o le β-cellule sono sensibili a piccole variazioni del glucosio plasmatico. Dopo un pasto invece elevate concentrazioni di glucosio sono sostanzialmente determinate sia dall'abilità delle β-cellule di produrre insulina, sia dalla sensibilità all'insulina dei tessuti periferici²⁹.

L'insulina (o la sua carenza) è il principale segnale di conversione della maggiorparte dei processi bidirezionali del metabolismo da una direzione catabolica ad una anabolica (crescita e duplicazione cellulare, sintesi proteica, accumulo del grasso) e viceversa. Se la quantità di insulina è insufficiente, se le cellule rispondono poco all'insulina o se l'insulina stessa è “difettosa” l'effetto finale sarà una persistente iperglicemia, una scarsa sintesi proteica e altri squilibri metabolici.

2.2 L'insulino-resistenza

Si definisce *insulino-sensibilità* l'abilità dell'insulina di controllare la concentrazione di glucosio nel sangue stimolandone l'assorbimento nei tessuti periferici e sopprimendone la produzione da parte del fegato. Si definisce *insulino-resistenza* il malfunzionamento di questo meccanismo di regolazione.

Nell'obesità si assiste ad un accumulo di grasso ectopico. L'accumulo di grassi in organi sensibili all'insulina porta a lipotossicità³⁰⁻³². In questa condizione è disregolata la capacità del tessuto adiposo di immagazzinare trigliceridi e di secernere proteine che servono a mantenere l'omeostasi energetica. Da qui deriva inevitabilmente un profondo cambiamento nell'insulino-sensibilità dell'intero organismo e soprattutto dei singoli organi³⁰ (Fig.5).

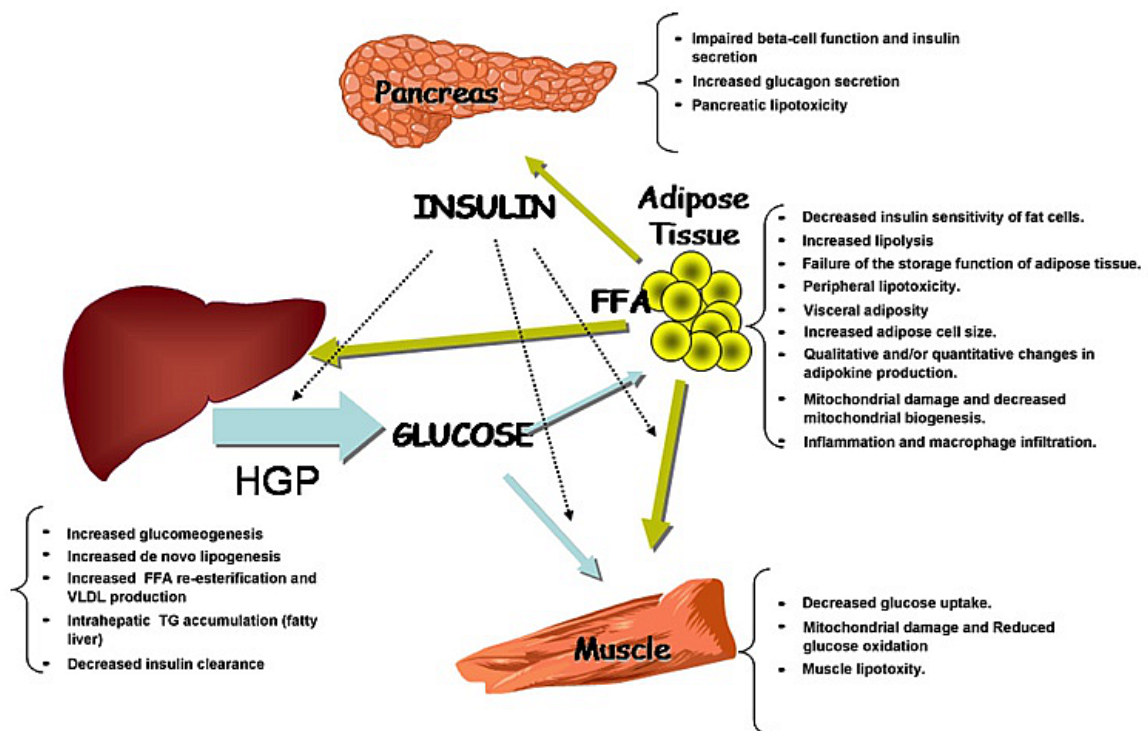


Fig.5²⁹ Siti di azione dell'insulina e danni dovuti alla presenza di insulino-resistenza (HGP, hepatic glucose production; VLDL, very low-density lipoprotein; FFAs, free fatty acids).

Sono state fatte molte ricerche per riuscire a collegare la lipotossicità da eccesso di lipidi all'insulino-resistenza degli organi colpiti. In particolare ci si è concentrati sulle numerose molecole che il tessuto adiposo bianco secerne: gli ormoni (adiponectina) e le proteine segnale (adipocitochine) perché queste includono proteine coinvolte nella regolazione del bilancio energetico, nel metabolismo del glucosio e dei lipidi così come nell'infiammazione, nell'angiogenesi e nella regolazione della pressione sanguigna³³. In condizioni fisiologiche l'adiponectina ha un'azione protettiva perché promuove l'assorbimento del glucosio da parte del tessuto adiposo³⁴: al bisogno fa aumentare l'insulino-sensibilità promuovendo l'ossidazione dei grassi tissutali e portando

quindi ad un abbassamento degli acidi grassi liberi circolanti e dei trigliceridi intratissutali epatici e muscolari³⁵. Nonostante sia secreta dal tessuto adiposo però, negli individui obesi vengono meno le sue proprietà protettive: nel 2007 Nannipieri *e coll.*³⁶ osservano che l'obesità è associata ad una diminuita espressione del gene dell'adiponectina e dei suoi recettori nel tessuto adiposo addominale, insieme ad una concentrazione intracellulare e circolante più bassa della proteina. La diminuzione dei recettori potrebbe essere la conseguenza del cambiamento del fenotipo dell'adipocita: da cellula piccola e insulino-sensibile a cellula espansa e insulino-resistente.

Un altro fattore che è stato visto contribuire all'insulino-resistenza nell'obesità è l'aumentato livello di acidi grassi liberi di origine adipocitica che inibirebbe l'assorbimento del glucosio da parte del muscolo scheletrico e la sintesi del glicogeno³⁷.

2.3 Infiammazione e insulino-resistenza

Le alterazioni appena descritte sono solo alcune di quelle che rientrano nel profilo infiammatorio che si osserva nell'obesità addominale (*Fig.3*).

La crescita eccessiva del tessuto adiposo, come nell'obesità, richiede un maggiore apporto ematico e il flusso sanguigno totale nel tessuto adiposo è globalmente aumentato. Tuttavia, la perfusione per unità di tessuto adiposo diminuisce con l'aumento dell'adiposità. La differenza nella perfusione può rappresentare una riduzione del 35 % nella perfusione relativa quando un individuo obeso è confrontato con un non obeso di controllo³⁸. Questo cambiamento nella perfusione porta ad una diminuzione relativa dell'apporto di ossigeno agli adipociti che contribuisce all'insorgenza di ipossia cellulare, disfunzione e stress dell'organo, risposte pro-infiammatorie e disturbo metabolico^{39,40}. In più, in questa condizione di ipossia le cellule secernono chemochine attiranti i macrofagi, le quali possono portare alla secrezione di vari fattori pro-infiammatori, le adipocitochine, appunto^{41,42}. L'obesità porta ad uno spostamento da macrofagi attivati “in maniera alternativa” (conosciuti per la loro funzione protettiva nell'omeostasi metabolica) a macrofagi attivati “in maniera classica” (caratterizzati dalla produzione di fattori pro-infiammatori come IL-6 e la ossido nitrico sintasi 2), una condizione pro-infiammatoria che contribuisce all'insulino-resistenza^{43,44}. Avremo modo di approfondire in seguito gli aspetti strettamente istologici e cellulari del tessuto adiposo e dell'adipocita infiammato.

2.4 Il diabete mellito di tipo 2 (T2DM)

Come appena detto, i soggetti che presentano un accumulo di grasso prevalentemente viscerale hanno valori plasmatici aumentati delle adipocitochine coinvolte nell'infiammazione (IL-1 β , IL-6, IL-8, IL-10, TNF- α e TGF- β)^{33,45}. Per questo motivo è stato ipotizzato che l'obesità viscerale e

l'infiammazione all'interno del tessuto adiposo bianco possano contribuire in maniera cruciale al manifestarsi dell'insulino-resistenza e del diabete mellito di tipo 2^{46,47} anche se in uno studio recente è stato dimostrato che in soggetti obesi l'immuno-resistenza è legata più alla presenza della steatosi epatica piuttosto che all'accumulo di grasso viscerale⁴⁸. Ciò è dovuto al fatto che nel grasso viscerale dei soggetti obesi viene rilasciata nella circolazione portale un'alta quantità di acidi grassi liberi e glicerolo⁴⁹ (Fig.5).

Il diabete mellito di tipo 2 (T2DM) è la forma più frequente di diabete (9 casi su 10) rispetto alle forme più comuni (il tipo 1 e il diabete gestazionale) ed è una condizione in cui l'organismo è resistente all'insulina da lui stesso prodotta con conseguente accumulo di glucosio nel sangue (iperglicemia); nella fase iniziale della malattia il pancreas produce più insulina in risposta all'insulino-resistenza instauratasi ma con il passare del tempo le β -cellule si danneggiano e la produzione di insulina ne risulta gravemente compromessa. Elevati livelli di glucosio nel sangue a lungo termine possono danneggiare nervi e vasi sanguigni portando a disturbi cardiaci, infarto, danni renali, cecità e amputazioni degli arti.

Molte persone destinate a sviluppare il T2DM hanno trascorso molti anni in uno stato di “pre-diabete”, una condizione che si verifica quando i livelli di glucosio nel sangue sono più alti della norma ma non abbastanza da consentire la diagnosi di T2DM⁵⁰. Tra i fattori di rischio della malattia troviamo, oltre all'obesità (che affligge circa il 55 % dei pazienti con T2DM⁵¹), l'invecchiamento (anche se il disturbo può insorgere a qualsiasi età), l'inattività fisica e la familiarità. Chi ha un parente di primo grado affetto da T2DM rischia maggiormente di sviluppare la malattia; inoltre, la concordanza tra gemelli monozigoti è quasi del 100%⁵².

Dall'inizio degli anni 2000 il T2DM ha iniziato ad interessare sempre più bambini e adolescenti, probabilmente in seguito all'aumento della prevalenza dell'obesità infantile degli ultimi decenni in alcune regioni del pianeta⁵³ (Fig.1). Come l'obesità, il T2DM è presente in tutto il mondo ma è più comune nei paesi sviluppati: qui l'aumento dell'incidenza va di pari passo con l'urbanizzazione e il cambiamento dello stile di vita o, meglio, con l'introduzione di una dieta “in stile occidentale”. Secondo la World Health Organization nel 2000 le persone diabetiche erano 171 milioni (il 2.8 % della popolazione) e si stima che nel 2030 la sua incidenza sarà raddoppiata⁵⁴ predicendo una vera e propria epidemia⁵⁵.

La “gestione” del diabete, intesa sia come strategia di prevenzione che come approccio terapeutico, si basa prima di tutto su modifiche alla dieta e sullo svolgimento di attività fisica. In un importante studio, il *Diabetes Prevention Program (DPP)*⁵⁶ è stato dimostrato come persone con prediabete siano capaci di ridurre notevolmente il rischio di sviluppare diabete perdendo dal 5 % al 7 % del loro peso corporeo seguendo una dieta a basso contenuto lipidico e calorico e svolgendo

regolarmente attività fisica. Addirittura, a 10 anni dal DPP una perdita di peso modesta era in grado di ritardare l'insorgenza del T2DM di 4 anni, in media. Anche l'assunzione a scopo profilattico del farmaco metformina, che aumenta l'efficacia dell'insulina, è in grado di ritardare la progressione del prediabete a T2DM⁵⁷. Essendo il T2DM una patologia cronica, gli accorgimenti appena descritti sono teoricamente utili per limitare le complicazioni a breve e a lungo termine della malattia.

In ultima analisi, oltre l'approccio farmacologico c'è l'approccio chirurgico: è noto da qualche anno che gli interventi di chirurgia bariatrica possono indurre remissione della patologia nel 60-80 % dei pazienti con obesità severa e diabete. Quale sia il meccanismo alla base di questo fenomeno è ancora intenso oggetto di ricerca. Questi miglioramenti infatti non sono riconducibili unicamente alla perdita di peso perché la riduzione di glucosio ematico previene qualsiasi variazione della massa corporea. Questo approccio chirurgico potrebbe diventare nel prossimo futuro il trattamento standard per le persone obese affette da T2DM⁵⁸. A questo argomento dedicheremo il capitolo 3 dell'introduzione.

2.5 La steatoepatite non alcolica (NAFLD)

È possibile distinguere due ampie categorie di steatosi epatica: quella “alcolica” o *AFLD (Alcoholic Fatty Liver Disease)* e quella “non alcolica” o *NAFLD (Non-Alcoholic Fatty Liver Disease)*. Quest'ultima comprende uno spettro morfologico di lesioni epatiche che va dal semplice accumulo di trigliceridi negli epatociti (steatosi epatica) a lesioni infiammatorie (steatoepatite non-alcolica o NASH) fino ad arrivare col tempo a cirrosi e carcinoma epatocellulare⁵⁹. Mentre la NASH è una condizione con un elevato potenziale di progressione a cirrosi, la steatosi semplice sembra avere un decorso più benigno, in quanto la progressione del danno epatico è di lieve entità o assente⁶⁰.

L'obesità, il diabete mellito, l'ipertensione e la dislipidemia sono tutti fattori di rischio associati alla steatosi semplice e alla NASH⁶¹. Sembra che a giocare un ruolo significativo nella patogenesi della steatosi epatica siano fondamentalmente tre fattori: una diminuita capacità di ossidare gli acidi grassi, un'aumentata distribuzione e trasporto di acidi grassi liberi nel fegato e un'aumentata sintesi epatica degli acidi grassi⁶²⁻⁶⁴. Inoltre, la steatosi è chiaramente ed inestricabilmente legata a modifiche delle funzioni mitocondriali^{65,66}. Il mitocondrio infatti ha un ruolo importante nel metabolismo dell'epatocita perché è la sede principale dell'ossidazione degli acidi grassi e della fosforilazione ossidativa. Sono molti gli enzimi coinvolti nella β -ossidazione mitocondriale e deficienze anche parziali di questi enzimi possono portare allo sviluppo di steatosi epatica^{67,68} (*Fig.6*).

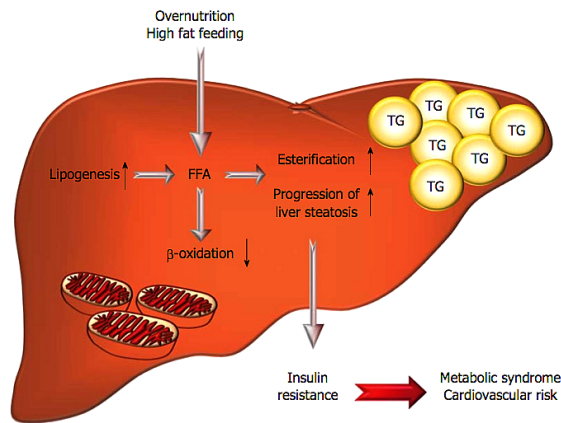


Fig. 6⁶⁹ Una dieta ipercalorica e ad alto contenuto di lipidi protratta nel tempo causa l'accumulo di grassi negli epatociti che, a sua volta, provoca un'alterazione dell'assorbimento dei grassi, della lipogenesi e dell'ossidazione con conseguente squilibrio nell'omeostasi lipidica. Tutto questo può portare a insulino-resistenza, sindrome metabolica e disturbi cardiovascolari.

Non è ancora chiaro quale sia il meccanismo che porta dalla steatosi alla steatoepatite. Secondo l'ipotesi dei “due colpi”⁶⁹, il “primo colpo” comporta l'accumulo di trigliceridi negli epatociti che causa un circolo vizioso di disfunzione metabolica; una volta che si è manifestata la steatosi epatica, la progressione a steatoepatite implica un “secondo colpo” nel quale lo stress ossidativo gioca un ruolo chiave. Questo perché il fegato è più suscettibile al danno ossidativo⁵⁹ e alla perossidazione lipidica⁷⁰ e le modifiche chimiche delle molecole biologiche possono essere tossiche per le cellule o possono stimolare risposte immunitarie autoimmuni che portano ad infiammazione, produzione di collagene e ulteriore progressione della malattia⁷¹⁻⁷³.

Poiché obesità e diabete sono due importanti fattori di rischio per la formazione di grasso epatico, non sorprende che molti soggetti con NAFLD siano insulino-resistenti a livello del muscolo, del fegato e del tessuto adiposo. Non tutti gli insulino-resistenti però sviluppano NASH. Ciò suggerisce che l'insulino-resistenza sia necessaria ma non sufficiente allo sviluppo della NAFLD⁷⁴ e che la presenza del diabete peggiori una situazione problematica già presente⁷⁵. A supporto di questa ipotesi citiamo un interessante studio del 2009⁷⁴ nel quale si osserva che in pazienti obesi con NASH l'adiponectina, famosa per il suo ruolo protettivo e antinfiammatorio, promuove invece il danno epatico: l'espressione dei recettori epatici dell'adiponectina è aumentata indipendentemente dalla presenza dell'obesità ed è direttamente proporzionale ai livelli di enzimi epatici. Bassi livelli di adiponectina sono associati ad iperespressione di fattori infiammatori che non favorisce solo l'accumulo di trigliceridi nel fegato ma anche la sua progressione verso infiammazione e fibrosi.

3. La chirurgia dell'obesità

I pazienti con obesità severa sono resistenti alla terapia conservativa (dieta, esercizio fisico, farmaci)⁷⁶. A partire dagli anni '60, sono stati messi a punto degli interventi di chirurgia bariatrica

che consentono di perdere, in media, tra il 40 % e il 75 % del peso corporeo in eccesso. Questi interventi sono nati per i pazienti con $IMC \geq 40 \text{ kg/m}^2$ con associate comorbidità⁷⁷ ma, poiché spesso il T2DM migliora o addirittura va in remissione dopo l'intervento, i criteri di eleggibilità dei pazienti candidati alla chirurgia hanno modificato il cut-off del IMC a 35 kg/m^2 . La chirurgia bariatrica non ha solo uno scopo terapeutico rispetto all'obesità e alle patologie ad essa associate ma anche preventivo in quanto è in grado di prevenire o ritardare l'insorgenza del T2DM⁷⁸.

Il principio su cui si basano questi interventi è quello di ottenere una perdita di peso inducendo un malassorbimento di vario grado, per lo più per la componente grassa degli alimenti, e/o un obbligato minor introito alimentare, e pertanto calorico, indotto da una cosiddetta “restrizione gastrica”. Questi interventi mirano a ridurre significativamente la capacità volumetrica dello stomaco in modo da indurre un senso di sazietà precoce^{79,80}.

Interventi di chirurgia bariatrica più utilizzati attualmente (Fig. 7):

- *Diversione Bilio-pancreatica (Fig. 7a)*. Fu ideata e messa in pratica per la prima volta nel 1979 dal Prof. Nicola Scopinaro e rappresenta l'intervento malassorbitivo più diffuso. Consiste nella resezione del digiuno a 120 cm dal legamento di Treitz e, usando una suturatrice lineare di 45 mm, viene poi realizzata un'enterostomia a 150 cm dall'ansa alimentare. Con l'ausilio di un catetere nasogastrico, viene creata una tasca gastrica sottocardiale di 30-50 ml di volume sezionando lo stomaco con una suturatrice lineare e, successivamente, verrà realizzata un'anastomosi gastro-digiunale di 2.5-3 cm con sutura manuale.

- *Roux-en-Y Gastric Bypass (RYGB) (Fig. 7b)*. È la procedura più diffusa e permette la perdita di peso maggiore senza sintomi da malassorbimento rilevanti. Inoltre, migliora il controllo glicemico nell'80 % dei pazienti con T2DM⁸¹. La procedura prevede la creazione di una piccola tasca, il cui volume è di circa 30 ml; questa si riversa attraverso un'anastomosi (dimensioni di 1 cm) in un'ansa digiunale evitando in tal modo il transito del cibo attraverso stomaco distale e duodeno, mentre tali visceri esclusi vengono anastomizzati a circa 100-120 cm dall'anastomosi gastrodigiunale con un'ansa ad Y.

- *Bendaggio gastrico (Fig. 7c)*. Il riempimento della porzione più prossimale dello stomaco viene ridotto mediante un anello cavo. L'anello è collegato ad una riserva sottocutanea di soluzione salina aggiungendo o togliendo la quale si può regolare la dimensione dell'anello. La perdita media di peso corporeo in eccesso dopo 5 anni dal bendaggio è del 45 %⁸².

- *Duodenal Switch (DS) (Fig. 7d)*. Viene praticata dalla prima metà degli anni '90 con una perdita media di peso corporeo in eccesso del 70 % e basso rischio di complicazioni⁸³⁻⁸⁵. La grande curva dello stomaco viene rimossa, creando un canale meno curvo a forma di manicotto. La prima parte

del duodeno è unita all'ileo a circa 100 cm dalla valvola ileocecale, il che produce un malassorbimento controllato e mantiene la perdita di peso. A partire dal 2001, si iniziò a praticare la riduzione dello stomaco con formazione del manicotto come un'operazione indipendente perché in molti pazienti era sufficiente a garantire una perdita di peso soddisfacente⁸⁶ (60 % a 5 anni dall'intervento) e comparabile al by-pass gastrico anche in termini di miglioramento dell'omeostasi del glucosio⁸⁷⁻⁸⁹. La procedura prese il nome di *Sleeve Gastrectomy (SLG)*.

- *Sleeve Gastrectomy (SLG)*: Resezione della grande curvatura gastrica, con confezionamento di un manicotto gastrico, senza modifiche anatomiche dell'intestino tenue.

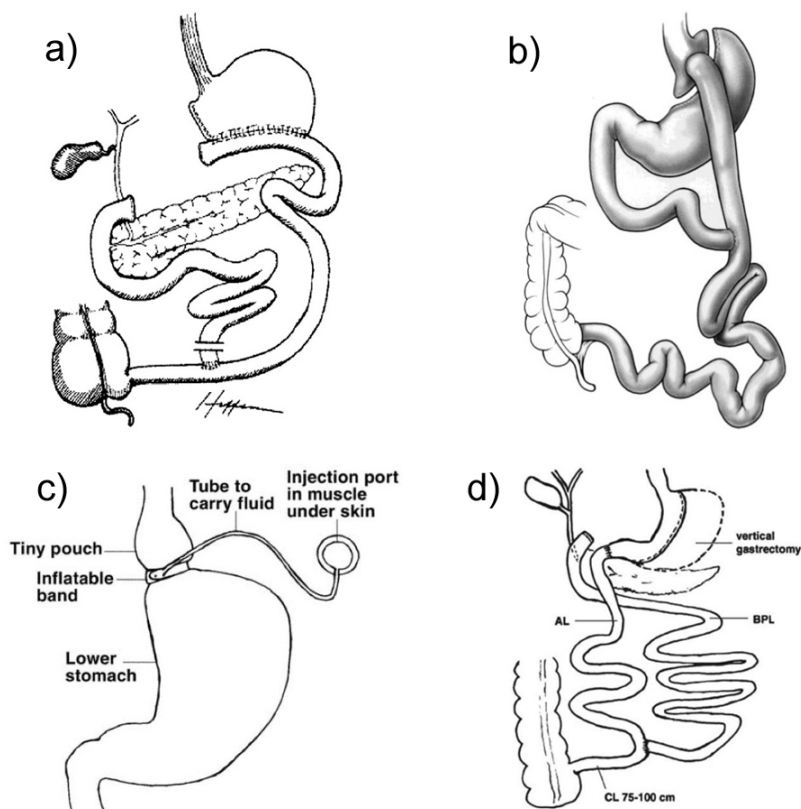


Fig. 7^{90,91} I quattro tipi di intervento più comuni in chirurgia bariatrica al giorno d'oggi: a) Deviazione biliopancreatica, b) Roux-en-Y Gastric Bypass (RYGB), c) Bendaggio gastrico, d) Duodenal Switch (DS).

Nella fase post-operatoria di tutti questi interventi si verifica una diminuzione nell'assunzione o nell'assorbimento dei nutrienti e una perdita di massa adiposa, accompagnata da un miglioramento dell'insulino-sensibilità⁹². Dopo il bendaggio gastrico la risoluzione del T2DM avviene nel 40 % dei pazienti⁹³ mentre dopo gli interventi in cui i nutrienti transitano rapidamente nell'ileo (RYGB, DS) la risoluzione del diabete avviene nell'80 % dei casi^{94,95}.

Si pensa che le *incretine* ricoprano un ruolo importante nella remissione del diabete⁹⁶. Le incretine sono ormoni intestinali stimolati dal passaggio del cibo che causano la secrezione di insulina da parte della β -cellula. Si sa per certo che in seguito al contatto delle cellule L dell'ileo con cibo

indigerito si verifica un'elevata secrezione di *glucagon-like peptide-1 (GLP-1)* nel circolo sanguigno⁹⁷; questo ormone stimola la proliferazione delle β -cellule pancreatiche aumentando la secrezione di insulina e migliorando il controllo della glicemia. Un altro importante ormone coinvolto nel controllo del peso è la *grelina (growth hormone-releasing hormone)* che è secreta dallo stomaco durante il digiuno allo scopo di stimolare l'assunzione di cibo⁹⁸. Dopo interventi di chirurgia bariatrica che comportano l'asportazione di una grande porzione di stomaco la grelina plasmatica risulta ridotta.

4. L'organo adiposo

Nei mammiferi i tessuti adiposi sono contenuti in un organo “multi-deposito”: l'organo adiposo. Questo consiste in una serie di depositi sottocutanei (localizzati appunto nello spazio sottocutaneo) e viscerali (in stretta vicinanza degli organi del tronco) ognuno dei quali è associato a specifici peduncoli nervo-vascolari, così come altri organi dell'organismo. Per questa loro autonomia anatomica alcuni ricercatori preferiscono chiamarli “mini-organismi”⁹⁹.

Alcune aree di questi depositi sono costituite prevalentemente da adipociti bruni e corrispondono al tessuto adiposo bruno (*brown adipose tissue o BAT*) mentre molte sono costituite prevalentemente da adipociti bianchi e corrispondono al tessuto adiposo bianco (*white adipose tissue o WAT*) (Fig.8). Gli adipociti bruni e i bianchi hanno diversa anatomia e funzione.

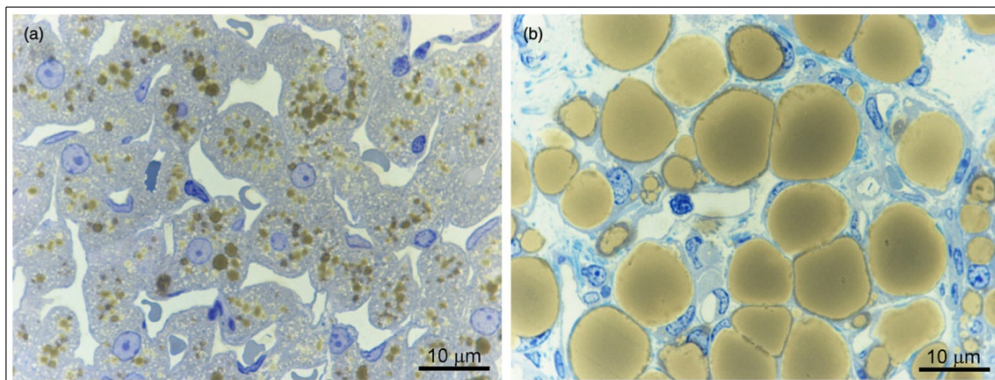


Fig.8¹⁰⁰ Aspetto istologico del tessuto adiposo bruno (BAT) (a) e del tessuto adiposo bianco (WAT) (b) al microscopio ottico.

I primi sono cellule termogeniche: nei mammiferi sono fortemente regolati dal sistema nervoso simpatico per mantenere costante la temperatura corporea quando quella ambientale scende sotto i 28-30 °C¹⁰¹. Per produrre calore gli adipociti bruni sono attivati da innervazioni simpatiche che, agendo sugli *adrenorecettori beta3 (beta3AR)*, inducono la degradazione degli acidi grassi nei loro grandi mitocondri. Nella membrana interna di questi organelli si trova la proteina *UCPI (Uncoupling Protein 1)* che, disaccoppiando la fosforilazione ossidativa, fa sì che l'energia venga dissipata sottoforma di calore^{102,103}. Gli adipociti bruni immagazzinano i trigliceridi in molte piccole

gocce citoplasmatiche in modo da riuscire a bruciare rapidamente grandi quantità di acidi grassi (*Fig.8a*). Anche gli adipociti bianchi possiedono i recettori beta3AR ma in quantità molto minore rispetto agli adipociti bruni. Gli adipociti bianchi immagazzinano e rilasciano energia sottoforma di lipidi e questa capacità è essenziale perché consente di sopravvivere a lunghi periodi di digiuno¹⁰⁴. La loro forma geometrica larga e sferica consente il massimo accumulo nel minimo spazio: più del 90 % del volume degli adipociti bianchi è occupato da una goccia lipidica uniloculare contenente trigliceridi (*Fig.9b*). Gli adipociti bianchi sono inoltre in grado di secernere ormoni (leptina) e citochine che influenzano la modalità di ricerca e assunzione del cibo¹⁰⁴.

I depositi sottocutanei e viscerali sono separati tra loro da barriere anatomiche ben definite: i primi sono delimitati da una capsula di tessuto connettivo mentre i secondi sono delimitati dai foglietti peritoneali. Al loro interno sono presenti contemporaneamente sia gli adipociti bianchi che i bruni ma sono presenti anche forme intermedie di adipocita¹⁰⁵ che sono multilobulari ma non esprimono la proteina UCP1. Questi adipociti intermedi si trovano solitamente nelle zone di confine tra BAT e WAT¹⁰⁶.

4.1 La plasticità dell'organo adiposo

La colorazione del deposito adiposo è determinata dalla prevalenza, al suo interno, di adipociti bianchi o bruni. Questa composizione cellulare può essere influenzata da diversi fattori quali: l'età, la specie, l'ambiente e le condizioni nutrizionali. È importante sapere infatti che la quantità di adipociti bruni presenti in ogni deposito è specie-specifica (ovvero determinata geneticamente)¹⁰⁷ ma anche l'età ha il suo peso: è stato dimostrato che in ratti anziani la componente BAT viene progressivamente sostituita da quella WAT^{108,109}. Le sorprendenti proprietà plastiche dell'organo adiposo emergono soprattutto in presenza di modifiche della temperatura ambientale e di stimoli nutrizionali, le due condizioni che maggiormente ci interessano nell'ambito di questa tesi. Queste situazioni infatti sono in grado di modificare molto l'anatomia dell'organo ma questa plasticità non è limitata a queste condizioni in quanto sembra che durante gli stati di gravidanza, allattamento e post-allattamento gli adipociti bianchi abbiano la capacità di convertirsi in cellule epiteliali che secernono latte.

4.2 Effetti della temperatura ambientale sull'organo adiposo

L'esposizione ad alte temperature comporta una riduzione dello stimolo nervoso simpatico sul BAT e quindi una diminuzione del calore prodotto dagli adipociti bruni. Da un punto di vista morfologico questo corrisponde ad una trasformazione degli adipociti bruni in cellule simili agli adipociti bianchi durante la quale si riduce l'espressione del gene di UCP1 e aumenta quella del gene della

leptina¹¹⁰. La trasformazione che avviene quindi non è solo morfologica ma anche funzionale: l'adipocita perde le sue proprietà termogeniche ma acquisisce la capacità tipica dell'adipocita bianco di produrre ormoni.

Al contrario, l'esposizione a basse temperature attiva immediatamente il sistema nervoso simpatico e quindi l'attivazione funzionale degli adipociti bruni mediante la noradrenalina. Il tessuto si riorganizza sintetizzando nuovi mitocondri e più UCP1. Inoltre, nel giro di pochi giorni aumenta il numero di cellule, di vasi e di terminazioni nervose^{102,111}. È un cambiamento che non interessa solo il BAT ma l'intero organo. Osservazioni al microscopio elettronico a trasmissione hanno rivelato che l'organo adiposo di topi e ratti adulti tenuti alla termoneutralità e nutriti con una dieta normale non contiene né cellule completamente indifferenziate né cellule scarsamente differenziate. Negli animali esposti al freddo invece compaiono preadipociti bruni sia nel BAT che nel WAT in zone perivascolari. Indipendentemente dall'esistenza di precursori distinti per le cellule bianche o brune quindi, la loro comparsa in depositi diversi degli animali adulti dipende chiaramente dalle condizioni microambientali del tessuto: l'aumento della concentrazione della noradrenalina è seguita dallo sviluppo di nuove cellule brune nei vari depositi dell'organo^{112,113}. A conferma di quanto detto, lo sviluppo di preadipociti bianchi nelle varie aree dell'organo sembra essere innescato da stimoli volti ad aumentare la capacità di immagazzinare energia.

4.3 La teoria della transdifferenziazione

Secondo il gruppo di ricerca del professor Cinti, gli adipociti bianchi e bruni possono “transdifferenziare” uno nell'altro all'interno dell'organo adiposo¹¹⁴. La *transdifferenziazione* è un fenomeno biologico mediante il quale una cellula differenziata si trasforma fenotipicamente e funzionalmente in una cellula differenziata di un altro tipo senza subire sdifferenziamento¹¹⁵. È noto che ratti esposti al freddo in maniera cronica (10 giorni) subiscono il cosiddetto fenomeno del “browning” in cui parte del WAT si trasforma in un deposito dall'aspetto bruno in cui i nuovi adipociti multiloculari e ben differenziati che lo compongono non esprimono solo mRNA di UCP1 ma anche la proteina. In topi esposti al freddo in maniera acuta (2 giorni) queste nuove cellule esprimono mRNA di UCP1 ma non la proteina e lo stesso esperimento condotto su animali transgenici non in grado di esprimere beta3AR ha evidenziato la completa inibizione della transdifferenziazione. Ciò suggerisce che solo una sottopopolazione di adipociti bianchi è destinata alla trasformazione confermando il fatto che il passaggio bianco-bruno è una successione di fasi che inizia con la trasformazione del vacuolo lipidico da uni a multiloculare, seguita dall'espressione di UCP1¹¹⁴.

Il fenomeno del “browning” ha recentemente attratto l'attenzione di molti ricercatori in quanto

sembra che anche nell'uomo adulto siano presenti adipociti bruni metabolicamente attivi, rilevabili mediante la tomografia ad emissione di positroni (PET)^{116,117}. Di conseguenza, molto interessante in un'ottica umana è stato sapere che topi che hanno un BAT abbondante sono resistenti all'obesità¹¹⁸ e che, al contrario, topi privi di adipociti bruni funzionali sono inclini all'obesità e al T2DM^{119,120}. Studi condotti su questi due tipi di animali hanno permesso di osservare che, quando esposti alla temperatura di 6 °C per 10 giorni, la quantità totale di adipociti bruni aumentava in entrambi e che questo incremento era equivalente al decremento degli adipociti bianchi (il numero totale di adipociti rimane invariato)^{105,106}. Fa eccezione il deposito sottocutaneo interscapolare: qui l'aumento del numero degli adipociti bruni era significativamente più alto della diminuzione del numero degli adipociti bianchi. Quest'ultima osservazione e il fatto che il passaggio bianco-bruno avvenga senza tracce di apoptosi suggerisce che il fenomeno del “browning” che caratterizza l'organo adiposo degli animali esposti al freddo sia supportato in parte dalla proliferazione o dallo sviluppo di precursori degli adipociti bruni e in maniera più significativa dalla trasformazione diretta degli adipociti bianchi in bruni¹⁰⁰.

Questo passaggio diretto implica un meccanismo fisiologico di riprogrammazione del genoma che potrebbe essere usato nei mammiferi (incluso l'uomo) come strategia terapeutica per prevenire lo sviluppo eccessivo di WAT e aumentare la quantità di BAT.

4.4 Effetti dell'eccesso calorico sull'organo adiposo

Come abbiamo già detto in precedenza, mentre i meccanismi omeostatici dell'organismo lavorano per mantenere il bilancio energetico vicino allo zero, ad un bilancio positivo corrisponde un aumento dell'accumulo di energia nelle cellule sottoforma di trigliceridi mentre ad un bilancio negativo corrisponde una diminuzione dell'accumulo dei grassi e una diminuzione del volume dell'adipocita.

Nel corso degli anni, numerosi studi hanno permesso di concludere che nell'uomo adulto le variazioni di peso corrispondono proprio a variazioni nel volume dell'adipocita¹²¹⁻¹²³. Su queste basi si potrebbe concludere che ci sia un punto critico nello sviluppo in cui si raggiunge il numero massimo di cellule e oltre il quale non si ha più turnover. Al contrario, studi fatti con il ¹⁴C hanno dimostrato che gli adipociti sono una popolazione cellulare dinamica e fortemente regolata¹²⁴. Nuovi adipociti sostituiscono continuamente altri che vengono persi: ogni 8 anni il 50 % degli adipociti del tessuto sottocutaneo umano viene completamente rinnovato¹²³. Nel WAT dell'umano adulto sono presenti adipociti necrotici e apoptotici¹²⁴ anche se il numero totale degli adipociti non cambia con l'età, quindi questo significa che alla stessa velocità a cui gli adipociti muoiono vengono reclutati preadipociti che diventeranno cellule mature contenenti trigliceridi.

In generale, bisogna tenere presente che in condizioni fisiologiche la massa grassa umana è il risultato sia del volume degli adipociti che del loro numero (solo fino alla maturità puberale) perché questo concetto è importante nella caratterizzazione dell'obesità. Da un punto di vista strettamente cellulare, l'obesità può essere di due tipi¹²⁵ (Fig.9):

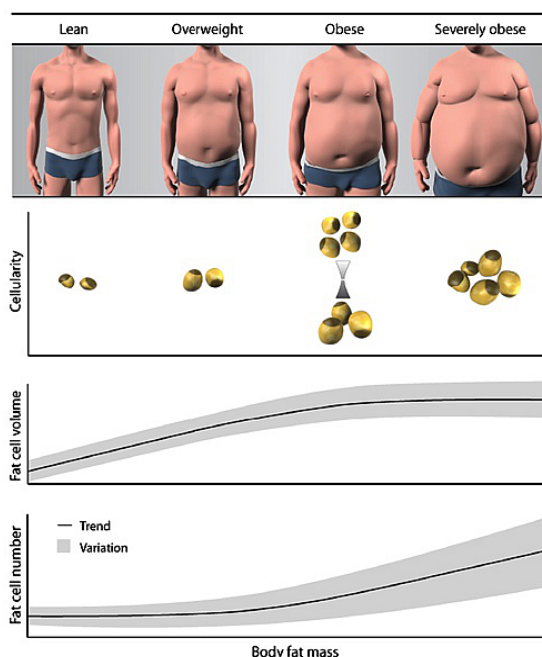


Fig.9¹²⁶ La cellularità adiposa nel magro e nell'obeso. L'ipertrofia è presente in tutti i gradi di obesità. Gli individui sovrappeso hanno in media degli adipociti più grandi dei magri, senza evidenti variazioni nel numero di cellule. L'obesità è caratterizzata da adipociti sia più grandi che più numerosi, rispetto ai magri. Tuttavia, ad un grado di obesità più severo corrisponde un'iperplasia più evidente.

- *ipertrofica* quando è caratterizzata da un aumento del *volume* degli adipociti. È caratteristica di tutte le persone sovrappeso e obese.

- *iperplastica* quando è caratterizzata da un aumento del *numero* degli adipociti. È fortemente correlata all'obesità severa ed è caratteristica dell'età evolutiva.

Queste trasformazioni morfologiche dell'organo adiposo avvengono quando il bilancio energetico è positivo ed interessano prevalentemente la sua componente bianca. Studi sugli animali suggeriscono che l'ipertrofia preceda temporalmente l'iperplasia e che questo passaggio avvenga al raggiungimento della cosiddetta "dimensione critica della cellula adiposa" cioè quel volume oltre il quale l'adipocita non è più in grado di immagazzinare trigliceridi. Sembra che i fattori paracrini secreti dal tessuto adiposo (TGF- β , TNF- α , angiotensina II, leptina, resistina ecc.) abbiano un ruolo centrale nel modulare l'adipogenesi e quindi la morfologia del tessuto nell'obesità. Tra questi la leptina, anzi la presenza del suo recettore, sembra essere essenziale nell'indurre iperplasia, come è stato osservato in studi su topi obesi transgenici¹²⁷. Ad oggi non è possibile stabilire se l'iperplasia che si osserva negli obesi/obesi severi sia il risultato del reclutamento di nuovi adipociti o se il fenomeno avvenga in persone predisposte a diventare tali (sulla base del numero di adipociti

precedenti la vita adulta)¹²². Certamente in età adulta il numero di cellule non diminuisce neanche dopo un lungo periodo di dimagrimento. Ecco perché gli obesi iperplastici hanno molta più difficoltà nel perdere peso mediante dieta rispetto agli obesi ipertrofici. Negli iperplastici il raggiungimento di una perdita di peso permanente non è possibile né con la dieta né con l'esercizio fisico ma solo con la chirurgia in quanto permette una riduzione delle calorie ingerite (RYBG) e la rimozione chirurgica del grasso in eccesso (chirurgia ricostruttiva o liposuzione)¹²⁶.

Un bilancio energetico positivo interessa anche la componente bruna dell'organo. Gli adipociti bruni degli animali obesi sono generalmente simili alle cellule bianche. Si osservano cellule uniloculari dove solitamente si trovano gli adipociti bruni ma al loro interno si trovano mitocondri caratteristici diversi da quelli normali delle cellule bianche. Inoltre esprimono sia UCP1 sia la leptina, quest'ultima tipica delle cellule bianche¹²⁸ e nella loro popolazione c'è un elevato tasso di apoptosi dovuto all'elevata quantità di *TNF-α* (*Tumor Necrosis Factor alpha*) presente¹²⁹.

4.5 Istopatologia dell'organo adiposo obeso

È stato osservato che la morfologia del tessuto adiposo ha una rilevanza clinica: l'ipertrofia infatti è associata ad una minore insulino-sensibilità, anche negli individui magri e apparentemente sani¹³⁰. Inoltre, due studi dipendenti hanno dimostrato che l'ipertrofia adiposa è un fattore di rischio indipendente per il T2DM^{131,132}.

Per spiegare questo fenomeno iniziamo dicendo che l'adipocita disfunzionale di topi e umani obesi esprime elevati livelli di una citochina che classicamente è prodotta dai macrofagi: il *TNF-α*. Si ipotizza che questa citochina abbia un ruolo nell'insulino-resistenza perché interferirebbe con la forforilazione del substrato 1 del recettore dell'insulina, essenziale per la cascata di segnale che segue l'attivazione del recettore stesso¹³³.

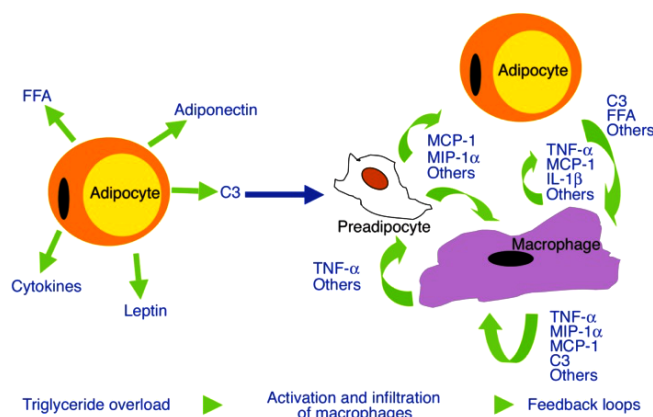


Fig. 10¹³⁴ Modello ipotetico di infiammazione cronica e insulino-resistenza dell'adipocita. Quando l'adiposità raggiunge una certa soglia, i fattori secreti dagli adipociti inducono l'attivazione e l'infiltrazione dei macrofagi. I macrofagi attivati secernono citochine che possono danneggiare l'insulino-sensibilità dell'adipocita e stimolare un'ulteriore attivazione e infiltrazione di monociti periferici e macrofagi nell'adipe. I preadipociti possono anche secernere chemochine sotto lo stimolo di *TNF-α*, il che contribuisce all'infiltrazione macrofagica. Questa amplificazione del segnale danneggia sempre più l'azione dell'insulina sull'adipocita e può causare insulino-resistenza sistemica.

Inoltre, nel 2003 due laboratori indipendenti hanno dimostrato che il tessuto adiposo degli animali e degli umani obesi è infiltrato da macrofagi, il che provoca uno stato di infiammazione cronica sub-clinica. Questa infiltrazione è correlata positivamente alla dimensione degli adipociti e coincide con l'insorgere dell'insulino-resistenza^{134,135} (Figg.3,10).

Ma perché i macrofagi si infiltrano nel tessuto adiposo degli obesi? Smorlesi *e coll* hanno dimostrato che più del 90 % dei macrofagi immunoreattivi circondano gli adipociti morti sia nel topo magro che nell'obeso, formando strutture dalla caratteristica forma “a corona” (*Crown-Like Structures o CLSs*) (Fig.11). Le CLSs sono 30 volte più numerose nell'adipe degli obesi che in quello dei magri e la loro densità è correlata positivamente alla dimensione degli adipociti, indipendentemente dal grado di obesità.

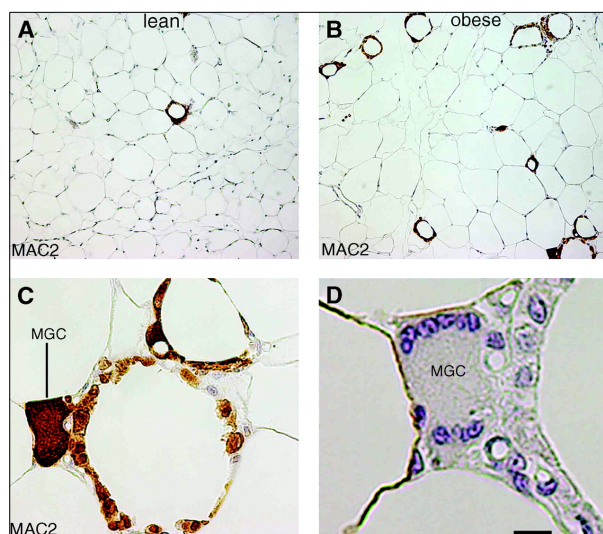


Fig. 11¹³⁶ Nel WAT i macrofagi si organizzano in CLSs (Crown-Like Structures) intorno ai singoli adipociti con una frequenza maggiore nell'obesità. Quasi tutti i macrofagi immunoreattivi (colore marrone) si aggregano formando poche (A = topo magro) o molte (B = topo obeso) CLSs tra gli adipociti uniloculari. Nella figura C abbiamo un ingrandimento dell'angolo inferiore destro della B in cui si nota una cellula gigante multinucleata (MGC), colorata intensamente di marrone. In D abbiamo un'ulteriore ingrandimento della MGC in cui la colorazione blu conferma la presenza di nuclei multipli. (Scala = 100 μ m per A e B, 28 μ m per C e 10 μ m per D).

Nell'uomo si osserva una situazione simile. A causa delle grandi dimensioni dei macrofagi e del lungo tempo necessario per la rimozione degli adipociti morti si instaura uno stato di infiammazione cronica sub-clinica simile a quella da reazione da corpo estraneo¹³⁶.

Qualche anno fa si è avuta la conferma che la morte dell'adipocita è un fenomeno normale nell'uomo magro ed è accelerato nell'uomo obeso¹²³.

La densità delle CLSs è correlata positivamente alle dimensioni dell'adipocita sia nel deposito sottocutaneo che in quello viscerale del topo obeso. Tuttavia, a parità di dimensione dell'adipocita, la densità delle CLSs è più alta nel grasso viscerale. Ciò suggerisce che gli adipociti viscerali siano più fragili e che raggiungano la dimensione critica che induce la morte cellulare (*Critical Death Size o CDS*) prima degli adipociti sottocutanei¹³⁷.

5. La tiroide e la regolazione del bilancio energetico

Gli ormoni tiroidei sono noti da almeno un secolo per la loro capacità di regolare il tasso metabolico basale e oggi sono considerati importanti nel controllare la maggiorparte dei processi fisiologici (crescita, sviluppo, metabolismo di carboidrati, grassi e proteine, termogenesi)¹³⁸⁻¹⁴¹. Secondo la visione classica, essi modulano il bilancio energetico interagendo direttamente con i tessuti metabolicamente attivi: fegato, tessuto adiposo (BAT e WAT), cuore, muscolo scheletrico¹⁴¹⁻¹⁴³. L'importanza omeostatica degli ormoni tiroidei nel metabolismo energetico è esemplificata dai pazienti con disfunzione tiroidea, affetti da ipertiroidismo (es. disturbo di Graves) o ipotiroidismo (es. tiroidite di Hashimoto). Negli ipertiroidi una tiroide iperattiva produce grandi quantità di ormoni tiroidei con conseguente eccesso di ormoni liberi circolanti e tasso metabolico aumentato. In particolare, l'85 % dei pazienti ipertiroidi perde peso nonostante assuma più cibo¹⁴¹. Al contrario, negli ipotiroidi diminuisce il tasso metabolico con conseguente aumento di peso nonostante la minore assunzione di cibo^{144,145}. Tuttavia, evidenze recenti e sempre più evidenti stanno spostando la prospettiva dei ricercatori da una visione “periferica” a una più “centrale”: gli ormoni tiroidei modulerebbero i sistemi periferici agendo sul sistema nervoso centrale¹⁴⁶.

5.1 Anatomia e fisiologia della tiroide

La tiroide è una ghiandola endocrina situata nella parte anteriore del collo, al di sotto della cartilagine tiroidea (o pomo d'Adamo negli individui di sesso maschile). È un organo dalla forma a farfalla ed è composta da due lobi conici, il destro e il sinistro, connessi dall'istmo tiroideo. La ghiandola fronteggia e circonda la laringe e la trachea, raggiungendo posteriormente l'esofago e il fascio vasculo-nervoso. È coperta da una guaina fibrosa, la “capsula glandulae thyroidea”, composta da uno strato interno e da uno esterno. Tra i due strati della capsula e nella zona posteriore dei lobi si trovano due *ghiandole paratiroidi* per ogni lobo (*Fig.12*). La tiroide è una delle più grandi ghiandole endocrine dell'organismo umano: pesa 2-3 grammi nei neonati e 18-60 grammi negli adulti e il suo volume aumenta in gravidanza. È innervata dal sistema nervoso simpatico e parasimpatico.

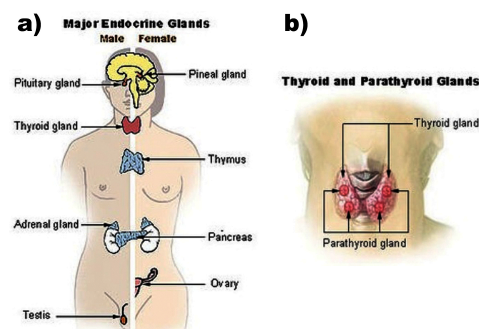


Fig.12 Il sistema endocrino nell'uomo (a) e il posizionamento di tiroide e paratiroidi (b).

A livello microscopico, possiamo distinguere tre principali componenti della ghiandola:

- i *follicoli* assorbono iodio dal circolo sanguigno (sottoforma di ioni ioduro I⁻) per produrre gli ormoni tiroidei. Nei follicoli si trova la colloide, un materiale di riserva per la produzione di ormoni tiroidei, ricca in tireoglobulina (TG).
- le *cellule follicolari* sono cellule epiteliali che circondano i follicoli disponendosi a singolo strato. Secernono gli ormoni tiroidei T3 e T4.
- le *cellule parafolicolari* si trovano tra le cellule follicolari e i follicoli e secernono calcitonina, un ormone che contribuisce alla regolazione dei livelli di calcio nel sangue.

La funzione primaria della tiroide è quella di produrre gli ormoni *tiroxina* (3,3',5,5'-tetraiodotironina o T4), *triiodotironina* (3,3',5-triiodotironina o T3) e *calcitonina*. T4 è sintetizzata dalle cellule follicolari a partire dalla tirosina libera e sui residui di tirosina della TG. Lo iodio è catturato dal perossido di idrogeno generato dall'enzima tiroperossidasi (TPO)¹⁴⁷ e viene legato in posizione 3' e 5' dell'anello benzenico dei residui di tirosina sulla TG, oltre che su quello della tirosina libera. Sotto lo stimolo del *Thyroid Stimulating Hormone (TSH)* le cellule follicolari riassorbono la TG e le tirosine iodinate vengono tagliate proteoliticamente dalla TG, formando T4 e T3 che vengono rilasciati nel circolo sanguigno. Il 90 % degli ormoni tiroidei secreti dalla tiroide è T4 e solo il restante 10 % è T3. T4 ha una bassa attività biologica rispetto a T3 il quale ha 100 volte più affinità per il suo recettore rispetto a T4^{138,139,148}; per questo motivo T4 è considerato un pro-ormone e T3 è considerato l'ormone attivo. Quasi tutto l'ormone tiroideo circolante è legato a proteine di trasporto (thyroxine-binding protein, transtiretina, paraalbumina) ed è pertanto inattivo. Solo lo 0,03 % di T4 (fT4) e lo 0,3 % di T3 (fT3) circola in forma libera ed è biologicamente attivo. Di conseguenza, la misurazione del rapporto fT3/fT4 ha un valore diagnostico mentre la quantità di ormone totale circolante può essere ingannevole.

Essendo molecole lipofile, gli ormoni tiroidei attraversano facilmente la membrana cellulare degli organi bersaglio. Nel citoplasma più dell'80 % di T4 viene convertito a T3; questo passaggio critico nell'attivazione degli ormoni tiroidei è catalizzato dalle *iodotironino-deiodonasi*, enzimi inusuali per il fatto di contenere selenio sottoforma dell'aminoacido selenocisteina¹⁴⁹⁻¹⁵¹. T3 regola la trascrizione di geni target legandosi a specifici recettori nucleari, i *recettori degli ormoni tiroidei (TR)* (Fig.13). Il range di geni la cui espressione è regolata dagli ormoni tiroidei è molto ampio e va dal potenziamento di altri pathways di trasduzione del segnale¹⁵², alla modulazione del segnale adrenergico¹⁵³⁻¹⁵⁵.

L'azione selettiva degli ormoni tiroidei è determinata dalla disponibilità locale delle deiodinasi e dei TR che si esprimono con pathways specifici per ogni tessuto e per ogni fase dello sviluppo^{139,156}. Inoltre, vengono sempre più spesso riscontrate azioni non genomiche degli ormoni tiroidei, le quali

non coinvolgono direttamente la regolazione della trascrizione da parte dei TR¹⁵⁷.

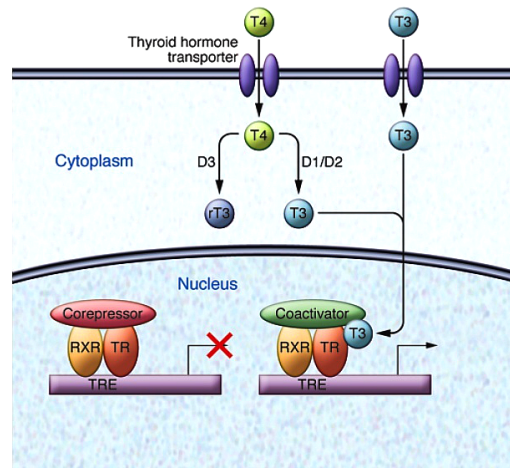


Fig. 13⁴⁴ L'azione nucleare degli ormoni tiroidei. Gli ormoni entrano nella cellula grazie a trasportatori (es. MCT8 nel cervello). Nel citoplasma, T4 viene convertito nella forma attiva T3 dalle deiodinasi D1 e D2. T3 si va a legare al recettore nucleare TR. Il recettore non legato eterodimerizza con RXR (Retinoid X Receptor) e si lega a TRE (Thyroid-hormone Responsive Elements) e poi ad un corepressore, reprimendo l'espressione genica. Il legame di T3 con il dominio di legame di TR ne provoca un cambiamento conformazionale, la rottura del legame con il corepressore e la promozione del legame con un coattivatore che porta al reclutamento della polimerasi III e all'inizio della trascrizione.

Sono noti tre tipi di deiodinasi (Fig. 14):

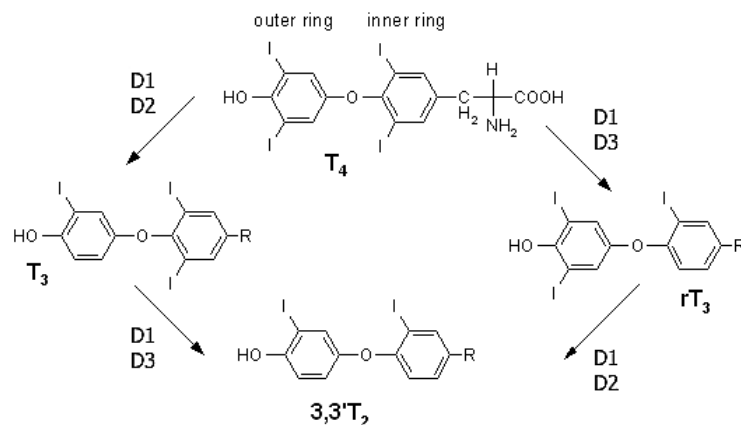


Fig. 14 Reazioni catalizzate dalle iodotironino-deiodinasi. Le deiodinasi hanno la capacità di rimuovere un atomo di iodio dall'anello esterno della molecola di T4, attivandola a T3: in alternativa, possono rimuovere lo iodio dall'anello interno di T4 convertendola a reverse T3 (3,3',5-triidotironina o rT3) o da quello di T3 inattivandola a T2 (3,3'-diiodo-L-tironina).

- il tipo 1 (D1): è sia attivante che inattivante e si trova comunemente in fegato e reni
 - il tipo 2 (D2): è il principale enzima attivante e si trova prevalentemente in cuore, muscolo scheletrico, SNC, tessuto adiposo e tiroide
 - il tipo 3 (D3): è il principale enzima inattivante ed è prevalente nei tessuti fetali e nella placenta.
- Nei roditori la maggiorparte della T3 circolante deriva dall'azione della D1 mentre l'uomo dipende principalmente dalla D2¹⁴⁸. Anche l'inattivazione della T4 a rT3, mediata dalla D3, è importante nel regolare i livelli tissutali di T3, specialmente nello sviluppo dell'asse tiroideo e degli organi di senso^{158,159}.

I TR sono codificati dai geni TRHA e TRHB, anch'essi secondo un pattern spaziale e temporale

tessuto-specifico. TRHA codifica per quattro varianti di splicing:

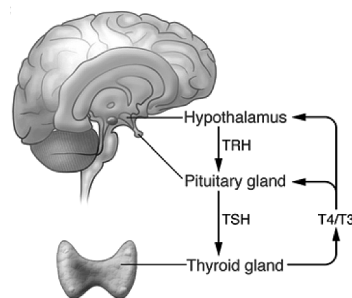
- la $TR\alpha 1$ è l'unica in grado di legare l'ormone tiroideo ed è ubiquitariamente espressa, con prevalenza nel cervello e nei muscoli cardiaco e scheletrico
- le $TR\alpha 2$, $TR\alpha 3$ e $TR\alpha 4$ non legano l'ormone ma sono comunque in grado di legarsi al DNA e anch'esse sono ubiquitariamente espresse. La loro funzione *in vivo* è sconosciuta^{138,139,148}.

THRB codifica per tre varianti di splicing, tutte in grado di legarsi all'ormone tiroideo:

- la $TR\beta 1$ è predominante in fegato, rene e tiroide
- la $TR\beta 2$ è espressa prevalentemente in cervello, tessuto adiposo e adenoipofisi
- la $TR\beta 3$ è espressa in rene, fegato e polmone¹³⁹.

Queste tre varianti condividono la regione C-terminale, inclusi i domini di legame al DNA e all'ormone tiroideo, ma hanno differenti porzioni N-terminali.

La produzione e il rilascio degli ormoni tiroidei sono controllati da un classico asse ipotalamico-ipofisario (*Fig.15*):



*Fig.15*¹³⁸ Schema dell'asse ipotalamico-ipofisario. L'ipotalamo libera il TRH (Thyrotropin Releasing Hormone) il quale stimola le cellule tireotrope dell'adenoipofisi a sintetizzare e rilasciare la tireotropina o TSH (Thyroid Stimulating Hormone) in circolo. Il TSH, legandosi alle cellule follicolari tiroidee, intensifica la sintesi e la secrezione degli ormoni tiroidei.

Così come accade in altri assi endocrini ipotalamico-ipofisari, il prodotto finale (gli ormoni tiroidei) inibisce la produzione di TRH e TSH. La regolazione degli assi endocrini è una delle tante funzioni regolate dall'ipotalamo, insieme alla funzione riproduttiva e al bilancio energetico. Questa regione del cervello, situata sotto il talamo, è organizzata in clusters neuronali o nuclei. Ogni nucleo, grazie alle sue proiezioni assionali, riceve segnali afferenti specifici per ogni esperienza sensoriale (es. glucosio, aminoacidi, lipidi, ormoni, insulina, estrogeni, ormoni tiroidei) e li integra alterando l'espressione dei suoi neuropeptidi ipotalamici. L'ipotalamo quindi integra i segnali sia periferici che centrali, modulando l'insulino-sensibilità epatica¹⁶⁰, l'accumulo del grasso nel WAT e l'ossidazione degli acidi grassi negli adipociti^{161,162} e nel muscolo scheletrico¹⁶³, la termogenesi nel BAT^{164,165}.

5.2 Azione degli ormoni tiroidei sul fegato

Gli ormoni tiroidei hanno un ruolo chiave nella regolazione dell'omeostasi lipidica epatica. Le isoforme β dei TR sono quelle maggiormente espresse nel fegato e i principali effetti fisiologici di

T3 sono la regolazione della sintesi del glicogeno epatico e della glicogenolisi, la modulazione della risposta dell'organo ad ormoni come l'insulina e alle catecolamine, la regolazione dell'espressione di geni coinvolti nella lipogenesi epatica e nell'ossidazione degli acidi grassi.

Come vedremo successivamente, i mitocondri sono gli obiettivi centrali dell'azione degli ormoni tiroidei e nelle diete ipercaloriche la compromissione della capacità ossidativa mitocondriale ha un ruolo fondamentale nello sviluppo, nella persistenza e nel peggioramento della steatosi epatica e della NAFLD (paragrafo 2.5, *Fig. 6*). In uno studio recente¹⁶⁶ è stato visto che T3, oltre ad esercitare un forte effetto inibitorio sullo sviluppo della steatosi, causa una rapida regressione della steatosi conclamata: in un modello nutrizionale di NAFLD (ratti nutriti con una dieta ricca di grassi e mancante di colina-metionina) è stato dimostrato che co-somministrando T3 (4 mg/kg di cibo) alla dieta si ottiene un forte effetto inibitorio sullo sviluppo di steatosi. Inoltre, lo stesso studio ha evidenziato che la somministrazione di T3 per una sola settimana, successiva a 10 giorni della dieta di cui sopra, causava una rapida regressione della steatosi conclamata riducendo molto i livelli di trigliceridi epatici e l'espressione della COX2, deregolando pathways solitamente attivati nei processi infiammatori (JNK, STAT3), riducendo la severità del danno epatico, come determinato dai livelli sierici di AST e ALT.

Trattamenti a lungo termine con T3 possono tuttavia avere una serie di effetti avversi, sia negli animali che nell'uomo, come la tireotossicosi sistemica. Per questo motivo un vasto campo della ricerca è dedicato all'identificazione di nuove molecole efficaci e sicure (T3-derivati e analoghi) per il trattamento delle dislipidemie, della NAFLD, dell'obesità e dei disordini ad essi correlati⁶⁹.

5.3 Azione degli ormoni tiroidei sul tessuto muscolare cardiaco

Gli ormoni tiroidei hanno un ruolo essenziale nel regolare l'omeostasi cardiovascolare e la vascolarizzazione periferica¹⁶⁷ in quanto regolano la funzione cardiaca sia direttamente (frequenza cardiaca e contrattilità del miocardio) che indirettamente (resistenza vascolare sistemica, volume ematico, secrezione di eritropoietina)^{167,168}. Nell'ipotiroidismo può verificarsi disfunzione cardiaca caratterizzata da contrattilità compromessa, disfunzione diastolica, rimodellamento del ventricolo sinistro, incremento della resistenza vascolare sistemica e addirittura arresto cardiaco^{167,169}.

Nel 2013 Weltman *e coll*¹⁷⁰ osservano che in un modello sperimentale di ratti ipotiroidei, la somministrazione di T3 biologicamente attivo è in grado di ripristinare i parametri cardiaci compromessi (livelli di T3 e T4 circolanti e tissutali, atrofia cardiaca, disfunzione contrattile ecc.) in maniera dose-dipendente, confermando che il ripristino dei livelli cardiaci di ormone tiroideo è essenziale nel ristabilire la funzione cardiaca nell'ipotiroidismo¹⁷¹. In particolare, per normalizzare T3 cardiaco è necessario un dosaggio tre volte maggiore di quello sufficiente a normalizzare T3

ematico. Nel tentativo di capire quali siano i meccanismi responsabili di questi mismatch, Weltman e coll sono stati i primi a caratterizzare *in vivo* i cambiamenti dei trasportatori cardiaci di membrana degli ormoni tiroidei e delle proteine citosoliche che si legano agli ormoni in stati di alterazione degli ormoni tiroidei stessi.

È noto che nei pazienti affetti da diabete mellito, la frequenza di ipotiroidismo è più alta rispetto ai non diabetici¹⁷²⁻¹⁷⁴ e che probabilmente questa condizione contribuisce al rischio cardiovascolare e alle sue conseguenze negative in questa popolazione di malati¹⁷⁵. Il diabete mellito e l'ipotiroidismo hanno effetti sinergici sulla funzione cardiaca e, complessivamente, queste osservazioni suggeriscono che gli individui affetti da diabete mellito siano a più alto rischio di disfunzione cardiaca associata ad uno squilibrio ormonale tiroideo a livello sia sistemico che locale. Weltman e coll¹⁷⁶ hanno recentemente osservato che in un modello sperimentale di diabete messo a punto sul ratto, una quantità fisiologica di T3 può essere somministrata per un lungo periodo di tempo e può avere effetti positivi sul cuore diabetico senza causare ipertiroidismo o innalzare i livelli circolanti di T3 e T4. Inoltre, gli autori ipotizzano che la riduzione dei livelli di ormone tiroideo nel miocardio che si osserva nei ratti diabetici sia il risultato di una maggiore degradazione D3-mediata. In effetti osservano che nei cuori diabetici è presente un'elevata quantità della proteina D3 e del suo mRNA^{177,178} e che il trattamento con T3 normalizza sia il contenuto di D3 tissutale con contemporanea diminuzione dell'espressione dell'mRNA.

5.4 Azione degli ormoni tiroidei sul tessuto adiposo

Come abbiamo già detto nel discorso introduttivo, gli ormoni tiroidei modulano il bilancio energetico dell'organismo interagendo direttamente con i tessuti metabolicamente attivi: fegato, tessuto adiposo (BAT e WAT), cuore, muscolo scheletrico¹⁴⁴⁻¹⁴⁶. Qui la loro azione segnale può essere controllata a livello di singola cellula attraverso l'attivazione o l'inattivazione selettiva degli ormoni stessi tramite le deiodinasi. In particolare, nel BAT gli ormoni tiroidei sono essenziali nell'attivazione della termogenesi adattativa in quanto agiscono in aggiunta all'attivazione mediata dal sistema nervoso centrale (legame della norepinefrina, NE, all'adrenorecettore β_3 , beta3AR, vedi paragrafo 4) mantenendone il segnale¹⁷⁹ (*Fig. 16*).

L'isoforma TR α 1 è necessaria per il mantenimento della normale risposta adrenergica degli adipociti bruni, mentre la TR β 1 media l'espressione genica di UCP1 indotta da T3^{143,180}. Studi su differenti modelli di topi knockout per TR e l'utilizzo di agonisti selettivi per le isoforme del recettore hanno confermato i ruoli delle diverse isoforme di TR nella termogenesi del BAT. Una deficienza globale di TR α 1 e di TR α 1/ β , così come la delezione di tutte le isoforme di TR α portano a ipotermia e intolleranza al freddo associate ad una ridotta termogenesi del BAT, quest'ultima

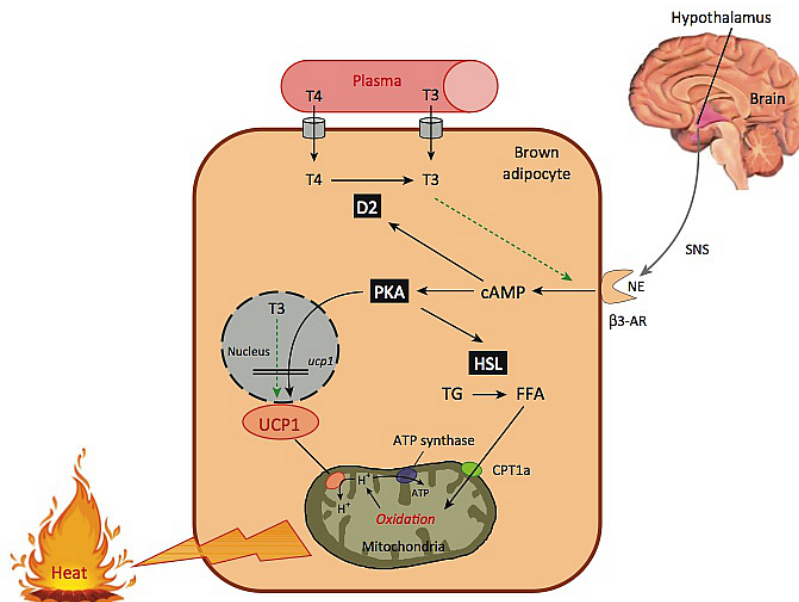


Fig. 16¹⁴⁶ Meccanismo di modulazione del disaccoppiamento della fosforilazione ossidativa e della produzione di calore nel BAT. Il legame della norepinefrina (NE) al beta3AR provoca un aumento dei livelli di cAMP che attiva rapidamente la lipolisi mediata dalla protein-chinasi A (PKA) e dalla hormone sensitive lipase (HSL). I FFA vengono importati nel mitocondrio attraverso la carnitina palmitoiltransferasi 1a (CPT1a), garantendo la β -ossidazione degli acidi grassi e l'attività del ciclo dell'acido citrico. Questo porta alla formazione di trasportatori ridotti FADH e NADH, che vengono quindi ossidati dalla catena di trasporto degli elettroni. Di conseguenza, il pompaggio dei protoni fuori dal mitocondrio e la creazione di una forza proton-motrice che riporta i protoni nella matrice mitocondriale attraverso la UCP1 porta alla produzione di calore mitocondriale. T3 e T4 agiscono sull'adipocita marrone aumentando l'azione stimolatoria di NE sulla termogenesi e intensificando l'immediato aumento dell'espressione del gene di UCP1 mediato da cAMP, stimolando sia la trascrizione genica che l'emivita del mRNA.

dovuta all'insensibilità alla risposta indotta dalla NE, nonostante la morfologia e lo sviluppo del BAT fosse normale¹⁸¹⁻¹⁸⁴. Anche i modelli knockout per le deiodinasi hanno fornito interessanti informazioni sul ruolo degli ormoni tiroidei nel funzionamento del BAT: topi con una delezione di Dio2 (il gene di D2), D2KO, hanno termogenesi compromessa dovuta ad un BAT disfunzionale¹⁸⁵⁻¹⁸⁷. Sono inoltre molto suscettibili all'obesità indotta dalla dieta. Questo effetto migliora quando la temperatura sale e scompare alla termoneutralità in quanto non c'è la necessità di preservare la temperatura interna¹⁸⁸⁻¹⁹⁰.

In uno studio del 2010¹⁹¹ Hall *e coll* riportano che il difetto termogenico permanente del BAT nel topo D2KO deriva da una compromissione dello sviluppo embrionale del tessuto. Gli embrioni D2KO hanno livelli normali di T3 circolante ma, a causa della mancanza di T3 generato da D2 nel BAT, nel tessuto diminuisce l'espressione dei geni che definiscono l'identità del BAT (UCP1, PGC-1 α , Dio2) il che porta a un danno nella differenziazione e nella capacità ossidativa. Poiché durante lo sviluppo del BAT D2KO aumenta l'espressione di geni che regolano la formazione delle specie reattive dell'ossigeno e diminuisce quella di geni ad azione antiossidante (inclusa la mioglobina), i ricercatori ipotizzano che lo stress ossidativo che ne deriva sia associato alla diminuzione del segnale dell'insulina e dell'adipogenesi che osservano nei preadipociti D2KO, essendo il fenomeno già noto negli adipociti adulti¹⁹². Ne hanno conferma perché trattando gli adipociti D2KO con l'antiossidante acido ascorbico recuperano il segnale insulinico. Questi dati hanno permesso di

identificare un pathway critico nello sviluppo del BAT mediato dalle deiodinasi, che coinvolge sia geni BAT-specifici che geni coinvolti in pathways diversi da quello della termogenesi (es. protezione dal danno ossidativo). I geni UCP1, PGC-1 α , Dio2 sono T3-responsivi^{179,193-195} e sono stati collegati al funzionamento del BAT in maniera indipendente. Inoltre, PGC-1 α è un coattivatore del promotore di UCP1 insieme a PPAR γ e TR β ¹⁹⁶ ed è necessario nell'aumento dell'espressione di UCP-1 e Dio2 dopo stimolazione con un agonista del cAMP¹⁹⁷. Hall *et al.* hanno osservato per la prima volta che le espressioni dei tre geni UCP1, PGC-1 α , Dio2 sono interconnesse nello sviluppo del BAT, con Dio2 che genera T3 il quale aumenterà ulteriormente la sua produzione e indurrà UCP1 e PGC-1 α in un ciclo a feedback positivo, che si alimenta in assenza di uno stimolo termogenico (Fig.17).

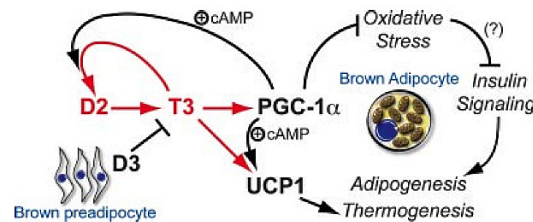


Fig.17¹⁹¹ Modello di feedback positivo che coinvolge l'espressione di UCP1, PGC-1 α , Dio2 durante lo sviluppo di BAT. È inoltre schematizzato il ruolo di Dio2 e di T3 generato da Dio2 nello sviluppo degli adipociti marroni. Le interazioni riportate nella parte sinistra dell'immagine provvedono alla maturazione dell'adipocita marrone con la sua funzione termogenica e limitano inoltre lo stress ossidativo. Se lo stress ossidativo non viene arginato, il segnale insulinico e l'adipogenesi possono risultare alterate (parte destra).

Nell'uomo adulto sono state identificate delle regioni contenenti BAT metabolicamente attivo¹⁹⁸⁻²⁰⁰ che possono essere attivate da stimoli noradrenergici come l'esposizione al freddo²⁰¹, in particolare a livello del collo e della parte superiore del torace. Inoltre, è stato visto che gli ormoni tiroidei modulano il BAT e migliorano il diabete in un paziente con insulino-resistenza estremamente grave²⁰². Questa interessante scoperta, unitamente alle conclusioni di Hall *et al.* precedentemente riportate, ha cambiato per sempre la visione che si era avuta del BAT fino a quel momento perché apre la strada alla possibilità futura di modulare il dispendio energetico e, nel lungo periodo, di contrastare l'obesità nell'uomo.

5.5 La funzione tiroidea nell'obesità severa

Studi recenti condotti sull'uomo e su animali da laboratorio hanno evidenziato che gli adipociti e i preadipociti esprimono il recettore del TSH (TSHR)²⁰³⁻²⁰⁵ e che l'azione del TSH induce la differenziazione dei preadipociti in adipociti, l'adipogenesi e, nei bambini, la lipolisi²⁰⁵⁻²⁰⁷. Le informazioni attualmente disponibili sulla condizione tiroidea nell'obesità severa sono discordanti. Molti lavori descrivono un'elevata concentrazione plasmatica di TSH (*Thyroid Stimulating Hormone*) e di fT3 in soggetti obesi e che grandi perdite di peso ne inducono una consistente riduzione²⁰⁸⁻²¹⁰. Non è noto però se il TSH abbia un ruolo nel favorire l'accumulo di grasso o, al

contrario, se l'eccessivo accumulo di tessuto adiposo provochi l'aumento della secrezione del TSH. Inoltre, non si hanno neanche dati sull'espressione del gene del TSHR nel tessuto adiposo di pazienti con obesità severa e/o diabete.

In uno studio condotto nel 2009 su pazienti eutiroidei obesi e/o diabetici²¹¹, Nannipieri *e coll* osservano per la prima volta che nel tessuto adiposo sottocutaneo l'espressione genica di TSHR e di TR α 1 è più alta che in quello viscerale e che in entrambi i depositi adiposi le due espressioni sono ridotte negli obesi, indipendentemente dal grado di tolleranza al glucosio; i risultati confermano inoltre che negli obesi le concentrazioni di TSH e fT3 sono più alte che nei magri. Questo studio è uno dei pochi ad aver dimostrato in maniera inequivocabile che la perdita di peso dopo intervento di chirurgia bariatrica porta ad una riduzione di entrambi i livelli di TSH e fT3^{208,209,212,213}. Secondo Nannipieri *e coll*, la ridotta espressione dei recettori che inverte la sua tendenza con la perdita di peso e le direzioni opposte che hanno espressione e livelli circolanti di TSH e fT3 suggeriscono un ruolo dell'obesità, e in particolare della massa adiposa ipertrofica, nel regolare l'espressione di TSHR e, indirettamente, il TSH circolante piuttosto che un contributo dell'asse tiroideo nel causare l'obesità. I ricercatori ipotizzano che l'ipertrofia del tessuto adiposo obeso modifichi il fenotipo cellulare dell'adipocita, causando una riduzione dell'espressione dei recettori nello stesso modo in cui agisce sui recettori dell'adiponectina³⁶ o sull'insulino-sensibilità²¹⁴. Come conseguenza della downregolazione nell'espressione dei recettori di T3 e TSH, le concentrazioni plasmatiche dei ligandi aumenterebbero per far fronte alla resistenza periferica agli ormoni tiroidei instauratasi. La perdita di peso ribalterebbe questa sequenza di eventi perché ripristina la dimensione e la funzionalità degli adipociti maturi. È interessante notare che in questo studio la presenza del diabete *per se* non ha effetti sull'asse tiroideo.

6. Scopo della tesi

Scopo principale del presente progetto è stato quello di valutare in soggetti con obesità grave e/o T2DM in assenza di patologie tiroidee le concentrazioni nel tessuto adiposo viscerale di T3 e T4 e l'espressione genica delle deiodinasi (D1, D2, D3) in relazione alle concentrazioni di ormoni circolanti e confrontarli con i soggetti sani di controllo.

Scopo secondario è stato quello di valutare *in vivo* nell'animale (ratto) in varie condizioni di funzione tiroidea (ipertiroidismo o ipotiroidismo), le concentrazioni di ormoni tiroidei nel tessuto adiposo viscerale e sottocutaneo.

Materiali e metodi

1. Metodi utilizzati

1.1 Quantificazione dell'espressione genica delle deiodinasi nel tessuto adiposo viscerale umano mediante real-time PCR

Estrazione dell'RNA totale: le biopsie eseguite nel corso di intervento chirurgico (chirurgia bariatrica o chirurgia addominale minore) (peso 2-4 gr) sono state conservate a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ in RNAlater (Ambion, Texas, USA), un reagente acquoso che, penetrando nel tessuto fresco, stabilizza e protegge l'RNA dalla degradazione. Una quantità di tessuto di 150-250 mg è stata lisata in 1ml di Qiazol (Qiagen, Hilden, Germany) mediante distruzione e omogenizzazione meccanica della durata di 1 min a 25 Hz con TissueLyser (Qiagen), dopodichè il sovrinatante è stato recuperato e l'RNA totale estratto mediante il kit RNeasy Mini (Qiagen) al fine di ottenere una resa di RNA totale di 20-25 $\mu\text{g/g}$. L'RNA estratto è stato quantificato allo spettrofotometro Nanodrop (Thermo Scientific, Delaware, USA) tramite misurazione dell'assorbanza a 260 nm e 280 nm ($\geq 250\text{ ng}/\mu\text{l}$). Inoltre, mediante il rapporto delle assorbanze 260 nm / 280 nm, è stata verificata l'assenza di proteine (range ottimale = 1.8-2.0). È stata valutata inoltre l'integrità del campione tramite visualizzazione degli RNA ribosomali 18s e 28s dopo corsa elettroforetica (70 V, 1 h) di circa 250 ng di RNA estratto su gel d'agarosio all'1.5 % (Fig.18). I campioni di RNA sono stati conservati a $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ finchè non sono stati retrotrascritti a cDNA.

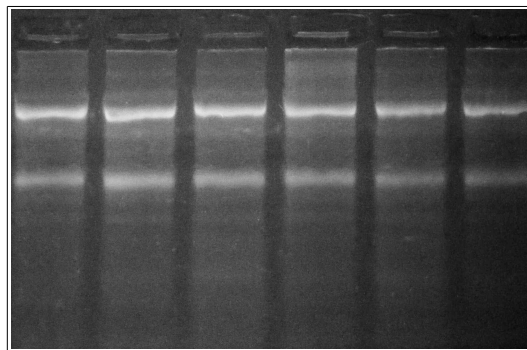


Fig.18 Controllo dell'integrità dell'RNA estratto mediante corsa elettroforetica su gel d'agarosio. La presenza delle due bande, corrispondenti agli RNA ribosomali 18s e 28s, indica che il campione non si è degradato.

Sintesi del cDNA: 0.5 μg di RNA estratto sono stati retrotrascritti a cDNA mediante iScript cDNA Synthesis Kit (Bio-Rad, Hercules, CA). Nel volume di reazione di 20 μl sono compresi: 4 μl di 5x iScript reaction mix che contiene oligonucleotidi (oligo dT) ed esameri a sequenza random come primers, 1 μl di enzima iScript reverse transcriptase, il volume di RNA pari a 0.5 μg , H_2O nucleasi-free a volume. Il protocollo di sintesi prevede l'incubazione del volume di reazione per 5 min a $25\text{ }^{\circ}\text{C}$ per consentire l'annealing dei random primers, seguiti da 30 min a $42\text{ }^{\circ}\text{C}$ necessari per la retrotrascrizione e si conclude con il blocco della reazione per 5 min a $85\text{ }^{\circ}\text{C}$. Il cDNA è stato conservato a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ finchè non è stato utilizzato per la real-time PCR.

Selezione dei primers di real-time PCR e loro messa a punto: è stata effettuata una ricerca del gene d'interesse sul database online PubMed (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed>). La sequenza codificante del mRNA (CDS) nel formato FASTA è stata poi inserita nello strumento online di ricerca di primers specifici Primer-BLAST (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/>). Tutti i parametri di ricerca sono quelli di default ad eccezione dell'intervallo di temperatura di melting (Tm) desiderato che è stato impostato su 58 °C ± 3 °C per tutti i geni oggetto di studio. Primer-BLAST propone una o più coppie di primers e tra queste è stata scelta quella in cui il forward e il reverse avessero una lunghezza compresa tra 20 e 22 paia di basi (bp) e che, oltre ad avere una perfetta complementarità con la sequenza target, desse un prodotto di reazione compreso tra 100 bp e 400 bp. La specificità della coppia è stata verificata sia virtualmente che sperimentalmente. Nel primo caso le due sequenze sono state inserite in Primer-BLAST per avere conferma della lunghezza e dell'univocità del prodotto di reazione, dopodiché la stessa ricerca è stata fatta manualmente, nucleotide per nucleotide, sulla sequenza FASTA della CDS. Nel secondo caso le condizioni ottimali per le coppie di primers specifici per i geni d'interesse sono state raggiunte facendo reazioni di PCR classica in cui è stato modificato un parametro per volta. Successivamente, sono state fatte delle prove in real-time PCR per testare i vari parametri sperimentali di amplificazione in relazione allo strumento (*Tab.1*).

<i>NCBI Ref. Seq.</i>	<i>Gene</i>	<i>Sequenza nucleotidica 5'→3'</i>	<i>Primer (bp)</i>	<i>Prodotto (bp)</i>	<i>Conc. finale primer (µM)</i>
NM_000792.5	<i>hDIO1</i>	<i>forward</i> : AGCCACGACAACCTGGATACC	20	159	0.5
		<i>reverse</i> : ACTCCCAAATGTTGCACCTC	20		0.5
NM_001242503.1	<i>hDIO2</i>	<i>forward</i> : CCACATGCCACCTTCTTGACTT	22	343	0.5
		<i>reverse</i> : CCCGTAAGCTATGTTGGCGTTA	22		0.5
NM_001362.3	<i>hDIO3</i>	<i>forward</i> : GCCTACTTCGAGCGTCTCTATG	22	112	0.5
		<i>reverse</i> : CATAGCGTTCCAACCAAGTGCG	22		0.5
NM_000194.2	<i>hHPRT</i>	<i>forward</i> : TGCTGACCTGCTGGATTACAT	21	259	0.5
		<i>reverse</i> : TTGCGACCTTGACCATCTTT	20		0.5

Tab.1 Caratteristiche delle coppie di primers utilizzate per l'amplificazione genica dei geni target (*hDIO1*, *hDIO2*, *hDIO3*) e del gene housekeeping (*hHPRT*)

Le sequenze di primers sono state sintetizzate e purificate in HPCL dalla ditta TIB MOLBIOL (Genova), che le fornisce in forma liofilizzata. Queste soluzioni madri sono state ricostituite con un volume di H₂O RNAsi-free tale da avere una concentrazione finale di 100 µM. Le soluzioni d'uso hanno invece una concentrazione di 5 µM e sono state aggiunte al volume di reazione (20 µl) per ottenere una concentrazione finale del primer pari a 0.5 µM.

Principi della quantificazione relativa dell'espressione genica delle deiodinasi: la quantificazione relativa degli mRNA è stata effettuata mediante la tecnica della real-time PCR utilizzando lo strumento LightCycler 1.5 a capillari di vetro boro-silicato (Roche Diagnostics, Germany) (Fig.19). La quantificazione avviene mediante il monitoraggio di una fluorescenza emessa durante la reazione.

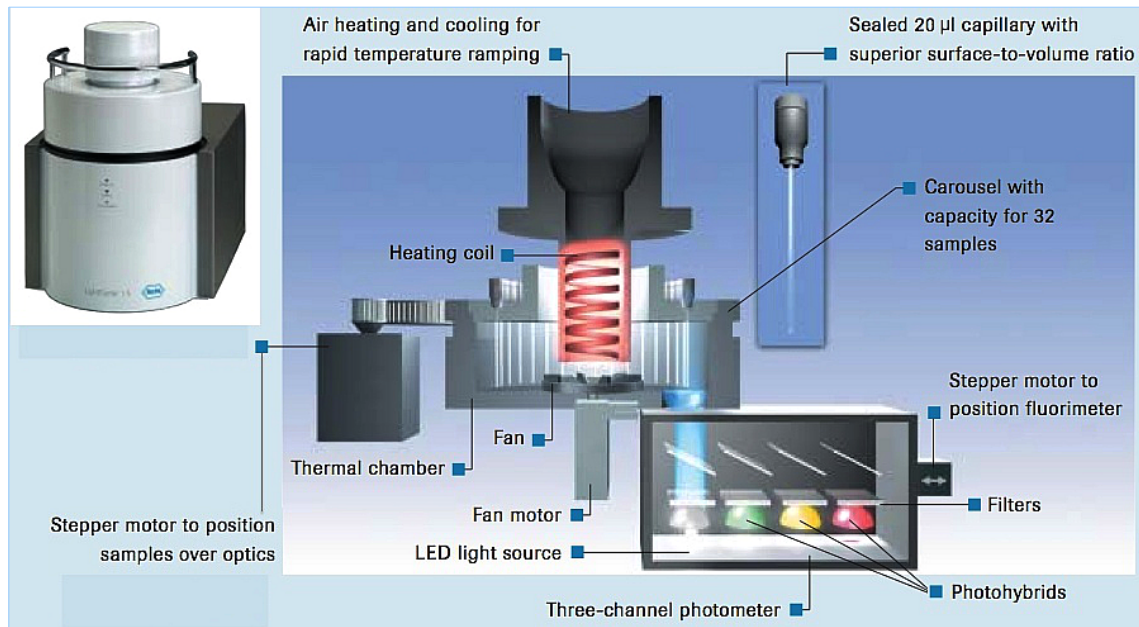


Fig.19²¹⁵ Schema del funzionamento del Roche LightCycler 1.5 (foto in alto a sinistra). L'amplificazione avviene in speciali capillari di vetro da 20 µl che garantiscono un ottimo rapporto superficie/volume di reazione. Sono saldamente chiusi per scongiurare contaminazioni e vengono posizionati, fino ad un massimo di 32, in un carosello che ruota nella camera termica dello strumento. Ad ogni misurazione, un motore a scatti fa posizionare il carosello in modo che la punta del capillare si trovi esattamente nel punto focale dell'unità ottica. Per l'eccitazione fluorescente del fluorimetro presente nel campione viene usato un singolo led blu mentre la fluorescenza di emissione viene misurata da un fotometro a tre canali, a seconda del fluorimetro utilizzato. Per realizzare gli step termici del programma di PCR, lo strumento utilizza l'aria esterna che viene convogliata all'interno mediante una piccola ventola e viene poi riscaldata con una resistenza.

Il sistema di fluorescenza che è stato qui utilizzato è costituito dal SYBR Green I, una molecola fluorescente che si lega al DNA a doppio filamento in maniera sequenza-aspecifica. La sua forma non legata emette una debole fluorescenza mentre la sua forma legata emette un segnale molto forte la cui intensità è direttamente proporzionale al cDNA presente (Fig.20).

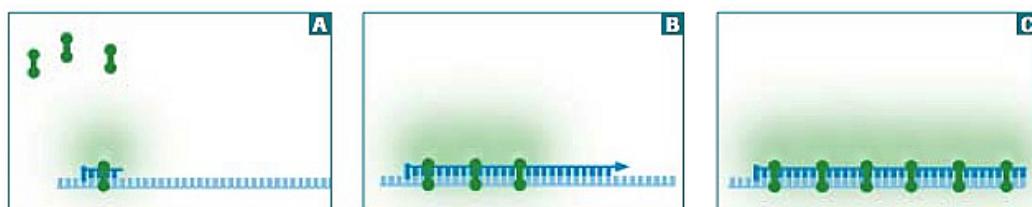


Fig.20²¹⁵ Durante la fase di annealing dei primers al cDNA (A), il SYBR Green I si lega a queste piccole regioni di dsDNA e il segnale fluorescente è debole. Durante l'elongazione (B), più dsDNA si forma, più SYBR Green I può intercalarsi e maggiore sarà l'intensità del segnale. Finita l'elongazione (C), tutto il DNA sarà ds e la quantità di SYBR Green I intercalato sarà massima. La fluorescenza di emissione viene misurata a 530 nm alla fine dell'elongazione.

L'espressione genica delle tre deiodinasi è stata valutata mediante quantificazione degli mRNA ed è relativa a quella del gene housekeeping di riferimento, HPRT (Hypoxanthine-guanine Phospho-

Ribosyl-Transferase). Quest'ultimo è stato scelto perché la sua espressione è pressoché costante nei vari tipi di tessuto adiposo e tra casi e controlli. Data l'aspecificità di legame del SYBR Green I al dsDNA, dopo l'amplificazione è stato necessario effettuare l'analisi delle curve di melting dei prodotti di amplificazione (da 65 °C a 95 °C con variazione di 1 °C/s) per accertare la purezza dell'amplificato e l'assenza di primers dimerizzati. Inoltre, un parametro molto importante per la quantificazione è il C_T (Threshold Cycle). Esso corrisponde al numero di cicli al quale la fluorescenza emessa supera un livello basale stabilito dall'operatore. Guardando la curva di amplificazione, il C_T si trova all'inizio della fase lineare-logaritmica cioè nel punto in cui la curva cambia pendenza diventando esponenziale. Maggiore è la quantità iniziale di campione da amplificare, prima la curva cambierà pendenza e minore sarà il C_T . Valori di C_T maggiori di 40 indicano assenza di amplificazione e non possono essere inclusi nell'analisi (Fig.21).

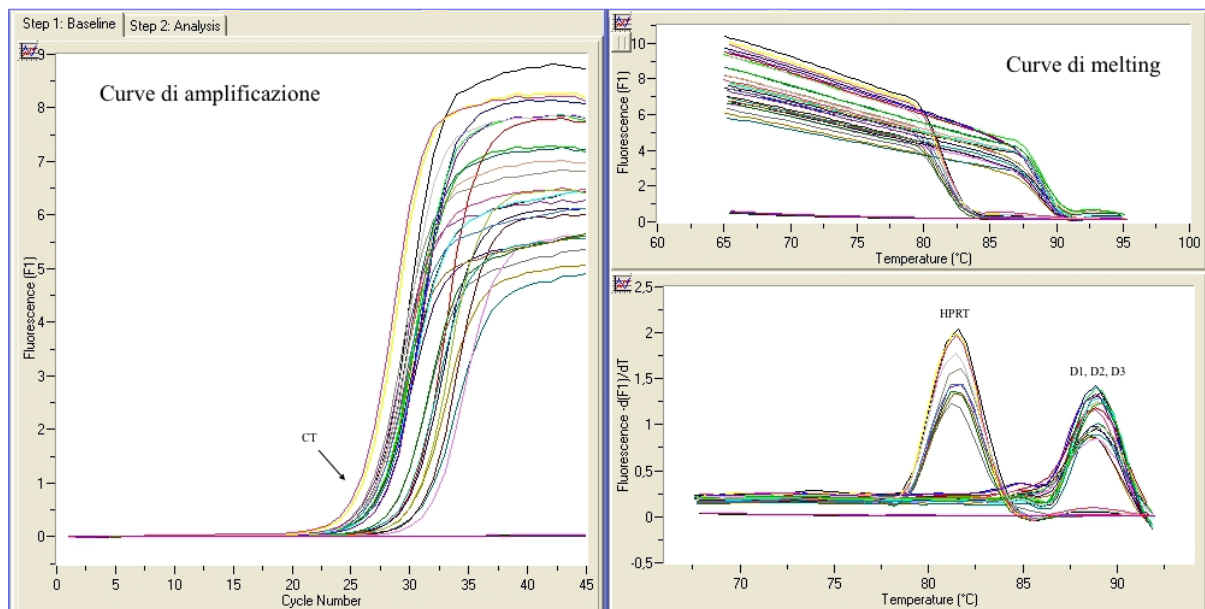


Fig.21 Le curve di amplificazione (sinistra) e di melting (destra) di un programma di real-time PCR completo in cui sono stati amplificati i geni delle deiodinasi e il gene housekeeping a partire da una serie di cDNA di tessuti adiposi viscerali. Ad una prima analisi della buona riuscita della reazione, è bene assicurarsi che i C_T siano < 40 e che le curve di melting degli amplificati abbiano il punto più alto corrispondente alla stessa T_m nell'ambito dello stesso gene. Da questo si evince la purezza degli amplificati e l'assenza di primers dimerizzati. Le linee rette (assenza di amplificazione) corrispondono ai bianchi (contengono tutti i reagenti tranne il cDNA).

Per accertare l'efficienza della reazione e per definire la sensibilità dell'analisi è stata costruita, per ogni gene, una curva standard (accettabile se i parametri sono slope ≈ -3 , r-value > 0.98): è stato preparato un pool con l'RNA totale di 9 soggetti di controllo e 0.5 μg sono stati retrotrascritti. Sono state preparate diluizioni seriali di cDNA: 1:2, 1:4, 1:8 e ogni gene target è stato amplificato in duplicato insieme al gene di riferimento. Il software LightCycler Relative Quantification (Roche Diagnostics) elabora un coefficiente in grado di esprimere quanto la curva dei geni target si discosti da quella del gene housekeeping. Questo coefficiente verrà utilizzato nell'analisi della quantificazione relativa dell'espressione genica. La diluizione 1:2 della curva standard è stata scelta,

secondo criteri arbitrari, come calibratore ed è stata inserita all'interno di ogni programma di real-time PCR, anch'essa in doppio, come primo e come ultimo campione per assicurarsi che l'efficienza della reazione fosse costante per tutta la durata del programma.

Condizioni di real-time PCR: il programma di PCR e le concentrazioni dei reagenti sono gli stessi per tutti i geni. Per ogni campione, il volume di reazione di 20 µl è stato posto in un capillare di vetro (LightCycler Capillaries, Roche Diagnostics) aggiungendo: 1 µl di cDNA, 1x LightCycler FastStart DNA Master SYBR Green I (Roche Diagnostics), 3 mM di MgCl₂ e 0.5 µM di primers (TIB MOLBIOL). Il programma di PCR è consistito in: denaturazione iniziale a 95 °C per 10 min, 45 cicli di denaturazione a 95 °C per 10 s, annealing a 58 °C per 7 s, estensione a 72 °C per 13 s, raffreddamento finale a 40 °C per 30 s. La fluorescenza è stata acquisita alla fine di ciascuna fase di estensione. Dopo l'amplificazione sono state costruite le curve di melting tra 65 °C e 95 °C con variazione di 1 °C/s mediante acquisizione continua della fluorescenza.

Analisi dei dati di real-time PCR: per la quantificazione relativa dell'espressione genica di DIO1, DIO2 e DIO3 è stato utilizzato il software LightCycler Relative Quantification. A partire dai singoli C_T, il software esprime i risultati come il rapporto gene target/gene housekeeping per ogni campione, normalizzato per il rapporto gene target/gene housekeeping del calibratore. Quanto più il rapporto gene target/gene housekeeping del campione analizzato si discosta dal rapporto gene target/gene housekeeping del calibratore (pari a 1), tanto più l'espressione del gene target nel tessuto adiposo viscerale del paziente obeso e/o diabetico differisce da quella nel tessuto adiposo viscerale dei soggetti di controllo: valori normalizzati >1 indicano sovraespressione mentre valori normalizzati <1 indicano sottoespressione.

Essendo il calibratore presente in ogni programma di real-time, il suo rapporto gene target/gene housekeeping è stato ritenuto accettabile se differiva di non più di 0.5 C_T dallo stesso rapporto nella curva standard e se lo scostamento aveva lo stesso segno per entrambi i geni. In caso contrario, i dati non sono stati accettati.

Valori normalizzati del campione >2.5 o <0.1 sono fuori scala in quanto derivano da C_T al di fuori della curva standard del gene target. In entrambi i casi è stata ripetuta l'analisi diluendo o aumentando il volume di cDNA unicamente per il gene target del campione e poi moltiplicando/dividendo il valore finale per il fattore di diluizione/concentrazione.

Elettroforesi su gel d'acrilammide e colorazione all'argento: per accertare la purezza dell'amplificato, è stata effettuata una corsa elettroforetica su gel d'acrilammide dell'intero prodotto

di real-time PCR (Fig.22).

Le maglie del gel d'acrilammide permettono di separare gli acidi nucleici con una definizione maggiore rispetto al gel d'agarosio e la colorazione all'argento è molto più sensibile (si può rilevare fino a 1 ng di campione) rispetto ad altre colorazioni (es. blu di Coomassie). I gel di poliacrilammide vengono definiti in base alla percentuale totale di acilammide+bis-acrilammide presente e le dimensioni dei pori del gel sono determinate dalle concentrazioni di acrilammide e bis-acrilammide impiegate.

Nel nostro caso, sono state scelte le concentrazioni e le condizioni elettroforetiche ottimali per la migliore discriminazione dei prodotti di PCR: gel all'8 % a partire da 30% Acrylamide Bis/Solution 37.5:1 (Bio-Rad, Hercules, CA) e corsa elettroforetica a 15 W per 40 min durante la quale gli acidi nucleici si sono separati in base al loro peso molecolare. La colorazione all'argento è stata effettuata secondo la metodica descritta da Nannipieri *et al*²¹⁶.

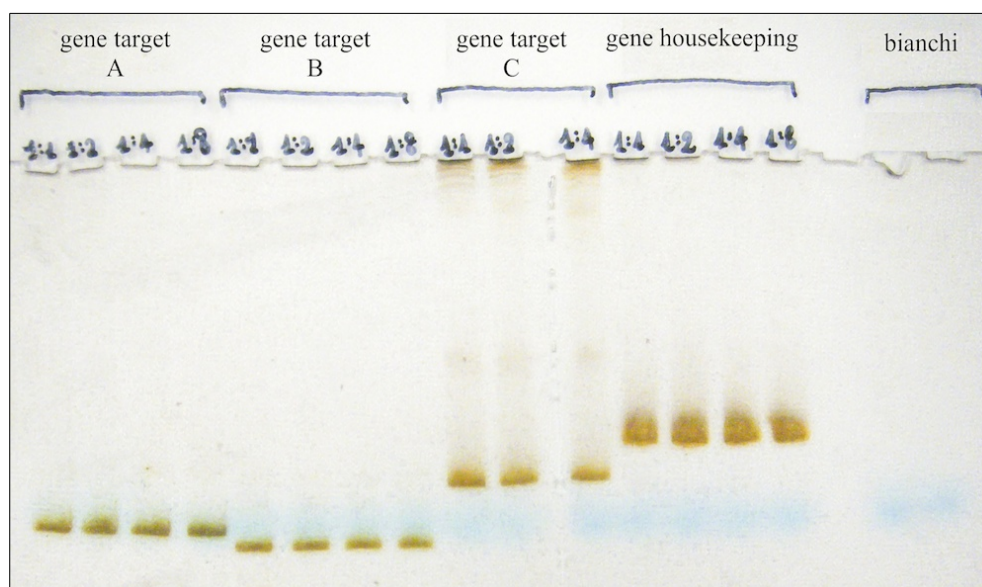


Fig.22 Gel d'acrilammide all'8 % la cui colorazione all'argento mostra la purezza dei prodotti d'amplificazione delle varie diluizioni delle curve standard dei geni target e del gene housekeeping e l'assenza di prodotti d'amplificazione nei bianchi.

1.2 Quantificazione degli ormoni tiroidei intratissutali mediante spettrometria di massa

Estrazione degli analiti: dato l'elevato contenuto di lipidi del tessuto adiposo, nell'ambito di questa tesi è stata messa a punto una procedura di estrazione di tipo liquido-liquido a partire dal lavoro di Geens *e coll*²¹⁹ e grazie alla collaborazione con i gruppi di ricerca del Prof. Riccardo Zucchi (Dipartimento di Patologia Chirurgica, Medica, Molecolare e dell'Area Critica, Università di Pisa) e del Dott. Alessandro Saba (Centro di Spettrometria di Massa, AOUP). Tale procedura è analoga per entrambi i tessuti adiposi umani e di ratto, con l'unica differenza che, essendo i tessuti di ratto piuttosto resistenti all'omogenizzazione, per questi ultimi è stato aggiunto, subito dopo la pesata, uno step di omogenizzazione “a secco” con TissueLyser di 5 min a 25 Hz del tessuto

ricongelato.

I tessuti adiposi umani (conservati a -20 °C in RNA^{later}) e quelli di ratto (conservati a -80 °C) sono stati scongelati e ne è stata pesata una quantità compresa tra i 150 mg e i 250 mg. A quelli umani sono stati inoltre applicati due lavaggi in PBS per rimuovere le tracce di RNA^{later} in quanto le specie chimiche in esso contenute potrebbero condizionare l'analisi allo spettrometro di massa, mentre quelli di ratto vengono sono stati omogenizzati preliminarmente “a secco” come appena descritto. Ad ogni campione, posto in una provetta in polipropilene da 2 ml, è stata aggiunta una soluzione contenente: 150 µl HCl 0.1 M; 850 µl Acetonitrile (AcN) (in questo modo si favorisce lo spostamento delle sostanze contenenti il gruppo amminico, come i nostri analiti, verso la fase estraente); 10 µl di una miscela di standard interni marcati con isotopi stabili costituita da ¹³C₆-T3 (20 nM per l'uomo, 400 nM per il ratto) e ¹³C₆-T4 (600 nM per uomo e ratto) (Isoscience, King of Prussia, PA). L'impiego degli standard marcati all'inizio del trattamento del campione consente un tracciamento degli analiti per l'intero processo di estrazione ed analisi. Tale tecnica è detta *diluizione isotopica*^{220,221}.

I campioni sono stati poi immersi per 30 min in un bagno ad ultrasuoni per indurre l'indebolimento della matrice del tessuto dopodiché sono stati omogenizzati 2 volte con TissueLyser per 5 min a 25 Hz. L'omogenato è stato trasferito in un set di tubi di vetro da batteriologia e i residui di tessuto sono stati recuperati con AcN per un volume totale di 2 ml. Un ulteriore bagno ad ultrasuoni di 10 min ha rotto definitivamente le membrane cellulari: l'agitazione successiva di 30 s su vortex ha completato l'opera e, centrifugando il campione a 2000 rpm per 15 min, sono stati separati i detriti cellulari dal sovrantante. Una volta trasferito quest'ultimo in un nuovo set di tubi di vetro, sono stati effettuati 3 lavaggi con esano per rimuovere la parte lipofila (si aggiunge 1 ml di esano, si agita vigorosamente per qualche secondo per creare un'emulsione, si lascia a riposo per qualche minuto, si rimuove l'esano) ed è stata portata a secco la fase contenente AcN (e quindi gli analiti) a 45 °C sotto flusso di N₂. Una volta portato a secco, il campione è stato conservato a -20 °C fino al momento della derivatizzazione. Tutti gli oggetti impiegati in laboratorio sono stati di tipo usa e getta per evitare contaminazioni.

Derivatizzazione: questo step, aggiunto alla metodica nell'ambito di questo progetto di tesi e descritto da Saba *et al.*²²¹, ha consentito di ottenere gli esteri butilici di T3 e T4 fornendo un rapporto segnale/rumore più alto di quello delle specie chimiche non derivatizzate e rendendo quindi il dosaggio più affidabile. La resa dell'esterificazione è stata circa del 100 % per T3 e dell'80 % per T4.

Ad ogni campione portato a secco sono stati aggiunti 200 µl di agente derivatizzante, l'acido

cloridrico 3 N in *n*-butanolo (Regis Technologies Inc, IL, USA). Sono stati poi incubati per 1 h in stufa a 60 °C per permettere l'esterificazione contemporanea di T3 e T4 e dei corrispettivi standard interni marcati, ottenendone gli esteri butilici. Il derivatizzante in eccesso è stato fatto evaporare a 60 °C sotto flusso di N₂. Una volta essiccato, il campione derivatizzato è stato conservato a -20 °C fino al momento dell'analisi quando è stato ricostituito con 100 µl di 0.1 M MeOH/HCl 50:50 v:v (agitazione su vortex per 45 min, centrifugazione a 14000 rpm per 10 min, recupero del sovrantante e suo trasferimento in apposite fiale di vetro o in piastre multiwell).

Curve di calibrazione: una determinazione quantitativa accurata richiede la costruzione di una curva di calibrazione che correli il segnale con la concentrazione. Per questo motivo, parallelamente ai campioni e a partire da soluzioni standard in metanolo, sono state realizzate delle curve di calibrazione contenenti i due analiti di nostro interesse ad 8 livelli di concentrazione (Tab.2) e la stessa quantità di standard interni aggiunta ai campioni.

Anche le curve di calibrazione sono state derivatizzate e ricostituite con le stesse modalità impiegate per i campioni. T3 e T4 sono stati acquistati presso Sigma-Aldrich (St.Louis, MO, USA).

	<i>Analita</i>	<i>Concentrazioni degli analiti per ogni punto delle curve di calibrazione (ng/ml)</i>							
<i>uomo</i>	T3	0.05	0.1	0.2	0.5	1	2	5	10
	T4	0.5	1	2	5	10	20	50	100
<i>ratto</i>	T3	0.5	1	2	5	10	20	50	100
	T4	0.5	1	2	5	10	20	50	100

Tab.2 Le concentrazioni degli analiti che sono state utilizzate per ogni punto delle curve di calibrazione, nell'uomo e nel ratto.

Principi della spettrometria di massa accoppiata all'HPLC: mentre in passato T3 e T4 tissutali sono stati misurati mediante saggi immunometrici e dopo procedure complesse di estrazione e purificazione²²²⁻²²⁴, oggi le tecniche basate sulla spettrometria di massa sono considerate il gold standard perché permettono la quantificazione nell'ordine dei pg/ml di numerosi metaboliti in una matrice biologica nell'ambito di una singola analisi e perché scongiurano i potenziali problemi legati alla cross-reattività degli antisieri contro specie ignote o quelli legati alle differenze tra le specie²²¹.

La metodica qui utilizzata è la spettrometria di massa tandem (quest'ultimo termine è dovuto alla geometria degli analizzatori) accoppiata ad un'appropriata tecnica di separazione (HPLC-MS-MS). Questa metodica combina la cromatografia ad alte prestazioni, HPLC (*High Performance Liquid Chromatography*), con la sensibilità e specificità che sono tipiche della spettrometria di massa. Lo

strumento tipo consiste in una pompa HPLC, un autocampionatore, una colonna cromatografica ed un rivelatore che nel nostro caso è costituito da uno spettrometro di massa a triplo quadrupolo. Con quest'ultimo è possibile misurare la massa delle molecole di interesse e quella dei frammenti da esse originati, purchè siano in forma ionica.

Lo spettro di massa di un campione viene ottenuto trasformando le molecole degli analiti in ioni gassosi di elevata mobilità per poi separarli in base al loro rapporto massa/carica (m/z). L'accoppiamento tra HPLC e spettrometria di massa è stato reso possibile dallo sviluppo di opportune interfacce in grado di ionizzare molecole in fase acquosa, a pressione atmosferica, e di trasmettere gli ioni così generati in zone di alto vuoto dello spettrometro di massa dove vengono analizzati.

La ionizzazione elettrospray: nell'ambito di questo lavoro di tesi è stata utilizzata la tecnica di ionizzazione *ESI* (*Electro Spray Ionization*). La tecnica ESI sfrutta l'emissione di ioni in fase gassosa a partire da goccioline cariche prodotte per nebulizzazione di una soluzione dell'analita in un solvente polare, in presenza di un elevato potenziale elettrostatico e di un opportuno flusso di gas inerte. Il principio di funzionamento di questa sorgente si basa su una nebulizzazione elettrostatica dell'analita direttamente nella fase liquida. In pratica il solvente HPLC contenente l'analita viene fatto fluire attraverso un capillare in acciaio sottoposto ad elevata differenza di potenziale (5kV c.a.), con lo scopo di generare nebulizzazione elettrostatica. Le goccioline cariche che vengono a formarsi hanno una netta prevalenza di un tipo di carica (positivo per applicazione di un potenziale positivo e negativo per applicazione di un potenziale negativo) e al loro interno gli ioni presenti in eccesso tendono a disporsi sulla superficie delle goccioline, al fine di minimizzare la repulsione elettrostatica coulombiana. Essi sono trattenuti dalla tensione superficiale del solvente. In seguito all'evaporazione del solvente, e al conseguente aumento del campo elettrico dovuto a una contrazione di volume (e quindi di superficie) delle goccioline, si raggiunge una situazione limite in cui gli ioni vincono la tensione superficiale e vengono espulsi nella fase gassosa. Tale fenomeno prende il nome di "evaporazione ionica" (*Fig.23*).

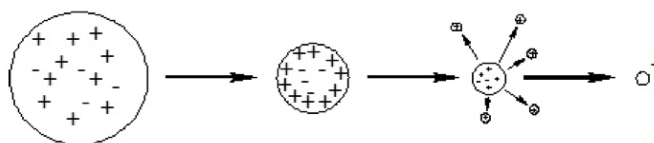


Fig.23 Principio di funzionamento dell'evaporazione ionica.

Perché la ionizzazione possa avvenire, l'analita deve essere piuttosto polare, avere una maggior basicità (nel caso della modalità ioni positivi) o acidità (in modalità ioni negativi) del solvente o

della miscela di solventi, ed un'energia di desolvatazione non eccessiva. L'uso di solventi aventi elevata tensione superficiale come l'acqua, o la presenza di tensioattivi, limita la desolvatazione degli ioni. Una massiccia presenza di sostanze ioniche (tamponi o sali), invece, peggiora l'efficienza di ionizzazione dell'analita, causando competizione per il desorbimento dalla superficie delle goccioline, con conseguente perdita di segnale dell'analita.

La spettrometria di massa a triplo quadrupolo: lo spettrometro di massa utilizzato per questo lavoro di tesi è del tipo a triplo quadrupolo (Fig.24).

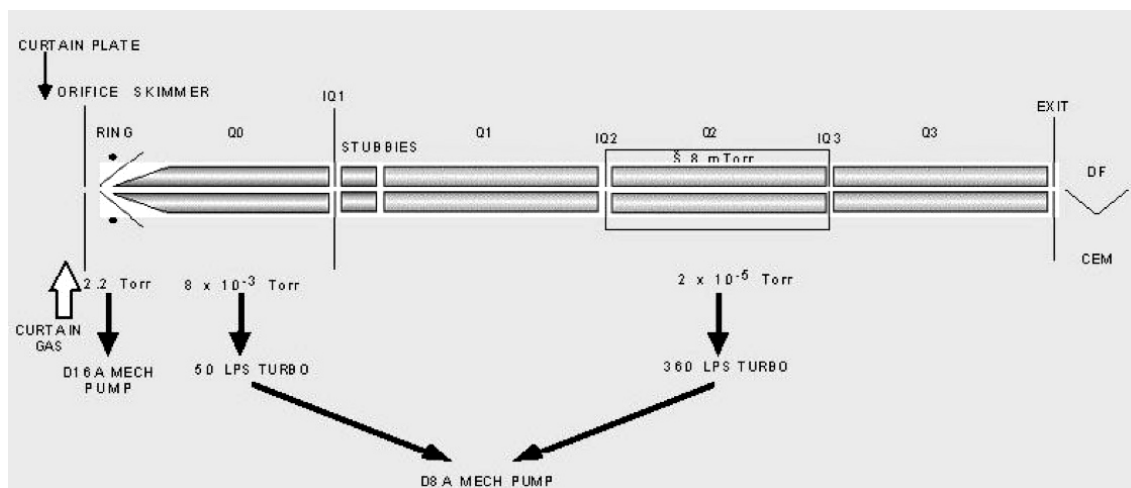


Fig.24 Analizzatore a triplo quadrupolo: schema del cammino ottico.

Esso è dotato di 3 selettori quadrupolari nella zona di alto vuoto (Q1, Q2, Q3), preceduti da uno ulteriore (Q0) nella zona di vuoto intermedio. Una volta generato in sorgente, il flusso degli ioni viene accelerato da un potenziale di declustering e desolvato dalle residue molecole neutre di solvente mediante urti con una cortina di gas inerte (curtain gas). Il flusso ionico dopo esser passato dalla zona a pressione atmosferica ad una con vuoto di circa 2 Torr, attraversa uno skimmer (una lente avente forma tronco-conica con il vertice rivolto verso il flusso ionico) dove viene separato dalle molecole del curtain gas, che a causa della loro natura di molecole neutre subiscono dispersione verso il sistema di vuoto. Il flusso ionico giunge quindi al quadrupolo Q0, dove il vuoto ha un valore di circa 10^{-2} Torr. Il Q0, costituito da quattro barre di metallo soggette a differenza di potenziale alternata, ha la funzione di imprimere moto armonico agli ioni entranti e favorisce la definitiva declusterizzazione degli ioni stessi. Dal Q0 gli ioni passano al Q1, il primo vero e proprio analizzatore di massa, alle cui barre oltre ad applicare un potenziale in radiofrequenza si applica anche un potenziale continuo: tale combinazione permette la separazione degli ioni in base al loro rapporto massa/carica, la cui rivelazione fornisce un vero e proprio spettro di massa singola delle specie ioniche provenienti dalla sorgente. Un analizzatore a multiplo quadrupolo, quale quello

utilizzato durante il presente lavoro di tesi, rende possibile l'indagine della natura degli ioni prodotti in sorgente, in termini sia qualitativi che quantitativi, grazie alla possibilità di studiarne la frammentazione. Tale frammentazione viene infatti realizzata nel successivo quadrupolo del cammino ottico, Q2, che, se riempito con un opportuno gas inerte, opera come cella di collisione. Qui uno ione selezionato nel Q1 viene sottoposto a collisione con un'energia regolabile dall'operatore (energia di collisione) in modo tale da determinarne la frammentazione con formazione di ioni prodotto. L'indagine sulla natura delle specie prodotte per frammentazione viene poi effettuata con il quadrupolo successivo, Q3, che fornisce informazioni che possono essere utilizzate anche per studi strutturali di molecole organiche di natura incognita. La rivelazione del segnale rappresenta l'ultimo stadio del processo. Gli ioni che fuoriescono dal cammino ottico entrano in un elettromoltiplicatore, che ha il compito di trasformare il segnale ionico in un segnale elettrico che può essere registrato ed elaborato.

Metodo di analisi: poiché è possibile che specie di differente natura producano ioni indistinguibili durante il meccanismo di ionizzazione (ioni isobari, cioè aventi stesso rapporto massa/carica), per discriminarli è stato applicato il metodo *SRM (Selected Reaction Monitoring)*. Questo consiste nel selezionare il singolo ione quasi-molecolare dell'analita con il Q1, indurre la sua frammentazione tramite il Q2 e monitorare un numero opportunamente scelto di frammenti diagnostici tramite il Q3. Bisogna tener presente che difficilmente specie chimiche di natura diversa, ma con ioni quasi-molecolari indistinguibili, sono soggette allo stesso tipo di frammentazione. In particolare alcuni tra i prodotti di frammentazione sono caratteristici della molecola di interesse e pertanto il loro monitoraggio conferisce al metodo analitico un'elevata specificità.

Nel caso del presente lavoro di tesi, le transizioni (costituite da ione precursore e ione prodotto dalla frammentazione del primo) che sono state scelte sono riportate nella *Tab.3*.

Analyte	MS for Derivatized Compounds			
	SRM transition	DP	CE	CXP
T ₃ -But	708 → 479		54	12
	708 → 606	84	38	17
	708 → 652		27	19
¹³ C ₆ -T ₃ -But	714 → 485		54	12
	714 → 612	84	38	17
	714 → 658		27	19
T ₄ -But	834 → 605		61	16
	834 → 732	82	43	20
	834 → 778		30	23
¹³ C ₆ -T ₄ -But	840 → 611		61	16
	840 → 738	82	43	20
	840 → 784		30	23

*Tab.3*²²¹ Transizioni SRM e parametri ottimizzati per gli analiti e gli standard interni derivatizzati (DP=Declustering Potential; CE=Collision Energies; CXP=Collision Exit Potential)

Tra le transizioni riportate nella *Tab.3*, le seguenti sono state scelte come “quantificatori” in quanto forniscono il migliore rapporto segnale/rumore: $m/z = 708 \rightarrow 606$ (T3-But); $714 \rightarrow 612$ ($^{13}\text{C}_6$ -T3-But); $834 \rightarrow 732$ (T4-But); $840 \rightarrow 738$ ($^{13}\text{C}_6$ -T4-But).

Il risultato dell'analisi HPLC-MS-MS è un diagramma analogo a quello che si ottiene in HPCL (*Fig.25*). I picchi di corrente ionica sono relativi agli analiti d'interesse e, come detto in precedenza, sono frutto di elevatissima sensibilità e specificità.

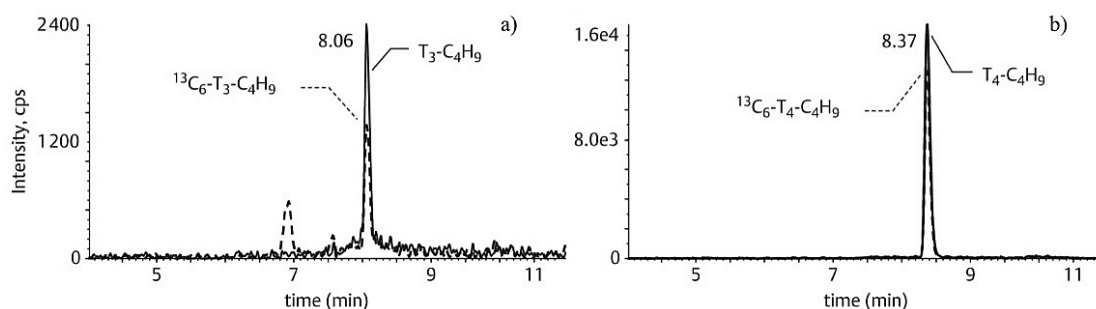


Fig.25²²¹ Quantificazione delle transizioni SRM relative agli analiti e ai loro standard interni marcati derivatizzati: a) T3-But e $^{13}\text{C}_6$ -T3-But ; b) T4-But e $^{13}\text{C}_6$ -T4-But

Strumentazione e reagenti: lo spettrometro di massa utilizzato è l'Applied Biosystems/Sciex (Concord, ON, Canada) API 4000 a triplo quadrupolo, equipaggiato con sorgente IonSpray/APCI. Il sistema HPLC è il Perkin Elmer (Boston, MA, USA) Serie 200 Micro, costituito da autocampionatore termostato, due pompe monosolvente per microflussi e forno per colonne. Il controllo del sistema HPLC-MS-MS e l'acquisizione dati sono stati effettuati per mezzo del software di gestione Applied Biosystems/Sciex Analyst (rev. 1.4.2). La separazione analitica è stata ottenuta utilizzando una colonna Phenomenex® (Torrance, CA, USA) Gemini C18 (2 x 50 mm, 3 μm), preceduta da una precolonna Phenomenex Gemini C18 (4 x 2 mm).

Tutti i reagenti sono Sigma-Aldrich, tranne quando diversamente specificato. I solventi per le misurazioni HPLC-MS-MS hanno un grado di purezza LC-MS (basso contenuto di impurità alcaline che potrebbero interferire con l'analisi formando artefatti con l'analita), mentre gli altri reagenti hanno un grado di purezza HPLC o reagente.

2. Materiali utilizzati

2.1 Studi sull'uomo: partecipanti e disegno sperimentale

Lo studio di riferimento ha coinvolto 105 pazienti con obesità severa, in lista d'attesa per un intervento di bypass gastrico; 19 pazienti non obesi in attesa d'intervento di chirurgia addominale minore (es. colecistectomia) hanno costituito il gruppo di controllo. Tutti i partecipanti hanno firmato il consenso informato e il protocollo è stato approvato dal Comitato Etico locale.

I pazienti obesi sono stati a loro volta raggruppati in base alla tolleranza al glucosio (determinata

con un OGTT standard di 75 gr o da una diagnosi precedente di T2DM): 57 pazienti hanno NGT (*Normal Glucose Tolerance*) e 48 hanno IGT (*Impaired Glucose Tolerance*) o T2DM.

A tutti i pazienti è stato chiesto di presentarsi alla U.O. di Medicina Generale 3 della AOUP per sottoporsi allo studio metabolico due settimane prima dell'intervento ed inoltre gli è stato chiesto di non svolgere attività fisica nelle 48 h precedenti lo studio. Per quanto riguarda lo studio metabolico, tutti i pazienti sono stati esaminati la mattina dopo un digiuno notturno (12-14 h). Sono stati effettuati prelievi di sangue periferico per la determinazione di: profilo lipidico, glucosio ematico, insulina, TSH e concentrazioni di ft3 e ft4. È stato inoltre eseguito un OGTT (*Oral Glucose Tolerance Test*) con 75 gr di glucosio eseguendo prelievi ematici ogni 30 min nelle 2 h seguenti per misurare i livelli ematici di glucosio ed insulina. Gli IGT e i T2DM sono stati classificati secondo i criteri ADA²²⁵. I pazienti diabetici che non assumevano insulina sono stati considerati T2DM, così come quelli che assumevano insulina e la cui età d'insorgenza fosse ≥ 40 anni o il cui IMC fosse > 30 kg/m². I pazienti rimanenti che assumevano insulina sono stati considerati T1DM o inclassificabili, e sono stati quindi esclusi dallo studio.

Sono state effettuate anche misurazioni antropometriche, del peso, dell'altezza, delle circonferenze del torace e dei fianchi, così come sono state misurate le pressioni sanguigne sistoliche e diastoliche, come descritto nel lavoro di Nannipieri *e coll*²¹⁶. IMC è stato calcolato come il peso diviso per il quadrato dell'altezza ed è stato usato come un indice dell'adiposità totale. I pazienti con una storia di abbuffate, assunzione eccessiva di alcol, fumo, patologia renale terminale, infarto negli ultimi 6 mesi, epatite cronica da virus dell'epatite B o C, patologie tiroidee in fase di scompenso (ipo o ipertiroidismo ecc.) o che stessero assumendo ormoni tiroidei sono stati esclusi dallo studio.

La concentrazione del glucosio plasmatico è stata misurata con un Beckman Glucose Analyzer 2 (Beckman, CA, USA). Le concentrazioni sieriche a digiuno di colesterolo totale, LDL, HDL e trigliceridi sono state determinate come precedentemente descritto (Synchron CX4, Beckman, CA, USA). L'insulina plasmatica è stata misurata mediante saggio radioimmunometrico (Linco Research, MO, USA) e i livelli di TSH, ft3 e ft4 mediante un saggio immunoenzimatico totalmente automatizzato (AIA 600 System, TOSOH Corporation, Tokyo, Japan).

Il dosaggio degli ormoni tiroidei intratissutali (tessuto adiposo viscerale) T3 e T4 è stato effettuato in un sottogruppo di partecipanti allo studio (26 Obesi-NGT, 14 Obesi-IGT/T2DM, 4 controlli).

2.2 Studi sul ratto: modello animale e disegno sperimentale

L'utilizzo degli animali in questo studio è conforme alle raccomandazioni riportate in "Guide for the Care and Use of Laboratory Animals" (NIH Publication No.85-23, revised 1996) e il protocollo è stato approvato dal Comitato per l'utilizzo degli animali del Ministero della salute italiano

(Approvazione n.135/2008-B). Tutte le operazioni chirurgiche sono state svolte sotto anestesia e sono stati attuati tutti gli sforzi per ridurre al minimo la sofferenza.

I ratti utilizzati sono di ceppo Wistar (ratti albini d'allevamento). Il loro peso varia tra i 280 gr e i 300 gr. Lo studio ha coinvolto 16 ratti che possono essere così suddivisi in base al trattamento subito: 3 ratti sono stati resi ipertiroidei mediante iniezione sottocutanea di T4 (farmaco *Tirosint*) alla dose di 250-300 µg/Kg/giorno per 6 giorni consecutivi; 4 ratti sono stati resi ipotiroidei mediante una soluzione allo 0.05% di PTU (*6-n-propil-2-tiouracile*), un composto chimico tireoinibente, somministrato con l'acqua da bere per 21 giorni consecutivi; a 4 ratti è stato provocato un infarto acuto dopodiché, a 24 h dall'evento ischemico è stata impiantata sottocute una mini pompetta osmotica per dispensare T3 esogeno per ulteriori 2 giorni prima del sacrificio alla dose di 6 µg/Kg/giorno per 2 ratti (T3 a bassa dose) e alla dose di 45 µg/Kg/giorno per gli altri 2 ratti (T3 ad alta dose). L'induzione dell'infarto con riperfusione^{221,226} è una procedura che fa parte di uno studio più ampio incentrato sul cuore, in via di svolgimento dal gruppo di ricerca del Dott. Giorgio Iervasi presso il laboratorio di Endocrinologia Cardiovascolare del CNR di Pisa, e i cui risultati sono in fase di pubblicazione. 5 ratti non hanno subito alcun trattamento e hanno costituito il gruppo di controllo. Al momento del sacrificio, previo prelievo di sangue dalla vena femorale, ai ratti è stata somministrata una dose letale di anestetico gassoso (isofluorano) e gli organi interni e i tessuti (incluso il tessuto adiposo) sono stati rimossi, congelati immediatamente in azoto liquido e conservati a -80 °C fino al momento dell'uso. Il tessuto adiposo viscerale è stato prelevato in zona perirenale, quello sottocutaneo è stato prelevato a livello lombare.

Il sangue prelevato è stato immediatamente centrifugato a 5000 xg per 10 min e sul siero sono stati determinati i livelli circolanti di fT3 e fT4; questi sono stati misurati, come riportato nel lavoro di Forini *e coll*²²⁷, usando un AIA 21 analyzer (Eurogenetics-Tosoh, Torino).

3. Analisi statistica

I risultati sono espressi come media±s.d. o mediana [range interquartile], rispettivamente per le variabili con distribuzione normale o non normale. Le differenze tra i gruppi sono state valutate con il test del χ^2 per le variabili discrete e con il test di Kruskal-Wallis per le variabili continue. L'analisi per le misure ripetute è stata svolta mediante ANOVA. I dati appaiati sono stati confrontati con il test dei ranghi con segno di Wilcoxon. Le associazioni univariate sono state testate con il coefficiente di Spearman, rho. Le analisi multivariate sono state svolte usando modelli lineari generici, includenti variabili sia continue che discrete (genere, presenza di obesità e presenza di diabete); i risultati sono determinati dal coefficiente di regressione (*sd.r*). Per le analisi multivariate, le variabili con distribuzione non normale sono state espresse come il loro logaritmo.

Risultati

1. Studi sull'uomo

Le caratteristiche cliniche della popolazione studiata sono riportate nella *Tab.4*.

Parametro	Obesi-NGT	Obesi-T2DM/IGT	Controlli
Soggetti (n)	57	48	19
Genere (F/M)	49/8	34/14	15/4
Età (aa)	39 ± 11	47 ± 11	51 ± 11*
IMC (kg m ⁻²)	47.4 ± 9.8	46.5 ± 6.3	23.9 ± 2.9*
PAS (mm Hg)	126 ± 15	113 ± 16*	123 ± 10
PAD (mm Hg)	76 ± 12	82 ± 10°	77 ± 7
TG (mg per 100ml)	120 ± 43	194 ± 124*	111 ± 21
T-col. (mg per 100ml)	192 ± 36	210 ± 47	193 ± 7
HDL-col. (mg per 100ml)	49 ± 10	43 ± 11°	47 ± 2
GPD (mg per 100ml)	88 ± 9	137 ± 40*	89 ± 7
GP-2 ore (mg per 100ml)	108 ± 21	191 ± 39*	113 ± 10
Ins. D (μU ml ⁻¹)	19.5 ± 12.5	23.4 ± 16.6 [§]	10.9 ± 7.2
Creatinina (mg per 100ml)	0.7 ± 0.1	0.8 ± 0.1	0.9 ± 0.2*
TSH (μU ml ⁻¹)	1.8 ± 1.1	2.3 ± 2.3	0.7 ± 0.4*
ft3 (pg ml ⁻¹)	3.6 ± 0.8	3.2 ± 0.8	2.7 ± 0.4*
ft4 (pg ml ⁻¹)	10.5 ± 2.7	11.0 ± 2.4	12.8 ± 2.2*
ft3/ft4	0.34	0.29	0.21*

Tab.4 Studio di riferimento e caratteristiche metaboliche. Abbreviazioni: GPD, glucosio plasmatico a digiuno; IMC, indice di massa corporea; Ins. D, Insulina a digiuno; F, femmina; ft3, triiodotironina libera; ft4, tiroxina libera; HDL-col., colesterolo a lipoproteine ad alta densità; M, maschio; PAD, pressione arteriosa diastolica; PAS, pressione arteriosa sistolica; T-col., colesterolo totale; TG, trigliceridi; TSH, thyroid-stimulating hormone. **p*≤0.05, vs gli altri gruppi; °*p*<0.05, Obesi-T2DM vs Obesi-NGT; §*p*<0.05, Obesi-T2DM vs C, ottenuti con il test di Kruskal-Wallis. I dati sono espressi come media ± s.d.

I due gruppi di obesi presentavano simile IMC, mentre la pressione arteriosa sistolica e diastolica, i trigliceridi ed i livelli plasmatici del glucosio a digiuno e 2 h dopo OGTT risultavano più elevati nei pazienti Obesi-T2DM/IGT che negli Obesi-NGT. Il colesterolo HDL era significativamente più basso negli Obesi-T2DM rispetto agli Obesi-NGT. La concentrazione dell'insulina plasmatica a digiuno risultava più elevata nei diabetici rispetto ai soggetti di controllo che, come atteso, avevano un IMC, valori pressori arteriosi e profilo lipidico migliore rispetto ai due gruppi di obesi. I pazienti con T2DM eseguivano il seguente trattamento: 67 % con metformina e il 33 % con sulfoniluree; un terzo dei pazienti obesi, il 70 % dei quali aveva T2DM, erano in trattamento antipertensivo ACE-

(inibitori, calcio-antagonisti, β -bloccanti e diuretici).

Le concentrazioni plasmatiche di TSH e fT3 sono significativamente più alte in soggetti obesi con o senza T2DM (rispettivamente di $1.3 \mu\text{U ml}^{-1}$ con $p=0.017$ e di 0.7 pg ml^{-1} con $p=0.0015$) rispetto ai soggetti di controllo, mentre le concentrazioni di fT4 sono significativamente più basse (di 2.05 ng ml^{-1} con $p=0.02$) indipendentemente dalla presenza del diabete. Da un'analisi di regressione multipla è emersa una correlazione positiva tra il TSH plasmatico ed IMC ($sd.r=0.32, p=0.001$) dopo aver corretto per sesso, età e glucosio plasmatico a digiuno.

L'espressione genica delle deiodinasi (Tab.5) nel tessuto adiposo viscerale non subisce variazioni significative nell'ambito dell'intero set di dati. Tuttavia, è possibile individuare una trend crescente per la D1 e la D3 la cui espressione genica è più alta nei controlli rispetto agli obesi.

Parametro	Obesi-NGT	Obesi-IGT/T2DM	Controlli	p-value
<i>Soggetti (n)</i>	57	48	19	
<i>D1</i>	0.83 ± 0.90	0.88 ± 1.55	1.51 ± 2.10	n.s.
<i>D2</i>	0.71 ± 0.69	0.66 ± 0.84	0.89 ± 0.73	n.s.
<i>D3</i>	1.19 ± 1.17	1.75 ± 2.62	2.10 ± 2.24	n.s.

Tab.5 Espressione genica delle deiodinasi D1, D2 e D3 nel tessuto adiposo viscerale. I dati riportati derivano dal rapporto tra gene target e gene housekeeping (HPRT, Hypoxanthine-guanine Phospho-Ribosyl-Transferase). Il p-value è stato ottenuto con il test di Kruskal-Wallis.

Per quanto riguarda il dosaggio tissutale degli ormoni tiroidei (Tab.6), non emergono variazioni significative all'interno dell'intero set di dati ma anche in questo caso è possibile individuare una tendenza all'aumento della concentrazione di entrambi gli analiti nel passare dagli obesi ai controlli. Pur se in maniera non significativa, il rapporto di conversione T3/T4 è maggiore negli obesi che nei controlli e, nell'ambito degli obesi, non cambia in associazione con il diabete.

Parametro	Obesi-NGT	Obesi-IGT/T2DM	Controlli	p-value
<i>Soggetti (n)</i>	26	14	4	
<i>T3 (pmol/g)</i>	0.11 ± 0.05	0.12 ± 0.05	0.16 ± 0.015	n.s.
<i>T4 (pmol/g)</i>	3.82 ± 2.7	4.31 ± 1.76	4.39 ± 4.22	n.s.
<i>T3/T4</i>	0.031 ± 0.012	0.03 ± 0.009	0.025 ± 0.01	n.s.

Tab.6 Dosaggio degli ormoni tiroidei T3 e T4 nel tessuto adiposo viscerale di un sottogruppo di partecipanti allo studio. Il rapporto T3/T4 esprime l'entità della conversione del pro-ormone T4 nella sua forma attiva T3 all'interno del tessuto. Il p-value è stato ottenuto con il test di Kruskal-Wallis.

È emersa infine una correlazione positiva tra il rapporto di conversione T3/T4 tissutale e

l'espressione genica sia della D1 ($p=0.01$) che della D2 ($p=0.009$): come ci si aspetterebbe, all'aumentare dell'espressione delle due deiodinasi ad azione attivante, aumenta la T3 prodotta a partire dalla T4 presente nel tessuto. Non c'è invece alcun tipo di correlazione tra l'espressione della D3, deiodinasi ad azione inattivante, e il rapporto di conversione T3/T4 tissutale (*Fig.26*).

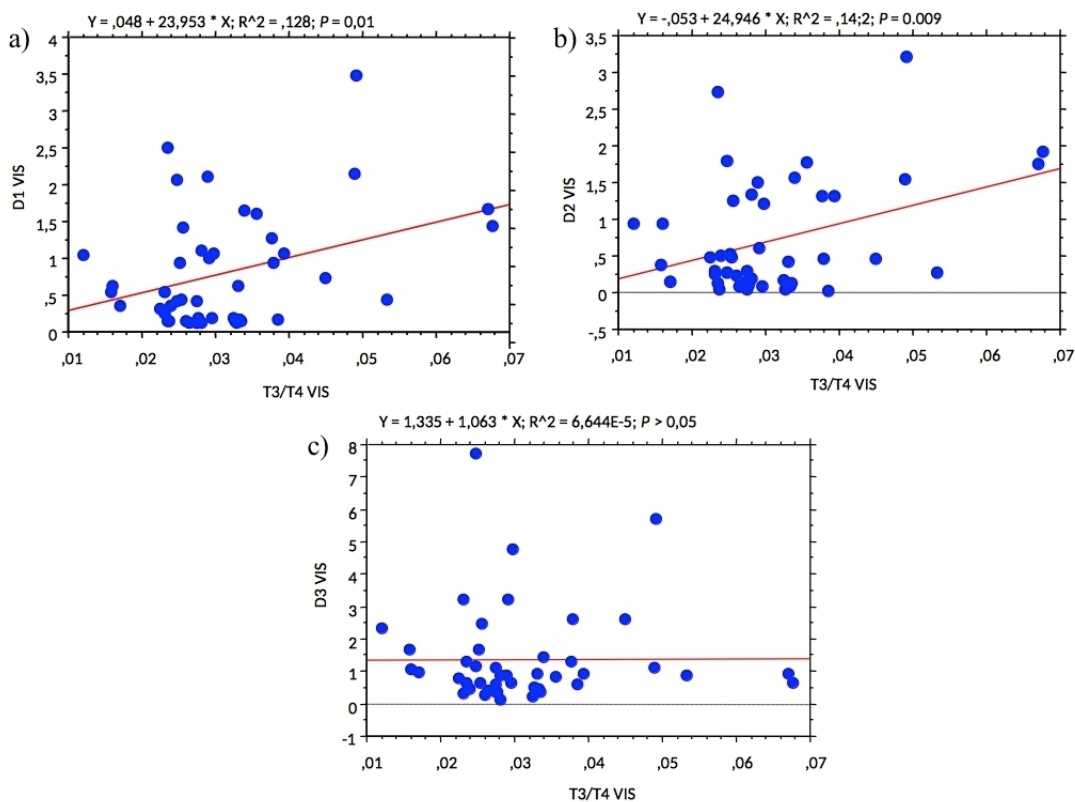


Fig.26 Correlazione tra il rapporto T3/T4 tissutale e l'espressione genica delle deiodinasi D1 (a), D2 (b) e D3 (c) nel tessuto adiposo viscerale del sottogruppo di partecipanti allo studio in cui sono stati dosati gli ormoni tiroidei tissutali (vedi *Tab.6*).

2. Studi sul ratto

L'influenza dei diversi trattamenti subiti dai ratti sulle concentrazioni del tessuto adiposo e plasmatiche di T3 e T4 è schematizzata nella *Fig.27*. Nella *Fig.28* è rappresentato l'effetto dei vari trattamenti sui rapporti di conversione T3/T4 tissutali.

In condizioni di eutiroidismo (nei controlli), è presente una differenza di concentrazione di T3 e T4 tra tessuto adiposo sottocutaneo e viscerale, con un relativo incremento nel sottocutaneo rispetto al distretto viscerale.

L'azione tireoinibente del PTU inibisce la produzione tiroidea di T3 e T4 inducendo riduzione delle concentrazioni plasmatiche e, in parallelo, di quelle tissutali con una maggiore conversione da T4 a T3 nel tessuto viscerale rispetto al sottocutaneo.

La T3 somministrata per via esogena induce un aumento della concentrazione della T3 plasmatica e di conseguenza anche tissutale; il sistema di regolazione a feedback negativo fa sì che venga inibita

parzialmente la produzione tiroidea di T4. Sia la bassa che l'alta dose di T3 inducono maggiori concentrazioni nel sottocute rispetto al viscerale per quanto riguarda la T3 e la T4. Anche in questo caso, nel tessuto adiposo viscerale il rapporto T3/T4 è maggiore rispetto al sottocute, consentendo di evidenziare che la concentrazione di T4 è maggiormente ridotta nel viscerale.

Infine, la somministrazione di elevati dosaggi di T4 (*Tirosint*) finalizzata ad indurre ipertiroidismo fa sì che la T3 e la T4 plasmatiche siano maggiori rispetto ai controlli e, di conseguenza, a livello tissutale sia maggiore la concentrazione di T4 e di T3 che ne deriva. Anche qui la concentrazione sia di T3 che di T4 è significativamente più alta nel tessuto adiposo sottocutaneo rispetto al tessuto adiposo viscerale ($p < 0.0001$ e $p < 0.04$ rispettivamente).

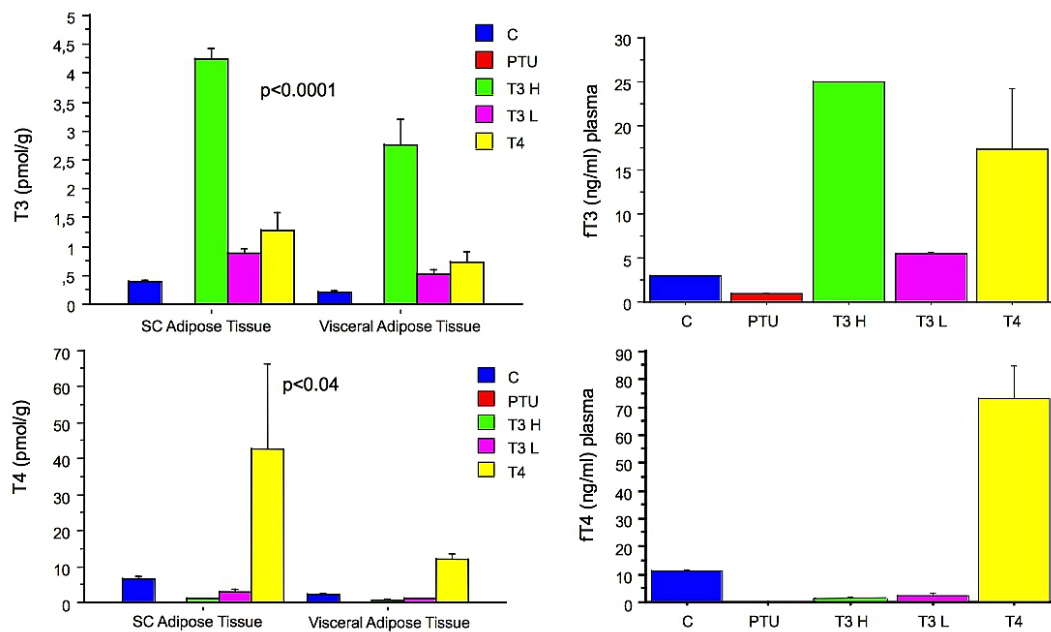


Fig.27 Concentrazioni tissutali (tessuto adiposo sottocutaneo e viscerale) e plasmatiche di T3 e T4 nei ratti oggetto dello studio, in relazione al trattamento subito. C, controlli; PTU, *6-n-propil-2-tiouracile* allo 0.05 % somministrato con l'acqua da bere per 21 giorni consecutivi; T3 H, T3 L è la T3 somministrata alla dose di 45 $\mu\text{g}/\text{Kg}/\text{giorno}$ (alta) o di 6 $\mu\text{g}/\text{Kg}/\text{giorno}$ (bassa) a 24 h dall'evento ischemico e per ulteriori 2 giorni prima del sacrificio; T4, farmaco *Tirosint* somministrato alla dose di 250-300 $\mu\text{g}/\text{Kg}/\text{giorno}$ per 6 giorni consecutivi.

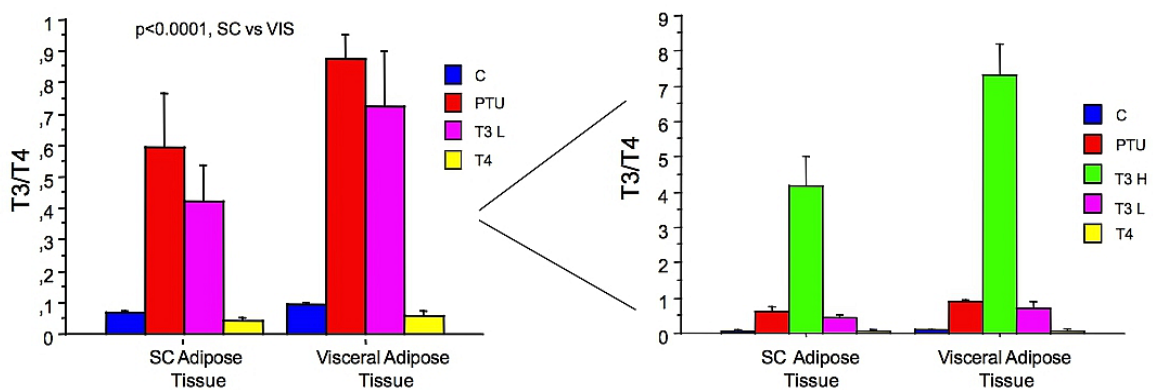


Fig.28 Rapporto di conversione T3/T4 nel tessuto adiposo sottocutaneo e viscerale dei ratti oggetto dello studio, in relazione al trattamento subito. Il grafico a sinistra è stato estrapolato da quello a destra omettendo i dati relativi al trattamento con T3 H (T3 ad alta dose) per permettere una migliore rappresentazione dei dati relativi agli altri trattamenti.

Infine, è stata osservata una correlazione positiva tra il rapporto fT3/fT4 plasmatico e quello T3/T4 tissutale, sia nel tessuto adiposo sottocutaneo ($p=0.0045$) che in quello viscerale ($p=0.014$) (Fig.29).

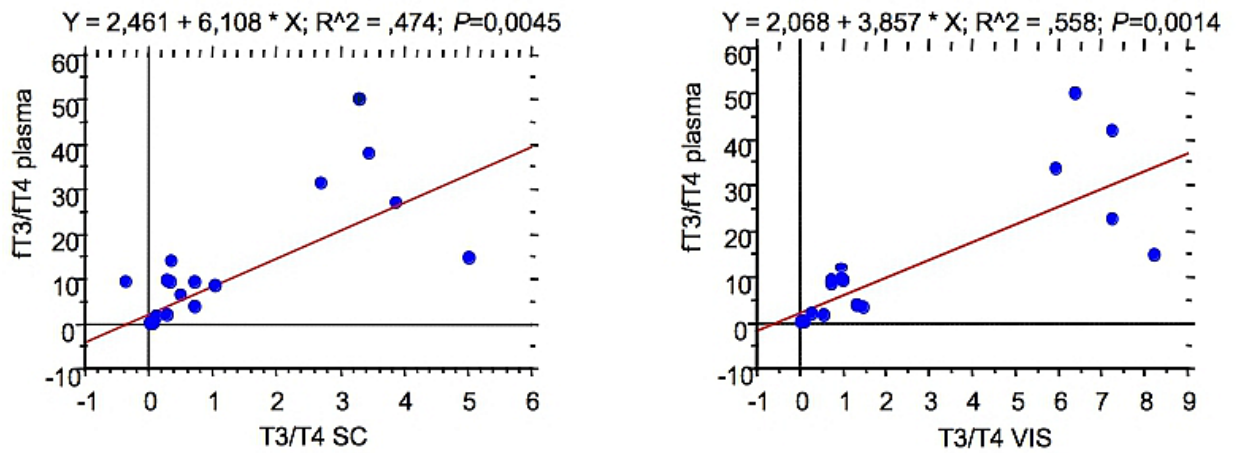


Fig.29 Correlazione tra il rapporto fT3/fT4 plasmatico e il rapporto T3/T4 tissutale rispettivamente nel tessuto adiposo sottocutaneo (sinistra) e viscerale (destra) dei ratti oggetto di studio.

Discussione

I dati relativi allo studio sull'uomo evidenziano, in soggetti eutiroidei, un incremento delle concentrazioni plasmatiche di fT3 in individui con obesità, con o senza diabete di tipo 2, rispetto ai soggetti sani di controllo, a fronte di concentrazioni plasmatiche di fT4 ridotte. Questi dati sono in linea con quanto pubblicato da Roef *e coll*²²⁸ i quali descrivono, in soggetti eutiroidei, un'associazione positiva tra concentrazioni sieriche di fT3 e profilo metabolico sfavorevole, e con i dati di Lambadiari *e coll*, che descrivono un'associazione positiva tra concentrazioni di fT3 ed insulino-resistenza²²⁹. D'altra parte, tali riscontri sembrano essere supportati da studi fisiopatologici descrittivi che la somministrazione di T3 in soggetti eutiroidei induce una riduzione della sensibilità insulinica²³⁰. Tuttavia, i meccanismi patogenetici di tali effetti al momento non sono ancora stati chiariti.

Nel presente studio inoltre si evidenziano concentrazioni plasmatiche di TSH significativamente più elevate (seppur nel range di normalità) nei soggetti obesi rispetto ai controlli. In accordo con i presenti risultati, Lee *e coll*²³¹ riportano un'associazione positiva tra concentrazioni plasmatiche del TSH ed il numero di componenti della sindrome metabolica. Inoltre, è nota un'associazione tra più basse concentrazioni di fT4^{232,233} e più elevate concentrazioni di TSH²³⁴ (seppure nel range di normalità) con la sindrome metabolica^{228,235,236}. Sulla base di queste osservazioni, è stato ipotizzato che l'ipertrofia del tessuto adiposo obeso modifichi il fenotipo cellulare dell'adipocita, causando una riduzione dell'espressione dei recettori nello stesso modo in cui agisce sui recettori dell'adiponectina³⁶ o sull'insulino-sensibilità²¹⁴. Come conseguenza della down regolazione nell'espressione dei recettori di T3 e TSH, le concentrazioni plasmatiche dei ligandi aumenterebbero per far fronte alla resistenza periferica agli ormoni tiroidei instauratasi. A conferma di ciò Nannipieri *e coll*²¹¹ hanno descritto che la perdita di peso dopo intervento di chirurgia bariatrica porta ad una riduzione di entrambi i livelli di TSH e fT3. La perdita di peso quindi ribalterebbe la condizione ormonale qui osservata perché ripristinerebbe la dimensione e la funzionalità degli adipociti maturi.

A nostra conoscenza non ci sono pubblicazioni che riportino le concentrazioni tissutali degli ormoni tiroidei nell'uomo. Nella popolazione studiata, il rapporto T3/T4, che riflette la conversione da T4 ad ormone attivo T3, nel plasma (fT3/fT4) è direttamente proporzionale al rapporto T3/T4 nel tessuto adiposo viscerale (T3/T4). Questi dati confermano il fatto che i dosaggi plasmatici di fT3 e di fT4 effettuati riflettono quanto accade nel tessuto adiposo viscerale.

Nonostante al momento non sia possibile esprimersi sull'attività funzionale di questi ormoni né sull'attività enzimatica delle deiodinasi, dai dati ottenuti emerge che l'espressione genica di questi enzimi nel tessuto adiposo viscerale non varia significativamente tra obesi e controlli, anche se sia D1 che D3 sono tendenzialmente più espresse nei controlli che negli obesi. In contrapposizione, in

un recente lavoro di Ortega *e coll*²³⁷, viene tuttavia descritta un' aumentata espressione della D1 nel tessuto adiposo viscerale e sottocutaneo di soggetti obesi, in parallelo con un' aumentata attività deiodinasi intratissutale. Al momento nessun altro lavoro descrive l' espressione o l' attività deiodinasi nell' uomo, mentre alcuni lavori estrapolano l' attività deiodinasi dal rapporto plasmatico fT3f/T4. Dall' Asta *e coll*²³⁸ infatti descrivono come il rapporto fT3/fT4 (un indice indiretto dell' attività deiodinasi) diminuisca al diminuire del IMC nel follow-up di pazienti obesi eutiroidei che hanno subito un intervento di bendaggio gastrico fino ad essere minore di quello dei soggetti di controllo e ipotizzano che ciò rifletta una diminuzione dell' attività di D1 e D2 come avviene durante il digiuno o una dieta ipocalorica. D' altra parte, questa ipotesi è in accordo con quella di De Pergola *e coll*²³⁹ i quali suggeriscono che l' obesità centrale sia caratterizzata da una maggiore attività deiodinasi. sempre basandosi sul rapporto fT3/fT4. Nel presente progetto di tesi si osserva una correlazione positiva tra il rapporto di conversione T3/T4 tissutale (maggiore negli obesi che nei controlli) e l' espressione genica delle deiodinasi attivanti, D1 e D2, il che potrebbe coincidere con un aumento della loro attività. Sono in corso ulteriori studi sull' espressione genica e sull' attività deiodinasi in un sottogruppo di pazienti che sono stati riesaminati ad un anno dalla chirurgia bariatrica.

Dati sul ratto hanno descritto un incremento della D2 in presenza di ipotiroidismo^{240,241} cui consegue un' aumentata conversione da T4 a T3 compensatoria. Inoltre, è stato descritto che l' attività della D2 non viene inibita dal PTU²⁴¹. Tuttavia, la maggior parte dei lavori hanno riportato l' attività deiodinasi nel tessuto adiposo bruno, pochi hanno descritto l' attività deiodinasi e la sua espressione genica nel tessuto adiposo bianco, ma la misura intratissutale degli ormoni tiroidei nel tessuto adiposo bianco è stata descritta soltanto in un recente lavoro²⁴⁰. In tale lavoro viene descritto un raddoppio delle concentrazioni intratissutali di T4 (dosato tramite radioimmunoassay) rispetto all' incremento osservato in circolo dopo trattamento sostitutivo con T4 in ratti tiroidectomizzati. Poiché a nostra conoscenza non ci sono studi che descrivano la risposta del tessuto sottocutaneo e viscerale a variazioni di funzionalità tiroidea, nel presente studio abbiamo valutato la risposta del tessuto adiposo sottocutaneo e viscerale in diverse condizioni di funzione tiroidea indotta dalla somministrazione di T3 ad alte e bassi dosi, T4 o PTU.

Nel presente studio è stata rilevata una differenza tra concentrazione di T3 e T4 tra tessuto adiposo sottocutaneo e viscerale, con un relativo incremento nel sottocutaneo rispetto al distretto viscerale in condizioni di eutiroidismo. Tale dato si mantiene anche dopo diversi trattamenti farmacologici volti ad indurre ipo od ipertiroidismo. Nonostante ciò, la conversione intratissutale da T4 a T3 risulta significativamente superiore nel tessuto adiposo viscerale rispetto al sottocute.

L'azione tireoinibente del PTU, come atteso, inibisce la produzione tiroidea di T3 e T4 inducendo riduzione delle concentrazioni plasmatiche. In parallelo abbiamo osservato una riduzione delle concentrazioni tissutali di T3 e di T4, con una maggiore conversione da T4 a T3 nel tessuto viscerale rispetto al sottocutaneo, evidenziando in ogni caso una mancanza dell'effetto del PTU sulle deiodinasi attivanti l'ormone, come descritto da Calvo *e coll*²⁴⁰ e da St. Germain *e coll*²⁴¹.

La T3, somministrata per via esogena e volta ad indurre uno stato di ipertiroidismo marcato o ipertiroidismo modesto, induce quindi un aumento della concentrazione della T3 plasmatica e di conseguenza anche tissutale; il sistema di regolazione a feedback negativo fa sì che venga inibita parzialmente la produzione tiroidea di T4. Anche in questo caso sia la bassa che l'alta dose di T3 inducono maggiori concentrazioni nel sottocute rispetto al viscerale per quanto riguarda la T3 e la T4. Tuttavia, anche in questo caso nel tessuto adiposo viscerale il rapporto T3/T4 è maggiore rispetto al sottocute, consentendo di evidenziare che la concentrazione di T4 è maggiormente ridotta nel viscerale.

Inoltre, la somministrazione di elevati dosaggi di T4 (*Tirosint*) finalizzata ad indurre ipertiroidismo fa sì che la T3 e la T4 plasmatiche siano maggiori rispetto ai controlli e, di conseguenza, a livello tissutale sia maggiore la concentrazione di T4 e di T3 che ne deriva. Anche qui, è interessante notare che la concentrazione sia di T3 che di T4 è significativamente più alta nel tessuto adiposo sottocutaneo rispetto al tessuto adiposo viscerale.

Infine, è stata osservata una correlazione positiva tra il rapporto FT3/FT4 plasmatico e quello T3/T4 tissutale, sia nel tessuto adiposo sottocutaneo che in quello viscerale, indipendentemente dai tipi di trattamento.

Il fatto che, in condizioni di eutiroidismo, il tessuto adiposo viscerale risulti avere un rapporto di conversione T3/T4 significativamente maggiore di quello del sottocutaneo, e che tale dato si mantenga anche dopo diversi trattamenti farmacologici volti ad indurre ipo od ipertiroidismo, suggerisce che il deposito viscerale sia metabolicamente più attivo del sottocutaneo. Di conseguenza, si può ipotizzare che l'attività deiodinasi di D1 e D2 sia maggiore nel primo deposito che nel secondo. Pertanto, in futuro avremo come scopo di misurare sia l'attività enzimatica che, parallelamente, l'espressione tissutale delle deiodinasi.

Per spiegare invece il fatto che nel tessuto adiposo sottocutaneo ci sia una concentrazione più elevata di T3 e T4 rispetto al viscerale sono necessari studi fisiopatologici volti a capire meglio quale sia l'attività metabolica dei singoli depositi adiposi analizzati. Nel nostro caso, il tessuto adiposo sottocutaneo deriva da tessuto adiposo lombare, che potrebbe far parte di tessuto adiposo "beige", tessuto adiposo con caratteristiche morfologiche e funzionali intermedie tra "bianco" e "bruno", che in condizioni di variazioni delle temperature esterne potrebbe sviluppare le

caratteristiche del tessuto “bruno” in termini di mantenimento della temperatura corporea, incrementando l’attività termogenica mitocondriale.

La messa a punto del metodo di estrazione di tipo liquido-liquido a partire dal lavoro di Geens *e coll*²¹⁹ si è rivelata efficace nel separare gli analiti dalla componente lipidica del campione. L'omogenizzazione del tessuto adiposo in una soluzione contenente HCl 0.1 M e Acetonitrile ha favorito lo spostamento delle sostanze contenenti il gruppo amminico, come T3 e T4, verso la fase estraente. Inoltre, il metodo originale descritto da Saba *e coll*²⁴² è stato migliorato con l'aggiunta di uno step di derivatizzazione del campione estratto secondo la procedura proposta da Chace *e coll*²⁴³ ed è stato recentemente pubblicato²²¹. Ciò ha permesso di aumentare di un ordine di grandezza la sensibilità analitica del metodo di analisi mediante spettrometria di massa tandem (HPLC-MS-MS) e, di conseguenza, di diminuire la quantità di tessuto di partenza necessaria. Nonostante l'accuratezza del metodo non sia eccellente (75 %), può considerarsi soddisfacente rispetto a quella riportata in un lavoro recente²⁴⁴ (40-60 %).

La quantificazione dell'espressione genica mediante real-time PCR è stata già ampiamente messa a punto da Nannipieri *e coll* in studi precedenti sul tessuto adiposo^{36,74,211}. Nell'ambito di questa tesi sono state trovate le condizioni di reazione ottimali per l'amplificazione dei geni di interesse e i dati ottenuti confermano l'affidabilità e l'accuratezza già note per questo metodo.

In un'ottica futura, è sicuramente necessario aggiungere la quantificazione dell'espressione genica delle deiodinasi sul tessuto adiposo sottocutaneo a quella sul tessuto adiposo viscerale e integrare i dati ottenuti con quelli relativi ad un gruppo di pazienti riesaminati ad un anno dalla chirurgia bariatrica. Per rafforzare i dati ottenuti, sarebbe interessante dosare anche gli ormoni tiroidei tissutali e l'attività deiodinasi locale in entrambi i depositi adiposi. Per studiare l'attività tiroidea in situazioni di ipotiroidismo e ipertiroidismo sarebbe ottimo estendere al ratto la quantificazione dell'espressione genica.

Riferimenti bibliografici

1. Trends in intake of energy and macronutrients--United States, 1971-2000. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep.* 2004;53(4):80-2. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14762332>.
2. EarthTrends: Nutrition: Calorie supply per capita - World Resources Institute.
3. Global Prevalence of Adult Obesity - International Obesity Taskforce.
4. WHO | Obesity. Available at: http://www.who.int/gho/ncd/risk_factors/obesity_text/en/.
5. Olshansky SJ, Passaro DJ, Hershow RC, et al. A potential decline in life expectancy in the United States in the 21st century. *N Engl J Med.* 2005;352(11):1138-45. doi:10.1056/NEJMSr043743.
6. Poirier P, Giles TD, Bray GA, et al. Obesity and cardiovascular disease: pathophysiology, evaluation, and effect of weight loss. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2006;26(5):968-76. doi:10.1161/01.ATV.0000216787.85457.f3.
7. Poirier P, Cornier M-A, Mazzone T, et al. Bariatric surgery and cardiovascular risk factors: a scientific statement from the American Heart Association. *Circulation.* 2011;123(15):1683-701. doi:10.1161/CIR.0b013e3182149099.
8. Poirier P, Alpert MA, Fleisher LA, et al. Cardiovascular evaluation and management of severely obese patients undergoing surgery: a science advisory from the American Heart Association. *Circulation.* 2009;120(1):86-95. doi:10.1161/CIRCULATIONAHA.109.192575.
9. Bastien M, Poirier P, Lemieux I, Després J-P. Overview of epidemiology and contribution of obesity to cardiovascular disease. *Prog Cardiovasc Dis.* 56(4):369-81. doi:10.1016/j.pcad.2013.10.016.
10. Poirier P, Giles TD, Bray GA, et al. Obesity and cardiovascular disease: pathophysiology, evaluation, and effect of weight loss: an update of the 1997 American Heart Association Scientific Statement on Obesity and Heart Disease from the Obesity Committee of the Council on Nutrition, Physical. *Circulation.* 2006;113(6):898-918. doi:10.1161/CIRCULATIONAHA.106.171016.
11. Wilkins K, Campbell NRC, Joffres MR, et al. Blood pressure in Canadian adults. *Heal reports.* 2010;21(1):37-46. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20426225>.
12. Wormser D, Kaptoge S, Di Angelantonio E, et al. Separate and combined associations of body-mass index and abdominal adiposity with cardiovascular disease: collaborative analysis of 58 prospective studies. *Lancet.* 2011;377(9771):1085-95. doi:10.1016/S0140-6736(11)60105-0.
13. Rossi R, Iaccarino D, Nuzzo A, et al. Influence of body mass index on extent of coronary atherosclerosis and cardiac events in a cohort of patients at risk of coronary artery disease. *Nutr Metab Cardiovasc Dis.* 2011;21(2):86-93. doi:10.1016/j.numecd.2009.09.001.
14. Mathieu P, Poirier P, Pibarot P, Lemieux I, Després J-P. Visceral obesity: the link among inflammation, hypertension, and cardiovascular disease. *Hypertension.* 2009;53(4):577-84. doi:10.1161/HYPERTENSIONAHA.108.110320.
15. Rocha VZ, Libby P. Obesity, inflammation, and atherosclerosis. *Nat Rev Cardiol.* 2009;6(6):399-409. doi:10.1038/nrcardio.2009.55.
16. Visser M, Bouter LM, McQuillan GM, Wener MH, Harris TB. Elevated C-reactive protein levels in overweight and obese adults. *JAMA.* 1999;282(22):2131-5. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10591334>.
17. Mathieu P, Lemieux I, Després J-P. Obesity, inflammation, and cardiovascular risk. *Clin Pharmacol Ther.* 2010;87(4):407-16. doi:10.1038/clpt.2009.311.
18. Loscalzo, Joseph; Fauci, Anthony S.; Braunwald, Eugene; Dennis L. Kasper; Hauser, Stephen L; Longo DL. *Harrison's principles of internal medicine.* McGraw-Hill Medical; 2008.
19. Sacks G, Swinburn B, Lawrence M. Obesity Policy Action framework and analysis grids for a comprehensive policy approach to reducing obesity. *Obes Rev.* 2009;10(1):76-86. doi:10.1111/j.1467-789X.2008.00524.x.

20. Brennan Ramirez LK, Hoehner CM, Brownson RC, et al. Indicators of activity-friendly communities: an evidence-based consensus process. *Am J Prev Med.* 2006;31(6):515–24. doi:10.1016/j.amepre.2006.07.026.
21. Puhl R, Brownell KD. Bias, discrimination, and obesity. *Obes Res.* 2001;9(12):788–805. doi:10.1038/oby.2001.108.
22. Neovius K, Johansson K, Kark M, Neovius M. Obesity status and sick leave: a systematic review. *Obes Rev.* 2009;10(1):17–27. doi:10.1111/j.1467-789X.2008.00521.x.
23. Cummings L. The diet business: Banking on failure. *BBC News.* 2003. Available at: <http://news.bbc.co.uk/2/hi/business/2725943.stm>.
24. DiCarlo L. Why Airlines Can't Cut The Fat. 2002.
25. Van Baal PHM, Polder JJ, de Wit GA, et al. Lifetime medical costs of obesity: prevention no cure for increasing health expenditure. *PLoS Med.* 2008;5(2):e29. doi:10.1371/journal.pmed.0050029.
26. Vague J. Sexual differentiation, a factor affecting the forms of obesity. *Press Med.* 1947;55:339.
27. Balkau B, Deanfield JE, Després J-P, et al. International Day for the Evaluation of Abdominal Obesity (IDEA): a study of waist circumference, cardiovascular disease, and diabetes mellitus in 168,000 primary care patients in 63 countries. *Circulation.* 2007;116(17):1942–51. doi:10.1161/CIRCULATIONAHA.106.676379.
28. Gierach M, Gierach J, Junik R. Insulin resistance and thyroid disorders. *Endokrynol Pol.* 2014;65(1):70–6. doi:10.5603/EP.2014.0010.
29. Gastaldelli A, Natali A, Vettor R, Corradini SG. Insulin resistance, adipose depots and gut: interactions and pathological implications. *Dig Liver Dis.* 2010;42(5):310–9. doi:10.1016/j.dld.2010.01.013.
30. Després J-P, Lemieux I. Abdominal obesity and metabolic syndrome. *Nature.* 2006;444(7121):881–7. doi:10.1038/nature05488.
31. Unger RH. The physiology of cellular liporegulation. *Annu Rev Physiol.* 2003;65:333–47. doi:10.1146/annurev.physiol.65.092101.142622.
32. Yki-Järvinen H. Ectopic fat accumulation: an important cause of insulin resistance in humans. *J R Soc Med.* 2002;95 Suppl 4:39–45. Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=1308944&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>.
33. Vettor R, Milan G, Rossato M, Federspil G. Review article: adipocytokines and insulin resistance. *Aliment Pharmacol Ther.* 2005;22 Suppl 2:3–10. doi:10.1111/j.1365-2036.2005.02587.x.
34. Fu Y, Luo N, Klein RL, Garvey WT. Adiponectin promotes adipocyte differentiation, insulin sensitivity, and lipid accumulation. *J Lipid Res.* 2005;46(7):1369–79. doi:10.1194/jlr.M400373-JLR200.
35. Yamauchi T, Kamon J, Minokoshi Y, et al. Adiponectin stimulates glucose utilization and fatty-acid oxidation by activating AMP-activated protein kinase. *Nat Med.* 2002;8(11):1288–95. doi:10.1038/nm788.
36. Nannipieri M, Bonotti A, Anselmino M, et al. Pattern of expression of adiponectin receptors in human adipose tissue depots and its relation to the metabolic state. *Int J Obes (Lond).* 2007;31(12):1843–8. doi:10.1038/sj.ijo.0803676.
37. Randle PJ. Regulatory interactions between lipids and carbohydrates: the glucose fatty acid cycle after 35 years. *Diabetes Metab Rev.* 1998;14(4):263–83. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10095997>.
38. Lesser GT, Deutsch S. Measurement of adipose tissue blood flow and perfusion in man by uptake of 85Kr. *J Appl Physiol.* 1967;23(5):621–30. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6061376>.
39. Rutkowski JM, Davis KE, Scherer PE. Mechanisms of obesity and related pathologies: the macro- and microcirculation of adipose tissue. *FEBS J.* 2009;276(20):5738–46. doi:10.1111/j.1742-4658.2009.07303.x.
40. Van de Voorde J, Pauwels B, Boydens C, Decaluwé K. Adipocytokines in relation to cardiovascular disease. *Metabolism.* 2013;62(11):1513–21. doi:10.1016/j.metabol.2013.06.004.
41. Pasarica M, Sereda OR, Redman LM, et al. Reduced adipose tissue oxygenation in human obesity: evidence for rarefaction, macrophage chemotaxis, and inflammation without an angiogenic response. *Diabetes.* 2009;58(3):718–25. doi:10.2337/db08-1098.
42. Trayhurn P, Wang B, Wood IS. Hypoxia in adipose tissue: a basis for the dysregulation of tissue function in obesity? *Br J Nutr.*

- 2008;100(2):227–35. doi:10.1017/S0007114508971282.
43. Gordon S. Macrophage heterogeneity and tissue lipids. *J Clin Invest.* 2007;117(1):89–93. doi:10.1172/JCI30992.
44. Lumeng CN, Bodzin JL, Saltiel AR. Obesity induces a phenotypic switch in adipose tissue macrophage polarization. *J Clin Invest.* 2007;117(1):175–84. doi:10.1172/JCI29881.
45. Fontana L, Eagon JC, Trujillo ME, Scherer PE, Klein S. Visceral fat adipokine secretion is associated with systemic inflammation in obese humans. *Diabetes.* 2007;56(4):1010–3. doi:10.2337/db06-1656.
46. Després J-P. Is visceral obesity the cause of the metabolic syndrome? *Ann Med.* 2006;38(1):52–63. doi:10.1080/07853890500383895.
47. Lewis GF, Carpentier A, Adeli K, Giacca A. Disordered fat storage and mobilization in the pathogenesis of insulin resistance and type 2 diabetes. *Endocr Rev.* 2002;23(2):201–29. doi:10.1210/edrv.23.2.0461.
48. Fabbrini E, Magkos F, Mohammed BS, et al. Intrahepatic fat, not visceral fat, is linked with metabolic complications of obesity. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2009;106(36):15430–5. doi:10.1073/pnas.0904944106.
49. Nielsen S, Guo Z, Johnson CM, Hensrud DD, Jensen MD. Splanchnic lipolysis in human obesity. *J Clin Invest.* 2004;113(11):1582–8. doi:10.1172/JCI21047.
50. Handelsman Y. A doctor’s diagnosis: prediabetes. *Power Prev.* 2009;1(2).
51. Prevalence of overweight and obesity among adults with diagnosed diabetes--United States, 1988-1994 and 1999-2002. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep.* 2004;53(45):1066–8. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15549021>.
52. Walley AJ, Blakemore AIF, Froguel P. Genetics of obesity and the prediction of risk for health. *Hum Mol Genet.* 2006;15 Spec No:R124–30. doi:10.1093/hmg/ddl215.
53. Rosenbloom A, Silverstein JH. *Type 2 Diabetes in Children and Adolescents: A Clinician’s Guide to Diagnosis, Epidemiology, Pathogenesis, Prevention, and Treatment.* American Diabetes Association, U.S.; 2003:1.
54. Wild S, Roglic G, Green A, Sicree R, King H. Global prevalence of diabetes: estimates for the year 2000 and projections for 2030. *Diabetes Care.* 2004;27(5):1047–53. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15111519>.
55. “CDC’s Diabetes Program-News and Information-Press Releases-October 26 2000.” 2000. Available at: <http://www.cdc.gov/Diabetes/news/docs/010126.htm>.
56. Diabetes Prevention Program Study Documents Web Site. Available at: <https://dppos.bsc.gwu.edu/web/dppos/home>.
57. Knowler WC, Barrett-Connor E, Fowler SE, et al. Reduction in the incidence of type 2 diabetes with lifestyle intervention or metformin. *N Engl J Med.* 2002;346(6):393–403. doi:10.1056/NEJMoa012512.
58. Rubino F, Gagner M. Potential of surgery for curing type 2 diabetes mellitus. *Ann Surg.* 2002;236(5):554–9. doi:10.1097/01.SLA.0000032951.37471.80.
59. Ibrahim MA, Kelleni M, Geddayy A. Nonalcoholic fatty liver disease: current and potential therapies. *Life Sci.* 2013;92(2):114–8. doi:10.1016/j.lfs.2012.11.004.
60. Matteoni CA, Younossi ZM, Gramlich T, Boparai N, Liu YC, McCullough AJ. Nonalcoholic fatty liver disease: a spectrum of clinical and pathological severity. *Gastroenterology.* 1999;116(6):1413–9. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10348825>.
61. McCullough AJ. Update on nonalcoholic fatty liver disease. *J Clin Gastroenterol.* 2002;34(3):255–62. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11873108>.
62. Bradbury MW, Berk PD. Lipid metabolism in hepatic steatosis. *Clin Liver Dis.* 2004;8(3):639–71, xi. doi:10.1016/j.cld.2004.04.005.
63. Browning JD, Horton JD. Molecular mediators of hepatic steatosis and liver injury. *J Clin Invest.* 2004;114(2):147–52. doi:10.1172/JCI22422.
64. Postic C, Girard J. The role of the lipogenic pathway in the development of hepatic steatosis. *Diabetes Metab.* 2008;34(6 Pt 2):643–8. doi:10.1016/S1262-3636(08)74599-3.

65. Pessayre D. Role of mitochondria in non-alcoholic fatty liver disease. *J Gastroenterol Hepatol.* 2007;22 Suppl 1:S20–7. doi:10.1111/j.1440-1746.2006.04640.x.
66. Serviddio G, Sastre J, Bellanti F, Viña J, Vendemiale G, Altomare E. Mitochondrial involvement in non-alcoholic steatohepatitis. *Mol Aspects Med.* 29(1-2):22–35. doi:10.1016/j.mam.2007.09.014.
67. Patti ME, Butte AJ, Crunkhorn S, et al. Coordinated reduction of genes of oxidative metabolism in humans with insulin resistance and diabetes: Potential role of PGC1 and NRF1. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2003;100(14):8466–71. doi:10.1073/pnas.1032913100.
68. Sparks LM, Xie H, Koza RA, et al. A high-fat diet coordinately downregulates genes required for mitochondrial oxidative phosphorylation in skeletal muscle. *Diabetes.* 2005;54(7):1926–33. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15983191>.
69. Coppola M, Glinni D, Moreno M, Cioffi F, Silvestri E, Goglia F. Thyroid hormone analogues and derivatives: Actions in fatty liver. *World J Hepatol.* 2014;6(3):114–29. doi:10.4254/wjh.v6.i3.114.
70. McCullough AJ. Pathophysiology of nonalcoholic steatohepatitis. *J Clin Gastroenterol.* 2006;40 Suppl 1:S17–29. doi:DOI:10.1097/01.mcg.0000168645.86658.22.
71. Aronis A, Madar Z, Tirosh O. Mechanism underlying oxidative stress-mediated lipotoxicity: exposure of J774.2 macrophages to triacylglycerols facilitates mitochondrial reactive oxygen species production and cellular necrosis. *Free Radic Biol Med.* 2005;38(9):1221–30. doi:10.1016/j.freeradbiomed.2005.01.015.
72. Sies H, Stahl W, Sevanian A. Nutritional, dietary and postprandial oxidative stress. *J Nutr.* 2005;135(5):969–72. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15867266>.
73. Videla LA, Rodrigo R, Araya J, Poniachik J. Oxidative stress and depletion of hepatic long-chain polyunsaturated fatty acids may contribute to nonalcoholic fatty liver disease. *Free Radic Biol Med.* 2004;37(9):1499–507. doi:10.1016/j.freeradbiomed.2004.06.033.
74. Nannipieri M, Cecchetti F, Anselmino M, et al. Pattern of expression of adiponectin receptors in human liver and its relation to nonalcoholic steatohepatitis. *Obes Surg.* 2009;19(4):467–74. doi:10.1007/s11695-008-9701-x.
75. Gastaldelli A, Cusi K, Pettiti M, et al. Relationship between hepatic/visceral fat and hepatic insulin resistance in nondiabetic and type 2 diabetic subjects. *Gastroenterology.* 2007;133(2):496–506. doi:10.1053/j.gastro.2007.04.068.
76. Van Itallie TB. “Morbid” obesity: a hazardous disorder that resists conservative treatment. *Am J Clin Nutr.* 1980;33(2 Suppl):358–63. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7355807>.
77. Deitel M, Shahi B. Morbid obesity: selection of patients for surgery. *J Am Coll Nutr.* 1992;11(4):457–62. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1506608>.
78. Carlsson LMS, Peltonen M, Ahlin S, et al. Bariatric surgery and prevention of type 2 diabetes in Swedish obese subjects. *N Engl J Med.* 2012;367(8):695–704. doi:10.1056/NEJMoa1112082.
79. Deitel M. The Development of General Surgical Operations and Weight-loss Operations. *Obes Surg.* 1996;6(3):206–213. doi:10.1381/096089296765556773.
80. Mason EE, Tang S, Renquist KE, et al. A decade of change in obesity surgery. National Bariatric Surgery Registry (NBSR) Contributors. *Obes Surg.* 1997;7(3):189–97. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9730547>.
81. Buchwald H, Estok R, Fahrbach K, et al. Weight and type 2 diabetes after bariatric surgery: systematic review and meta-analysis. *Am J Med.* 2009;122(3):248–256.e5. doi:10.1016/j.amjmed.2008.09.041.
82. Carelli AM, Youn HA, Kurian MS, Ren CJ, Fielding GA. Safety of the laparoscopic adjustable gastric band: 7-year data from a U.S. center of excellence. *Surg Endosc.* 2010;24(8):1819–23. doi:10.1007/s00464-009-0858-8.
83. Baltasar A. Hand-sewn laparoscopic duodenal switch. *Surg Obes Relat Dis.* 3(1):94–6. doi:10.1016/j.soard.2006.10.014.
84. Hess DS, Hess DW, Oakley RS. The biliopancreatic diversion with the duodenal switch: results beyond 10 years. *Obes Surg.* 2005;15(3):408–16. doi:10.1381/0960892053576695.
85. Marceau P, Biron S, Hould F-S, et al. Duodenal switch improved standard biliopancreatic diversion: a retrospective study. *Surg Obes Relat Dis.* 5(1):43–7. doi:10.1016/j.soard.2008.03.244.

86. Deitel M, Gagner M, Erickson AL, Crosby RD. Third International Summit: Current status of sleeve gastrectomy. *Surg Obes Relat Dis.* 2011;7(6):749–59. doi:10.1016/j.soard.2011.07.017.
87. Roslin MS, Dudiy Y, Weiskopf J, Damani T, Shah P. Comparison between RYGB, DS, and VSG effect on glucose homeostasis. *Obes Surg.* 2012;22(8):1281–6. doi:10.1007/s11695-012-0686-0.
88. Scott WR, Batterham RL. Roux-en-Y gastric bypass and laparoscopic sleeve gastrectomy: understanding weight loss and improvements in type 2 diabetes after bariatric surgery. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol.* 2011;301(1):R15–27. doi:10.1152/ajpregu.00038.2011.
89. Vidal J, Ibarzabal A, Romero F, et al. Type 2 diabetes mellitus and the metabolic syndrome following sleeve gastrectomy in severely obese subjects. *Obes Surg.* 2008;18(9):1077–82. doi:10.1007/s11695-008-9547-2.
90. Bult MJF, van Dalen T, Muller AF. Surgical treatment of obesity. *Eur J Endocrinol.* 2008;158(2):135–45. doi:10.1530/EJE-07-0145.
91. Deitel M. A brief history of the surgery for obesity to the present, with an overview of nutritional implications. *J Am Coll Nutr.* 2013;32(2):136–42. doi:10.1080/07315724.2013.797854.
92. Inge TH, Miyano G, Bean J, et al. Reversal of type 2 diabetes mellitus and improvements in cardiovascular risk factors after surgical weight loss in adolescents. *Pediatrics.* 2009;123(1):214–22. doi:10.1542/peds.2008-0522.
93. Dixon JB, O'Brien PE, Playfair J, et al. Adjustable gastric banding and conventional therapy for type 2 diabetes: a randomized controlled trial. *JAMA.* 2008;299(3):316–23. doi:10.1001/jama.299.3.316.
94. Laferrère B, Teixeira J, McGinty J, et al. Effect of weight loss by gastric bypass surgery versus hypocaloric diet on glucose and incretin levels in patients with type 2 diabetes. *J Clin Endocrinol Metab.* 2008;93(7):2479–85. doi:10.1210/jc.2007-2851.
95. Parikh M, Ayoung-Chee P, Romanos E, et al. Comparison of rates of resolution of diabetes mellitus after gastric banding, gastric bypass, and biliopancreatic diversion. *J Am Coll Surg.* 2007;205(5):631–5. doi:10.1016/j.jamcollsurg.2007.05.033.
96. Nannipieri M, Baldi S, Mari a, et al. Roux-en-Y Gastric Bypass and Sleeve Gastrectomy: Mechanisms of Diabetes Remission and Role of Gut Hormones. *J Clin Endocrinol Metab.* 2013;98(11):4391–9. doi:10.1210/jc.2013-2538.
97. Thaler JP, Cummings DE. Minireview: Hormonal and metabolic mechanisms of diabetes remission after gastrointestinal surgery. *Endocrinology.* 2009;150(6):2518–25. doi:10.1210/en.2009-0367.
98. Fruhbeck G. Significance of ghrelin, leptin, adipokines, and changes after weight-loss operations. In: *Handbook of Obesity Surgery.* Toronto: FD-Communications; 2010:288–297.
99. Tchkonina T, Lenburg M, Thomou T, et al. Identification of depot-specific human fat cell progenitors through distinct expression profiles and developmental gene patterns. *Am J Physiol Endocrinol Metab.* 2007;292(1):E298–307. doi:10.1152/ajpendo.00202.2006.
100. Smorlesi A, Frontini A, Giordano A, Cinti S. The adipose organ: white-brown adipocyte plasticity and metabolic inflammation. *Obes Rev.* 2012;13 Suppl 2:83–96. doi:10.1111/j.1467-789X.2012.01039.x.
101. Himms-Hagen J. Brown adipose tissue and cold-acclimation. In: Trayhurn P, Nicholls A, eds. *Brown Adipose Tissue.* London: Edward Arnold; 1986:214.
102. Cannon B, Nedergaard J. Brown adipose tissue: function and physiological significance. *Physiol Rev.* 2004;84(1):277–359. doi:10.1152/physrev.00015.2003.
103. Ricquier D. Fundamental mechanisms of thermogenesis. *C R Biol.* 2006;329(8):578–86; discussion 653–5. doi:10.1016/j.crv.2005.10.010.
104. Rosen ED, Spiegelman BM. Adipocytes as regulators of energy balance and glucose homeostasis. *Nature.* 2006;444(7121):847–53. doi:10.1038/nature05483.
105. Murano I, Barbatelli G, Giordano A, Cinti S. Noradrenergic parenchymal nerve fiber branching after cold acclimatisation correlates with brown adipocyte density in mouse adipose organ. *J Anat.* 2009;214(1):171–8. doi:10.1111/j.1469-7580.2008.01001.x.
106. Vitali A, Murano I, Zingaretti MC, Frontini A, Ricquier D, Cinti S. The adipose organ of obesity-prone C57BL/6J mice is composed of mixed white and brown adipocytes. *J Lipid Res.* 2012;53(4):619–29. doi:10.1194/jlr.M018846.

107. Guerra C, Koza RA, Yamashita H, Walsh K, Kozak LP. Emergence of brown adipocytes in white fat in mice is under genetic control. Effects on body weight and adiposity. *J Clin Invest*. 1998;102(2):412–20. doi:10.1172/JCI13155.
108. Morroni M, Barbatelli G, Zingaretti MC, Cinti S. Immunohistochemical, ultrastructural and morphometric evidence for brown adipose tissue recruitment due to cold acclimation in old rats. *Int J Obes Relat Metab Disord*. 1995;19(2):126–31. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7735339>.
109. Sbarbati A, Morroni M, Zancanaro C, Cinti S. Rat interscapular brown adipose tissue at different ages: a morphometric study. *Int J Obes*. 1991;15(9):581–7. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1960009>.
110. Cancellato R, Zingaretti MC, Sarzani R, Ricquier D, Cinti S. Leptin and UCP1 genes are reciprocally regulated in brown adipose tissue. *Endocrinology*. 1998;139(11):4747–50. doi:10.1210/endo.139.11.6434.
111. Lowell BB, Flier JS. Brown adipose tissue, beta 3-adrenergic receptors, and obesity. *Annu Rev Med*. 1997;48:307–16. doi:10.1146/annurev.med.48.1.307.
112. De Matteis R, Ricquier D, Cinti S. TH-, NPY-, SP-, and CGRP-immunoreactive nerves in interscapular brown adipose tissue of adult rats acclimated at different temperatures: an immunohistochemical study. *J Neurocytol*. 1998;27(12):877–86. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10659680>.
113. Giordano A, Morroni M, Santone G, Marchesi GF, Cinti S. Tyrosine hydroxylase, neuropeptide Y, substance P, calcitonin gene-related peptide and vasoactive intestinal peptide in nerves of rat periovarian adipose tissue: an immunohistochemical and ultrastructural investigation. *J Neurocytol*. 1996;25(2):125–36. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8699194>.
114. Cinti S. The adipose organ. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids*. 2005;73(1):9–15. doi:10.1016/j.plefa.2005.04.010.
115. Tosh D, Slack JMW. How cells change their phenotype. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2002;3(3):187–94. doi:10.1038/nrm761.
116. Kuji I, Imabayashi E, Minagawa A, Matsuda H, Miyauchi T. Brown adipose tissue demonstrating intense FDG uptake in a patient with mediastinal pheochromocytoma. *Ann Nucl Med*. 2008;22(3):231–5. doi:10.1007/s12149-007-0096-x.
117. Saito M, Okamatsu-Ogura Y, Matsushita M, et al. High incidence of metabolically active brown adipose tissue in healthy adult humans: effects of cold exposure and adiposity. *Diabetes*. 2009;58(7):1526–31. doi:10.2337/db09-0530.
118. Kopecky J, Clarke G, Enerbäck S, Spiegelman B, Kozak LP. Expression of the mitochondrial uncoupling protein gene from the aP2 gene promoter prevents genetic obesity. *J Clin Invest*. 1995;96(6):2914–23. doi:10.1172/JCI118363.
119. Bachman ES, Dhillon H, Zhang C-Y, et al. betaAR signaling required for diet-induced thermogenesis and obesity resistance. *Science*. 2002;297(5582):843–5. doi:10.1126/science.1073160.
120. Lowell BB, S-Susulic V, Hamann A, et al. Development of obesity in transgenic mice after genetic ablation of brown adipose tissue. *Nature*. 366(6457):740–2. doi:10.1038/366740a0.
121. Löfgren P, Andersson I, Adolfsson B, et al. Long-term prospective and controlled studies demonstrate adipose tissue hypercellularity and relative leptin deficiency in the postobese state. *J Clin Endocrinol Metab*. 2005;90(11):6207–13. doi:10.1210/jc.2005-0596.
122. Salans LB, Horton ES, Sims EA. Experimental obesity in man: cellular character of the adipose tissue. *J Clin Invest*. 1971;50(5):1005–11. doi:10.1172/JCI1106570.
123. Spalding KL, Arner E, Westermark PO, et al. Dynamics of fat cell turnover in humans. *Nature*. 2008;453(7196):783–7. doi:10.1038/nature06902.
124. Spalding KL, Bhardwaj RD, Buchholz BA, Druid H, Frisén J. Retrospective birth dating of cells in humans. *Cell*. 2005;122(1):133–43. doi:10.1016/j.cell.2005.04.028.
125. Hirsch J, Batchelor B. Adipose tissue cellularity in human obesity. *Clin Endocrinol Metab*. 1976;5(2):299–311. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1085232>.
126. Arner P, Spalding KL. Fat cell turnover in humans. *Biochem Biophys Res Commun*. 2010;396(1):101–4. doi:10.1016/j.bbrc.2010.02.165.
127. Johnson PR, Hirsch J. Cellularity of adipose depots in six strains of genetically obese mice. *J Lipid Res*. 1972;13(1):2–11. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/5059196>.

128. Cinti S, Federich RC, Zingaretti MC, De Matteis R, Flier JS, Lowell BB. Immunohistochemical localization of leptin and uncoupling protein in white and brown adipose tissue. *Endocrinology*. 1997;138(2):797–804. doi:10.1210/endo.138.2.4908.
129. Nisoli E, Briscini L, Giordano A, et al. Tumor necrosis factor alpha mediates apoptosis of brown adipocytes and defective brown adipocyte function in obesity. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2000;97(14):8033–8. Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=16665&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>.
130. Arner E, Westermark PO, Spalding KL, et al. Adipocyte turnover: relevance to human adipose tissue morphology. *Diabetes*. 2010;59(1):105–9. doi:10.2337/db09-0942.
131. Lönn M, Mehlig K, Bengtsson C, Lissner L. Adipocyte size predicts incidence of type 2 diabetes in women. *FASEB J*. 2010;24(1):326–31. doi:10.1096/fj.09-133058.
132. Weyer C, Foley JE, Bogardus C, Tataranni PA, Pratley RE. Enlarged subcutaneous abdominal adipocyte size, but not obesity itself, predicts type II diabetes independent of insulin resistance. *Diabetologia*. 2000;43(12):1498–506. doi:10.1007/s001250051560.
133. Hotamisligil GS, Spiegelman BM. Tumor necrosis factor alpha: a key component of the obesity-diabetes link. *Diabetes*. 1994;43(11):1271–8. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7926300>.
134. Xu H, Barnes GT, Yang Q, et al. Chronic inflammation in fat plays a crucial role in the development of obesity-related insulin resistance. *J Clin Invest*. 2003;112(12):1821–30. doi:10.1172/JCI19451.
135. Weisberg SP, McCann D, Desai M, Rosenbaum M, Leibel RL, Ferrante AW. Obesity is associated with macrophage accumulation in adipose tissue. *J Clin Invest*. 2003;112(12):1796–808. doi:10.1172/JCI19246.
136. Cinti S, Mitchell G, Barbatelli G, et al. Adipocyte death defines macrophage localization and function in adipose tissue of obese mice and humans. *J Lipid Res*. 2005;46(11):2347–55. doi:10.1194/jlr.M500294-JLR200.
137. Murano I, Barbatelli G, Parisani V, et al. Dead adipocytes, detected as crown-like structures, are prevalent in visceral fat depots of genetically obese mice. *J Lipid Res*. 2008;49(7):1562–8. doi:10.1194/jlr.M800019-JLR200.
138. Brent GA. Mechanisms of thyroid hormone action. *J Clin Invest*. 2012;122(9):3035–43. doi:10.1172/JCI60047.
139. Cheng S-Y, Leonard JL, Davis PJ. Molecular aspects of thyroid hormone actions. *Endocr Rev*. 2010;31(2):139–70. doi:10.1210/er.2009-0007.
140. Hollenberg AN, Forrest D. The thyroid and metabolism: the action continues. *Cell Metab*. 2008;8(1):10–2. doi:10.1016/j.cmet.2008.06.008.
141. Silva JE. Thermogenic mechanisms and their hormonal regulation. *Physiol Rev*. 2006;86(2):435–64. doi:10.1152/physrev.00009.2005.
142. Bianco AC, Maia AL, da Silva WS, Christoffolete MA. Adaptive activation of thyroid hormone and energy expenditure. *Biosci Rep*. 25(3-4):191–208. doi:10.1007/s10540-005-2885-6.
143. Ribeiro MO, Bianco SDC, Kaneshige M, et al. Expression of uncoupling protein 1 in mouse brown adipose tissue is thyroid hormone receptor-beta isoform specific and required for adaptive thermogenesis. *Endocrinology*. 2010;151(1):432–40. doi:10.1210/en.2009-0667.
144. Kim B. Thyroid hormone as a determinant of energy expenditure and the basal metabolic rate. *Thyroid*. 2008;18(2):141–4. doi:10.1089/thy.2007.0266.
145. Sainsbury A, Zhang L. Role of the hypothalamus in the neuroendocrine regulation of body weight and composition during energy deficit. *Obes Rev*. 2012;13(3):234–57. doi:10.1111/j.1467-789X.2011.00948.x.
146. López M, Alvarez C V, Nogueiras R, Diéguez C. Energy balance regulation by thyroid hormones at central level. *Trends Mol Med*. 2013;19(7):418–27. doi:10.1016/j.molmed.2013.04.004.
147. Ekholm R, Björkman U. Glutathione peroxidase degrades intracellular hydrogen peroxide and thereby inhibits intracellular protein iodination in thyroid epithelium. *Endocrinology*. 1997;138(7):2871–8. doi:10.1210/endo.138.7.5222.
148. Gereben B, Zavacki AM, Ribich S, et al. Cellular and molecular basis of deiodinase-regulated thyroid hormone signaling. *Endocr Rev*. 2008;29(7):898–938. doi:10.1210/er.2008-0019.

149. Köhrle J. The deiodinase family: selenoenzymes regulating thyroid hormone availability and action. *Cell Mol Life Sci.* 2000;57(13-14):1853–63. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11215512>.
150. Köhrle J. Local activation and inactivation of thyroid hormones: the deiodinase family. *Mol Cell Endocrinol.* 1999;151(1-2):103–19. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10411325>.
151. Köhrle J. The selenoenzyme family of deiodinase isozymes controls local thyroid hormone availability. *Rev Endocr Metab Disord.* 2000;1(1-2):49–58. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11704992>.
152. Liu Y-Y, Brent GA. Thyroid hormone crosstalk with nuclear receptor signaling in metabolic regulation. *Trends Endocrinol Metab.* 2010;21(3):166–73. doi:10.1016/j.tem.2009.11.004.
153. Liu Y-Y, Heymann RS, Moatamed F, Schultz JJ, Sobel D, Brent GA. A mutant thyroid hormone receptor alpha antagonizes peroxisome proliferator-activated receptor alpha signaling in vivo and impairs fatty acid oxidation. *Endocrinology.* 2007;148(3):1206–17. doi:10.1210/en.2006-0836.
154. Ribeiro MO, Carvalho SD, Schultz JJ, et al. Thyroid hormone--sympathetic interaction and adaptive thermogenesis are thyroid hormone receptor isoform--specific. *J Clin Invest.* 2001;108(1):97–105. doi:10.1172/JCI12584.
155. Silva JE. Physiological importance and control of non-shivering facultative thermogenesis. *Front Biosci (Schol Ed).* 2011;3:352–71. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21196381>.
156. Oetting A, Yen PM. New insights into thyroid hormone action. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab.* 2007;21(2):193–208. doi:10.1016/j.beem.2007.04.004.
157. Davis PJ, Zhou M, Davis FB, Lansing L, Mousa SA, Lin H-Y. Mini-review: Cell surface receptor for thyroid hormone and nongenomic regulation of ion fluxes in excitable cells. *Physiol Behav.* 2010;99(2):237–9. doi:10.1016/j.physbeh.2009.02.015.
158. Hernandez A, Martinez ME, Liao X-H, et al. Type 3 deiodinase deficiency results in functional abnormalities at multiple levels of the thyroid axis. *Endocrinology.* 2007;148(12):5680–7. doi:10.1210/en.2007-0652.
159. Ng L, Lyubarsky A, Nikonov SS, et al. Type 3 deiodinase, a thyroid-hormone-inactivating enzyme, controls survival and maturation of cone photoreceptors. *J Neurosci.* 2010;30(9):3347–57. doi:10.1523/JNEUROSCI.5267-09.2010.
160. Ono H, Pocai A, Wang Y, et al. Activation of hypothalamic S6 kinase mediates diet-induced hepatic insulin resistance in rats. *J Clin Invest.* 2008;118(8):2959–68. doi:10.1172/JCI34277.
161. Sangiao-Alvarellos S, Vázquez MJ, Varela L, et al. Central ghrelin regulates peripheral lipid metabolism in a growth hormone-independent fashion. *Endocrinology.* 2009;150(10):4562–74. doi:10.1210/en.2009-0482.
162. Theander-Carrillo C, Wiedmer P, Cettour-Rose P, et al. Ghrelin action in the brain controls adipocyte metabolism. *J Clin Invest.* 2006;116(7):1983–93. doi:10.1172/JCI25811.
163. Minokoshi Y, Kahn BB. Role of AMP-activated protein kinase in leptin-induced fatty acid oxidation in muscle. *Biochem Soc Trans.* 2003;31:196–201.
164. Cannon B, Nedergaard J. Thyroid hormones: igniting brown fat via the brain. *Nat Med.* 2010;16(9):965–7. doi:10.1038/nm0910-965.
165. López M, Varela L, Vázquez MJ, et al. Hypothalamic AMPK and fatty acid metabolism mediate thyroid regulation of energy balance. *Nat Med.* 2010;16(9):1001–8. doi:10.1038/nm.2207.
166. Perra A, Simbula G, Simbula M, et al. Thyroid hormone (T3) and TRbeta agonist GC-1 inhibit/reverse nonalcoholic fatty liver in rats. *FASEB J.* 2008;22(8):2981–9. doi:10.1096/fj.08-108464.
167. Klein I, Ojamaa K. Thyroid hormone and the cardiovascular system. *N Engl J Med.* 2001;344(7):501–9. doi:10.1056/NEJM200102153440707.
168. Kahaly GJ, Dillmann WH. Thyroid hormone action in the heart. *Endocr Rev.* 2005;26(5):704–28. doi:10.1210/er.2003-0033.
169. Tang Y-D, Kuzman JA, Said S, Anderson BE, Wang X, Gerdes AM. Low thyroid function leads to cardiac atrophy with chamber dilatation, impaired myocardial blood flow, loss of arterioles, and severe systolic dysfunction. *Circulation.* 2005;112(20):3122–30. doi:10.1161/CIRCULATIONAHA.105.572883.

170. Weltman NY, Ojamaa K, Savinova O V, et al. Restoration of cardiac tissue thyroid hormone status in experimental hypothyroidism: a dose-response study in female rats. *Endocrinology*. 2013;154(7):2542–52. doi:10.1210/en.2012-2087.
171. Liu Y, Redetzke RA, Said S, Pottala J V, de Escobar GM, Gerdes AM. Serum thyroid hormone levels may not accurately reflect thyroid tissue levels and cardiac function in mild hypothyroidism. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2008;294(5):H2137–43. doi:10.1152/ajpheart.01379.2007.
172. Duntas LH, Orgiazzi J, Brabant G. The interface between thyroid and diabetes mellitus. *Clin Endocrinol (Oxf)*. 2011;75(1):1–9. doi:10.1111/j.1365-2265.2011.04029.x.
173. Gray RS, Borseley DQ, Seth J, Herd R, Brown NS, Clarke BF. Prevalence of subclinical thyroid failure in insulin-dependent diabetes. *J Clin Endocrinol Metab*. 1980;50(6):1034–7. doi:10.1210/jcem-50-6-1034.
174. Pittman CS, Suda AK, Chambers JB, Ray GY. Impaired 3,5,3'-triiodothyronine (T3) production in diabetic patients. *Metabolism*. 1979;28(4):333–8. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/449685>.
175. Chen H-S, Wu T-EJ, Jap T-S, et al. Subclinical hypothyroidism is a risk factor for nephropathy and cardiovascular diseases in Type 2 diabetic patients. *Diabet Med*. 2007;24(12):1336–44. doi:10.1111/j.1464-5491.2007.02270.x.
176. Weltman NY, Ojamaa K, Schlenker EH, et al. Low-dose T3 replacement restores depressed cardiac T3 levels, preserves coronary microvasculature, and attenuates cardiac dysfunction in experimental diabetes mellitus. *Mol Med*. 2014. doi:10.2119/molmed.2013.00040.
177. Pol CJ, Muller A, Simonides WS. Cardiomyocyte-specific inactivation of thyroid hormone in pathologic ventricular hypertrophy: an adaptative response or part of the problem? *Heart Fail Rev*. 2010;15(2):133–42. doi:10.1007/s10741-008-9133-7.
178. Simonides WS, Mulcahey MA, Redout EM, et al. Hypoxia-inducible factor induces local thyroid hormone inactivation during hypoxic-ischemic disease in rats. *J Clin Invest*. 2008;118(3):975–83. doi:10.1172/JCI32824.
179. Bianco AC, Sheng XY, Silva JE. Triiodothyronine amplifies norepinephrine stimulation of uncoupling protein gene transcription by a mechanism not requiring protein synthesis. *J Biol Chem*. 1988;263(34):18168–75. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3192531>.
180. Martinez de Mena R, Scanlan TS, Obregon M-J. The T3 receptor beta1 isoform regulates UCP1 and D2 deiodinase in rat brown adipocytes. *Endocrinology*. 2010;151(10):5074–83. doi:10.1210/en.2010-0533.
181. Golozoubova V, Gullberg H, Matthias A, Cannon B, Vennström B, Nedergaard J. Depressed thermogenesis but competent brown adipose tissue recruitment in mice devoid of all hormone-binding thyroid hormone receptors. *Mol Endocrinol*. 2004;18(2):384–401. doi:10.1210/me.2003-0267.
182. Marris H, Schifman A, Stepanyan Z, et al. Temperature homeostasis in transgenic mice lacking thyroid hormone receptor-alpha gene products. *Endocrinology*. 2005;146(7):2872–84. doi:10.1210/en.2004-1544.
183. Ramadan W, Marsili A, Larsen PR, Zavacki AM, Silva JE. Type-2 iodothyronine 5' deiodinase (D2) in skeletal muscle of C57Bl/6 mice. II. Evidence for a role of D2 in the hypermetabolism of thyroid hormone receptor alpha-deficient mice. *Endocrinology*. 2011;152(8):3093–102. doi:10.1210/en.2011-0139.
184. Wikström L, Johansson C, Saltó C, et al. Abnormal heart rate and body temperature in mice lacking thyroid hormone receptor alpha 1. *EMBO J*. 1998;17(2):455–61. doi:10.1093/emboj/17.2.455.
185. Castillo M, Hall JA, Correa-Medina M, et al. Disruption of thyroid hormone activation in type 2 deiodinase knockout mice causes obesity with glucose intolerance and liver steatosis only at thermoneutrality. *Diabetes*. 2011;60(4):1082–9. doi:10.2337/db10-0758.
186. Christoffolete MA, Linardi CCG, de Jesus L, et al. Mice with targeted disruption of the Dio2 gene have cold-induced overexpression of the uncoupling protein 1 gene but fail to increase brown adipose tissue lipogenesis and adaptive thermogenesis. *Diabetes*. 2004;53(3):577–84. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14988240>.
187. De Jesus LA, Carvalho SD, Ribeiro MO, et al. The type 2 iodothyronine deiodinase is essential for adaptive thermogenesis in brown adipose tissue. *J Clin Invest*. 2001;108(9):1379–85. doi:10.1172/JCI13803.
188. Marsili A, Aguayo-Mazzucato C, Chen T, et al. Mice with a targeted deletion of the type 2 deiodinase are insulin resistant and susceptible to diet induced obesity. *PLoS One*. 2011;6(6):e20832. doi:10.1371/journal.pone.0020832.

189. Pelletier P, Gauthier K, Sideleva O, Samarut J, Silva JE. Mice lacking the thyroid hormone receptor-alpha gene spend more energy in thermogenesis, burn more fat, and are less sensitive to high-fat diet-induced obesity. *Endocrinology*. 2008;149(12):6471–86. doi:10.1210/en.2008-0718.
190. Sjögren M, Alkemade A, Mittag J, et al. Hypermetabolism in mice caused by the central action of an unliganded thyroid hormone receptor alpha1. *EMBO J*. 2007;26(21):4535–45. doi:10.1038/sj.emboj.7601882.
191. Hall JA, Ribich S, Christoffolete MA, et al. Absence of thyroid hormone activation during development underlies a permanent defect in adaptive thermogenesis. *Endocrinology*. 2010;151(9):4573–82. doi:10.1210/en.2010-0511.
192. Houstis N, Rosen ED, Lander ES. Reactive oxygen species have a causal role in multiple forms of insulin resistance. *Nature*. 2006;440(7086):944–8. doi:10.1038/nature04634.
193. Irrcher I, Adhichetty PJ, Sheehan T, Joseph A-M, Hood DA. PPARgamma coactivator-1 alpha expression during thyroid hormone- and contractile activity-induced mitochondrial adaptations. *Am J Physiol Cell Physiol*. 2003;284(6):C1669–77. doi:10.1152/ajpcell.00409.2002.
194. Martinez-deMena R, Hernández A, Obregón M-J. Triiodothyronine is required for the stimulation of type II 5'-deiodinase mRNA in rat brown adipocytes. *Am J Physiol Endocrinol Metab*. 2002;282(5):E1119–27. doi:10.1152/ajpendo.00433.2001.
195. Weitzel JM, Radtke C, Seitz HJ. Two thyroid hormone-mediated gene expression patterns in vivo identified by cDNA expression arrays in rat. *Nucleic Acids Res*. 2001;29(24):5148–55. Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=97559&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>.
196. Puigserver P, Wu Z, Park CW, Graves R, Wright M, Spiegelman BM. A cold-inducible coactivator of nuclear receptors linked to adaptive thermogenesis. *Cell*. 1998;92(6):829–39. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9529258>.
197. Uldry M, Yang W, St-Pierre J, Lin J, Seale P, Spiegelman BM. Complementary action of the PGC-1 coactivators in mitochondrial biogenesis and brown fat differentiation. *Cell Metab*. 2006;3(5):333–41. doi:10.1016/j.cmet.2006.04.002.
198. Cypess AM, Lehman S, Williams G, et al. Identification and importance of brown adipose tissue in adult humans. *N Engl J Med*. 2009;360(15):1509–17. doi:10.1056/NEJMoa0810780.
199. Van Marken Lichtenbelt WD, Vanhommelrig JW, Smulders NM, et al. Cold-activated brown adipose tissue in healthy men. *N Engl J Med*. 2009;360(15):1500–8. doi:10.1056/NEJMoa0808718.
200. Virtanen KA, Lidell ME, Orava J, et al. Functional brown adipose tissue in healthy adults. *N Engl J Med*. 2009;360(15):1518–25. doi:10.1056/NEJMoa0808949.
201. Frontini A, Cinti S. Distribution and development of brown adipocytes in the murine and human adipose organ. *Cell Metab*. 2010;11(4):253–6. doi:10.1016/j.cmet.2010.03.004.
202. Skarulis MC, Celi FS, Mueller E, et al. Thyroid hormone induced brown adipose tissue and amelioration of diabetes in a patient with extreme insulin resistance. *J Clin Endocrinol Metab*. 2010;95(1):256–62. doi:10.1210/jc.2009-0543.
203. Bell A, Gagnon A, Grunder L, Parikh SJ, Smith TJ, Sorisky A. Functional TSH receptor in human abdominal preadipocytes and orbital fibroblasts. *Am J Physiol Cell Physiol*. 2000;279(2):C335–40. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10912999>.
204. Schäffler A, Binart N, Schölmerich J, Büchler C. Hypothesis paper Brain talks with fat--evidence for a hypothalamic-pituitary-adipose axis? *Neuropeptides*. 2005;39(4):363–7. doi:10.1016/j.npep.2005.06.003.
205. Sorisky A, Bell A, Gagnon A. TSH receptor in adipose cells. *Horm Metab Res*. 32(11-12):468–74. doi:10.1055/s-2007-978672.
206. Janson A, Karlsson FA, Micha-Johansson G, Bolme P, Brönnegård M, Marcus C. Effects of stimulatory and inhibitory thyrotropin receptor antibodies on lipolysis in infant adipocytes. *J Clin Endocrinol Metab*. 1995;80(5):1712–6. doi:10.1210/jcem.80.5.7745024.
207. Valyasevi RW, Harteneck DA, Dutton CM, Bahn RS. Stimulation of adipogenesis, peroxisome proliferator-activated receptor-gamma (PPARgamma), and thyrotropin receptor by PPARgamma agonist in human orbital preadipocyte fibroblasts. *J Clin Endocrinol Metab*. 2002;87(5):2352–8. doi:10.1210/jcem.87.5.8472.
208. Camastra S, Manco M, Frascerra S, Iaconelli A, Mingrone G, Ferrannini E. Daylong pituitary hormones in morbid obesity: effects of bariatric surgery. *Int J Obes (Lond)*. 2009;33(1):166–72. doi:10.1038/ijo.2008.226.

209. Chikunguwo S, Brethauer S, Nirujogi V, et al. Influence of obesity and surgical weight loss on thyroid hormone levels. *Surg Obes Relat Dis*. 3(6):631–5; discussion 635–6. doi:10.1016/j.soard.2007.07.011.
210. Kok P, Roelfsema F, Langendonk JG, et al. High circulating thyrotropin levels in obese women are reduced after body weight loss induced by caloric restriction. *J Clin Endocrinol Metab*. 2005;90(8):4659–63. doi:10.1210/jc.2005-0920.
211. Nannipieri M, Cecchetti F, Anselmino M, et al. Expression of thyrotropin and thyroid hormone receptors in adipose tissue of patients with morbid obesity and/or type 2 diabetes: effects of weight loss. *Int J Obes (Lond)*. 2009;33(9):1001–6. doi:10.1038/ijo.2009.140.
212. Krotkiewski M. Thyroid hormones in the pathogenesis and treatment of obesity. *Eur J Pharmacol*. 2002;440(2-3):85–98. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12007527>.
213. Reinehr T, Andler W. Thyroid hormones before and after weight loss in obesity. *Arch Dis Child*. 2002;87(4):320–3. Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=1763034&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>.
214. Foley JE, Laursen AL, Sonne O, Gliemann J. Insulin binding and hexose transport in rat adipocytes. Relation to cell size. *Diabetologia*. 1980;19(3):234–41. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6997125>.
215. www.lightcycler-online.com.
216. Nannipieri M, Manganiello M, Pezzatini A, De Bellis A, Seghieri G, Ferrannini E. Polymorphisms in the hANP (human atrial natriuretic peptide) gene, albuminuria, and hypertension. *Hypertension*. 2001;37(6):1416–22. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11408388>.
217. Nannipieri M, Penno G, Pucci L, et al. Pronatriodilatin gene polymorphisms, microvascular permeability, and diabetic nephropathy in type 1 diabetes mellitus. *J Am Soc Nephrol*. 1999;10(7):1530–41. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10405209>.
218. Nannipieri M, Posadas R, Bonotti A, et al. Polymorphism of the 3'-untranslated region of the leptin receptor gene, but not the adiponectin SNP45 polymorphism, predicts type 2 diabetes: a population-based study. *Diabetes Care*. 2006;29(11):2509–11. doi:10.2337/dc06-0355.
219. Geens T, Neels H, Covaci A. Distribution of bisphenol-A, triclosan and n-nonylphenol in human adipose tissue, liver and brain. *Chemosphere*. 2012;87(7):796–802. doi:10.1016/j.chemosphere.2012.01.002.
220. Liang HR, Foltz RL, Meng M, Bennett P. Ionization enhancement in atmospheric pressure chemical ionization and suppression in electrospray ionization between target drugs and stable-isotope-labeled internal standards in quantitative liquid chromatography/tandem mass spectrometry. *Rapid Commun Mass Spectrom*. 2003;17(24):2815–21. doi:10.1002/rcm.1268.
221. Saba A, Donzelli R, Colligiani D, et al. Quantification of Thyroxine and 3,5,3'-Triiodo-thyronine in Human and Animal Hearts by a Novel Liquid Chromatography-Tandem Mass Spectrometry Method. *Horm Metab Res*. 2014. doi:10.1055/s-0034-1368717.
222. Escobar-Morreale HF, Obregón MJ, Escobar del Rey F, Morreale de Escobar G. Replacement therapy for hypothyroidism with thyroxine alone does not ensure euthyroidism in all tissues, as studied in thyroidectomized rats. *J Clin Invest*. 1995;96(6):2828–38. doi:10.1172/JCI118353.
223. Morreale de Escobar G, Pastor R, Obregon MJ, Escobar del Rey F. Effects of maternal hypothyroidism on the weight and thyroid hormone content of rat embryonic tissues, before and after onset of fetal thyroid function. *Endocrinology*. 1985;117(5):1890–900. doi:10.1210/endo-117-5-1890.
224. Pedraza PE, Obregon M-J, Escobar-Morreale HF, del Rey FE, de Escobar GM. Mechanisms of adaptation to iodine deficiency in rats: thyroid status is tissue specific. Its relevance for man. *Endocrinology*. 2006;147(5):2098–108. doi:10.1210/en.2005-1325.
225. Report of the expert committee on the diagnosis and classification of diabetes mellitus. *Diabetes Care*. 2003;26 Suppl 1:S5–20. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12502614>.
226. Forini F, Kusmic C, Nicolini G, et al. Triiodothyronine Prevents Cardiac Ischemia/Reperfusion Mitochondrial Impairment and Cell Loss by Regulating miR30a/p53 Axis. *Endocrinology*. 2014;en20141106. doi:10.1210/en.2014-1106.
227. Forini F, Lionetti V, Ardehali H, et al. Early long-term L-T3 replacement rescues mitochondria and prevents ischemic cardiac remodelling in rats. *J Cell Mol Med*. 2011;15(3):514–24. doi:10.1111/j.1582-4934.2010.01014.x.

228. Roef GL, Rietzschel ER, Van Daele CM, et al. Triiodothyronine and free thyroxine levels are differentially associated with metabolic profile and adiposity-related cardiovascular risk markers in euthyroid middle-aged subjects. *Thyroid*. 2014;24(2):223–31. doi:10.1089/thy.2013.0314.
229. Lambadiari V, Mitrou P, Maratou E, et al. Thyroid hormones are positively associated with insulin resistance early in the development of type 2 diabetes. *Endocrine*. 2011;39(1):28–32. doi:10.1007/s12020-010-9408-3.
230. Iwen KA, Schröder E, Brabant G. Thyroid hormones and the metabolic syndrome. *Eur Thyroid J*. 2013;2(2):83–92. doi:10.1159/000351249.
231. Lee YK, Kim JE, Oh HJ, et al. Serum TSH level in healthy Koreans and the association of TSH with serum lipid concentration and metabolic syndrome. *Korean J Intern Med*. 2011;26(4):432–9. doi:10.3904/kjim.2011.26.4.432.
232. Jourdan C, Linseisen J, Meisinger C, et al. Associations between thyroid hormones and serum metabolite profiles in an euthyroid population. *Metabolomics*. 2014;10(1):152–164. doi:10.1007/s11306-013-0563-4.
233. Kim B-J, Kim TY, Koh J-M, et al. Relationship between serum free T4 (FT4) levels and metabolic syndrome (MS) and its components in healthy euthyroid subjects. *Clin Endocrinol (Oxf)*. 2009;70(1):152–60. doi:10.1111/j.1365-2265.2008.03304.x.
234. Garduño-García J de J, Alvirde-García U, López-Carrasco G, et al. TSH and free thyroxine concentrations are associated with differing metabolic markers in euthyroid subjects. *Eur J Endocrinol*. 2010;163(2):273–8. doi:10.1530/EJE-10-0312.
235. Bruckert E, Giral P, Chadarevian R, Turpin G. Low free-thyroxine levels are a risk factor for subclinical atherosclerosis in euthyroid hyperlipidemic patients. *J Cardiovasc Risk*. 1999;6(5):327–31. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10534137>.
236. Lin S-Y, Wang Y-Y, Liu P-H, Lai W-A, Sheu WH-H. Lower serum free thyroxine levels are associated with metabolic syndrome in a Chinese population. *Metabolism*. 2005;54(11):1524–8. doi:10.1016/j.metabol.2005.05.020.
237. Ortega FJ, Jílková ZM, Moreno-Navarrete JM, et al. Type I iodothyronine 5'-deiodinase mRNA and activity is increased in adipose tissue of obese subjects. *Int J Obes (Lond)*. 2012;36(2):320–4. doi:10.1038/ijo.2011.101.
238. Dall'Asta C, Paganelli M, Morabito A, et al. Weight loss through gastric banding: effects on TSH and thyroid hormones in obese subjects with normal thyroid function. *Obesity (Silver Spring)*. 2010;18(4):854–7. doi:10.1038/oby.2009.320.
239. De Pergola G, Ciampolillo A, Paolotti S, Trerotoli P, Giorgino R. Free triiodothyronine and thyroid stimulating hormone are directly associated with waist circumference, independently of insulin resistance, metabolic parameters and blood pressure in overweight and obese women. *Clin Endocrinol (Oxf)*. 2007;67(2):265–9. doi:10.1111/j.1365-2265.2007.02874.x.
240. Calvo RM, Obregon M-J. Presence and regulation of D1 and D2 deiodinases in rat white adipose tissue. *Metabolism*. 2011;60(9):1207–10. doi:10.1016/j.metabol.2011.01.014.
241. St Germain DL. Iodothyronine deiodinase. *Trends Endocrinol Metab*. 5(1):36–42. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18407186>.
242. Saba A, Chiellini G, Frascarelli S, et al. Tissue distribution and cardiac metabolism of 3-iodothyronamine. *Endocrinology*. 2010;151(10):5063–73. doi:10.1210/en.2010-0491.
243. Chace DH, Millington DS, Terada N, Kahler SG, Roe CR, Hofman LF. Rapid diagnosis of phenylketonuria by quantitative analysis for phenylalanine and tyrosine in neonatal blood spots by tandem mass spectrometry. *Clin Chem*. 1993;39(1):66–71. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8419060>.
244. Ackermans MT, Kettelarij-Haas Y, Boelen A, Endert E. Determination of thyroid hormones and their metabolites in tissue using SPE UPLC-tandem MS. *Biomed Chromatogr*. 2012;26(4):485–90. doi:10.1002/bmc.1691.

Ringraziamenti

Questa parte è stata senza dubbio la più facile da scrivere perché ... l'avete scritta voi! Voi che state leggendo, anche se sicuramente non riuscirò a menzionarvi tutti, siete stati fondamentali per la conclusione di questa lunga maratona durata 5 anni.

È stato un periodo pieno di tutto quello che si può immaginare: vittorie e sconfitte, crisi esistenziali, autostima alle stelle e umore ai minimi storici, nascita di nuovi rapporti e chiusura di altri, chiacchierate, caffè, pensieri e merendine alla macchinetta, stagioni che si alternano nel perimetro del CNR, tra un pranzo all'ombra di un alberino d'estate e il lancio di palle di neve nel parcheggio d'inverno. Per non parlare di quante volte mi sono persa nel S.Chiera (che rimanga tra noi)!

L'avventura della specializzazione è iniziata tra mille dubbi, anche se in un periodo felice per il conseguimento della laurea. L'incontro con la Dottoressa Monica Nannipieri (o con “la mia capa” per sintetizzare con amici e parenti) avvenuto nel 2009, ha dato vita ad una collaborazione che dura ancora oggi e che mi ha dato la possibilità di spaziare molto nel campo della ricerca scientifica; ho imparato tanto sia lavorativamente che umanamente parlando, mi sono responsabilizzata come mai avrei immaginato e ho raccolto per la prima volta i frutti del mio lavoro. Pur non essendo il mio campo, ho anche fatto capolino in situazioni “mediche” e ne sono felice. Ringrazio Monica per avermi dato fiducia fin dal primo giorno, per avermi insegnato ad essere rigorosa quanto basta e per avermi trasmesso il suo modo di lavorare in maniera seria, determinata e sempre nel pieno rispetto dei colleghi.

Negli anni, da nuovi progetti sono nate nuove collaborazioni. Innanzitutto vorrei ringraziare il Dottor Giorgio Iervasi e tutti i suoi collaboratori per avermi dato la possibilità di aggiungere gli studi sul ratto a quelli sull'uomo, permettendomi di ampliare ulteriormente le mie conoscenze. Un grazie speciale va poi al Professor Riccardo Zucchi e a tutto il suo staff per avermi fatta sentire fin da subito a casa, e non ospite, nei suoi laboratori: la sua disponibilità e la sua gentilezza mi hanno motivata molto nell'apprendere nuove metodiche, più “chimiche” di quelle a cui ero abituata. Di conseguenza, ho avuto modo di lavorare con gli esperti della spettrometria di massa (fino a quel momento per me semi-sconosciuta), i Dottori

Alessandro Saba e Riccardo Donzelli che ringrazio per aver analizzato a fondo non solo i miei campioni ma anche la mia psiche!

Ovviamente anche gli amici hanno avuto il loro bel da fare nel sup/sopportarmi. Non dimenticherò mai la forza che mi ha trasmesso la mia amica Paola negli ultimi mesi. Sono molto riconoscente anche alla mia storica amica e collega, la “saggia Milena”, che fin dai tempi della tesi specialistica ha saputo tirarmi su di morale nei momenti più difficili. Per lo stesso motivo non posso dimenticarmi di Linda e Michele. Ringrazio anche la tosta Melania, per il suo contagioso ottimismo e la sua presenza costante e Teresa, per il suo supporto tecnico nonché umano. Allo stesso modo vorrei ringraziare Daniela, con la quale ho condiviso molti bei momenti sia al lavoro che fuori. Per non parlare di tutti gli amici “di corridoio” del CNR, sempre pronti a chiedermi “come va?, come procede?”. Vorrei poi rivolgere un grazie ai miei colleghi di specializzazione per non avermi lasciata mai indietro, pur essendosi specializzati prima di me.

Ed ora, tocca alla mia famiglia! Ormai, arrivata alla terza tesi, mia madre Anna può ufficialmente essere santificata. Mio fratello Elio, che ha dovuto come al solito sorbirsi tutti i miei deliri informatici, la seguirà presto. I miei cugini Stefania e Andrea sono stati straordinari e insostituibili. A tutti voi va un grazie ancora più intenso degli altri. Vorrei ringraziarvi per essermi stati vicini nella lunga e travagliata estate appena trascorsa, quando la mia forma fisica non era proprio al top e il solo pensiero di scrivere la tesi mi atterrava.

Dulcis in fundo ... e sono felicissima di poterlo scrivere ... voglio ringraziare infinitamente il mio fidanzato Riccardo per aver sempre creduto nelle mie capacità più di quanto ci credessi io. Grazie per aver cercato in tutti i modi (scritti, verbali, con immagini, suoni, segnali di fumo ecc.) di farmi capire quanto valgo, anche se questa strategia non ha sempre funzionato a causa della mia testardaggine. Sono fortunata ad avere una dolce metà così speciale.

Insieme a Riccardo voglio ringraziare anche tutta la sua bella e grande famiglia che 3 anni e mezzo fa mi ha “adottata” ma che ho la sensazione di conoscere da sempre. Il vostro calore è quello di cui ho sempre avuto bisogno.

Ah, forse non ve l'ho ancora detto: GRAZIE !!!

Daria 🎵