



UNIVERSITÀ DI PISA

DIPARTIMENTO DI FARMACIA

Corso di laurea Magistrale in Farmacia

Tesi di Laurea

**TESSUTO ADIPOSO BRUNO:
CARATTERISTICHE E STRATEGIE PER FAR FRONTE ALL'OBESITÀ**

Relatore

Prof. Gino Giannaccini

Prof. Antonio Lucacchini

Candidato

Giorgio Pellini

Anno accademico

2015/2016

INDICE

1	Introduzione	8
2	Obesità	9
3	Caratteristiche del tessuto adiposo bianco (WAT)	10
	3.1 Leptina e Grelina.....	13
4	Tessuto adiposo bruno (BAT)	15
	4.1 Storia e funzione.....	15
	4.2 Tessuto adiposo bruno nell'uomo.....	17
	4.3 Origine embrionale.....	20
	4.4 Adipociti beige nel WAT.....	20
	4.5 Tipi di adipociti bruni nell'uomo.....	22
5	Fisiologia del BAT	24
	5.1 Produzione di calore.....	24
	5.2 Sistema nervoso simpatico e asse tiroideo.....	24
	5.3 Termogenesi.....	28
	5.3.1 Termogenesi indotta dal freddo.....	28
	5.3.2 Termogenesi indotta dalla dieta.....	29
6	Il secretoma del grasso bruno	30
	6.1 Neoregolina.....	31
	6.2 FGF21.....	32
	6.3 VEGF.....	32
	6.4 Proteine ossee morfogeniche.....	33
	6.5 Interleuchina.....	34
	6.6 Fattore di crescita nervosa.....	34

6.7	Adiponectina.....	35
6.8	Ormoni e metaboliti.....	35
7	Attivatori del BAT conosciuti dall'uomo.....	37
7.1	Esposizione al freddo ed acclimazione.....	37
7.2	Sistema nervoso simpatico.....	39
7.2.1	E' possibile evitare l'esposizione al freddo?.....	39
7.2.2	Tre studi con isoprenalina ed efedrina.....	40
7.3	Regolatori molecolari.....	41
7.4	Capsinoidi.....	42
7.5	Insulina.....	43
7.6	Browning del WAT.....	43
7.7	Nuovi attivatori del BAT.....	45
7.7.1	Irisina.....	45
7.7.2	Peptidi natriuretici.....	48
8	Conclusioni.....	51

1. INTRODUZIONE

Una rapida crescita della popolazione in sovrappeso e del numero di individui obesi negli ultimi decenni suggerisce che le attuali strategie basate sulla dieta, l'esercizio fisico e le conoscenze farmacologiche non sono sufficienti per far fronte a questa epidemia. L'obesità è il risultato di una elevata assunzione calorica e stoccaggio energetico, operato quest'ultimo dal tessuto adiposo bianco (WAT), ed entrambi non controbilanciati da un altrettanto importante dispendio energetico. Pertanto, la ricerca attuale è focalizzata sullo sviluppo di nuove strategie volte ad aumentare il dispendio energetico. A fronte di ciò, il tessuto adiposo bruno (BAT), la cui importanza è stata recentemente rivalutata grazie all'utilizzo di moderne tecniche ad emissione di positroni (PET), sta ricevendo un'enorme attenzione da enti di ricerca in tutto il mondo, in quanto, la sua principale funzione è quella di dissipare energia sotto forma di calore attraverso un processo chiamato termogenesi. Tuttavia, una sostanziale riduzione di massa del BAT, e quindi della sua azione, che si verifica durante il normale processo di crescita negli esseri umani non rendono così facile lo sfruttamento di questo tessuto. In questi ultimi anni la ricerca ha effettuato grandi passi e studiato strategie che si concentrano sull'espansione del BAT e sull'attivazione di quello già esistente.

In questa tesi cercherò di definire le principali funzioni biologiche del WAT e del BAT, che svolgono un ruolo critico ed opposto nel bilancio energetico, (immagazzinamento di energia rispetto al dispendio energetico) descriverò la storia e le ricerche effettuate sul BAT per infine valutare se l'attivazione e/o l'espansione del BAT sarà in futuro realizzabile per trattare l'obesità negli esseri umani.

2. L'OBESITÀ

Ippocrate scrisse che «la corpulenza non è solo una malattia in sé, ma il presagio di altre»

L'obesità sta rapidamente emergendo come una delle più grandi sfide della salute umana, è una patologia tipica delle società dette "del benessere". Il numero di persone obese è quasi raddoppiato dal 1980. Secondo l'Organizzazione Mondiale della Sanità (OMS) vi sono attualmente circa 1,5 miliardi di adulti in sovrappeso nel mondo e di questi, 500 milioni sono obesi. Inoltre, circa 42 milioni di bambini sotto i 5 anni sono in sovrappeso o obesi.

La situazione negli Stati Uniti è piuttosto allarmante, con il 65% degli adulti statunitensi in sovrappeso o obesi. L'obesità è un fattore di rischio per un grande numero di malattie: cardiovascolari, metaboliche, come il diabete di tipo 2 e numerose forme di cancro (1).

A livello biologico, l'obesità deriva da un disquilibrio del bilancio energetico del corpo.

Se l'apporto di energia (introdotto con il cibo) supera consistentemente la spesa energetica, l'energia supplementare viene trasportata e immagazzinata nel WAT sotto forma di trigliceridi (2). Un numero elevato di fattori come genetici, ambientali, comportamentali, biologici e di stile di vita svolgono un ruolo importante nell'aumento del consumo di cibo e nello sviluppo di disturbi causati dalla sovralimentazione (3).

Ad esempio, secondo recenti studi alcuni tipi di alimenti, come quelli trovati in diete ricche di grassi e zuccheri, riescono a dare dipendenza come il sesso e la droga, attraverso la stimolazione dei centri del piacere del cervello (4).

Nel corso del tempo, questo altera in modo permanente il comportamento alimentare e gli individui diventano abitudinari nel consumare diete ricche di grassi ad alta energia. Pertanto, la comprensione dei meccanismi fisiologici dell'assunzione, stoccaggio, e dispendio di energia è diventata un campo di intensa ricerca. Una via potenziale per incrementare la spesa energetica potrebbe essere proprio quella di reclutare e aumentare la quantità e l'attività del BAT, famoso per bruciare il grasso attraverso un processo chiamato termogenesi.

3. TESSUTO ADIPOSO BIANCO (WAT)

Il tessuto adiposo bianco è il tessuto di tipo adiposo più diffuso nell'organismo umano, ha la principale funzione di immagazzinare l'energia che noi introduciamo nel nostro organismo sotto forma di trigliceridi (e di liberarla quando è necessario sotto forma di 3 acidi grassi e 1 glicerolo) che formano grandi lipidi uniloculari. I maggiori depositi di WAT sono il sottocutaneo e l'intraddominale. Piccole quantità di WAT sono state trovate anche nelle regioni periarticolari, epicardiali, mediastinali e perivascolari dell'uomo. Quindi il WAT ha la funzione primaria di riserva energetica e questo lo rende il principale centro di approvvigionamento energetico del corpo. Sebbene il WAT consista anche in una piccola frazione di cellule immunitarie e stromali (5), è per lo più composto da adipociti bianchi.

Negli individui adulti questi adipociti sono maturi, cellule differenziate del tutto, e la loro grandezza è proporzionale alla quantità di lipidi immagazziate, questo tipo di cellule infatti è capace di immagazzinare una grande quantità di energia anche attraverso processi ipertrofici e iperplastici (figura 1) (6).

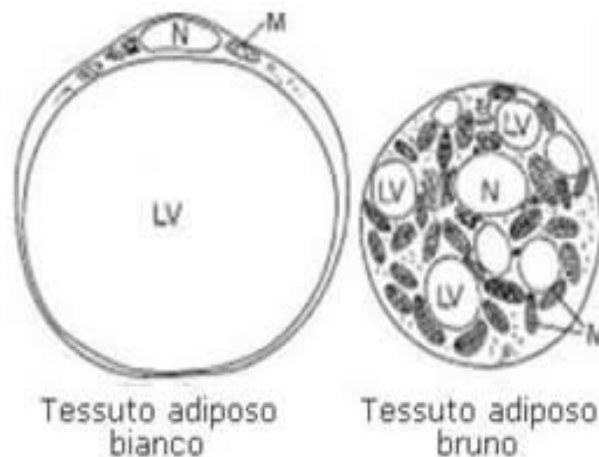


Immagine 1: *nell'adipocita bianco la goccia lipidica rappresenta la grande quantità di energia immagazzinata attraverso un unico lipide uniloculare che toglie spazio agli organelli della cellula come nucleo e mitocondri, nell'adipocita bruno invece sono presenti multiple gocce lipidiche e molti mitocondri, protagonisti del processo di termogenesi.*

Il WAT inoltre possiede anche una popolazione di preadipociti, che risiede lungo il tratto di vascolarizzazione del tessuto adiposo, queste sono cellule non ancora differenziate e quindi non ancora capaci di accumulare grasso, che sono destinate a diventare adipociti maturi.

In condizioni di grande quantità di afflusso energetico, quando gli adipociti esistenti hanno raggiunto la loro massima capacità di stoccaggio, i preadipociti sono indotti a differenziarsi in adipociti maturi per accogliere, senza nessuno spreco, la totale richiesta energetica. Quindi, in aggiunta all'ipertrofia, i preadipociti giocano un ruolo molto importante nello stoccaggio dell'afflusso energetico.

Questa grande capacità d'espansione del WAT, compresi i fenomeni di ipertrofia e iperplasia per immagazzinare energia sembra essere un fenomeno evolutivo sviluppatosi della specie per far fronte a lunghi periodi di assenza di cibo e risorse energetiche, molto frequenti nella storia dell'uomo.

Sebbene in tempi moderni, contrariamente al passato, si trova molta facilità nel reperire alimenti poco costosi e dall'alto valore energetico, la grande facilità che ha l'organismo nel conservare energia ha contribuito in maniera paradossale a fenomeni del tutto opposti al benessere, quali il sovrappeso e l'obesità.

Il WAT dimostra quindi una grande abilità di espansione, e ciò permette ad individui obesi ed in sovrappeso di aumentare di decine di kg il loro peso solo grazie all'aumento di questo tessuto; questo fenomeno genera l'obesità.

L'obesità è accompagnata da un elevato incremento di lipidi, sia nei normali siti di deposito, come il tessuto adiposo, che in altri organi che stanno al di fuori del comune, questo fenomeno di deposito anomalo è chiamato deposito ectopico di grasso, ed è generalmente frequente nel cuore e nei vasi sanguigni dove spesso provoca effetti che sfociano in patologie molto gravi. Ad esempio un deposito al di fuori degli adipociti, quindi anomalo, avviene nei muscoli scheletrici, nel miocardio e negli epatociti.

Cosa succede se proviamo ad inibire lo sviluppo del WAT ed in particolare degli adipociti che lo formano? Perdiamo energia che potrebbe essere immagazzinata perché perdiamo lo spazio all'interno degli adipociti? A questa domanda hanno cercato di dare una risposta elegante 2 studi condotti da Moitra et al. utilizzando modelli animali.

Nel primo studio è stato generato un topo senza massa grassa attraverso l'espressione selettiva della proteina dominante-negativa A-ZIP/F-1, che si trova generalmente negli adipociti (7). Questa proteina è capace di prevenire il legame con il DNA da parte di molti fattori di trascrizione B-ZIP, e con ciò sopprime la funzione di quest'ultimi, indispensabili alla produzione di adipociti bianchi maturi e differenziati.

Questi topi quindi non presentano nessuna traccia di WAT e nessuna capacità di immagazzinare energia (7). In assenza del WAT questi topi accumulano lipidi in modo anomalo in un numero elevato di tessuti, quali fegato, muscoli, cuore e reni, sviluppano diabete, e sono molto suscettibili all'insorgenza di fenomeni tumorali (8).

In un secondo studio, il recettore PPAR γ , un importantissimo recettore nucleare prettamente necessario per lo sviluppo della massa lipidica, essendo un regolatore nella differenziazione degli adipociti, viene eliminato da quest'ultimi. Questo causa molta perdita di WAT (lipoatrofia), che persiste solo in piccolissima quantità.

Queste cavie prive di PPAR γ mostrano quindi resistenza all'insulina, diabete e steatosi epatica a causa di un grande accumulo di lipidi nel fegato. Inoltre presentano alterazioni ossee, della pelle e delle ghiandole mammarie, tutti organi dove si riscontra grande accumulo di lipidi (9).

Questi studi mostrano chiaramente che in assenza di un luogo dove poter immagazzinare energia come il WAT, l'energia extra non può essere semplicemente eliminata dal corpo. In assenza del WAT infatti, l'energia viene immagazzinata in cellule di altri tessuti in maniera forzata e ciò può stravolgere la loro funzione biologica di base.

Sembra quindi che, il meccanismo di conserva energetica che favorisce lo stoccaggio a discapito della perdita energetica, abbia effetti dannosi sulle funzioni generali del corpo in tempi moderni, in quanto, sviluppatosi in tempi lontani per far fronte a periodi di carenza di cibo e quindi di energia.

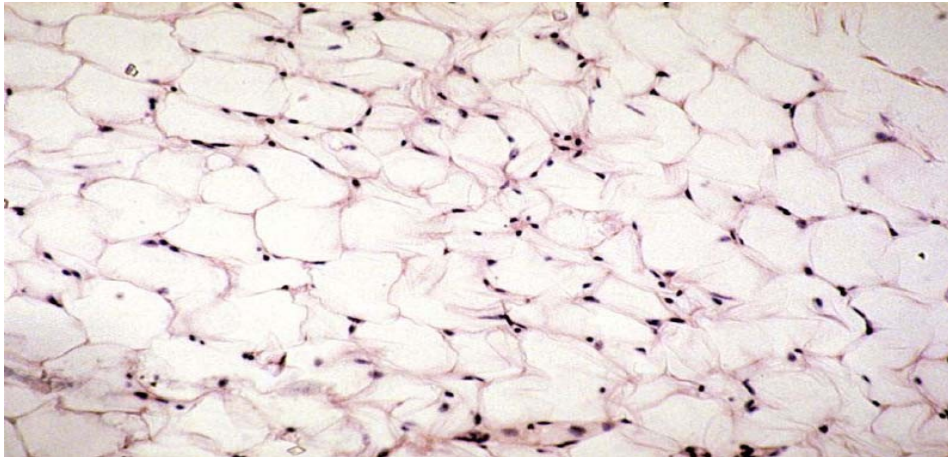


Immagine 2: Immagine istologica del tessuto adiposo bianco

3.1 Leptina e Grelina

Esiste un meccanismo grazie al quale il WAT comunica al cervello i livelli di energia immagazzinati, sopprimendo in tal modo l'assunzione di energia? Il WAT non è solo un semplice deposito di energia. Esso funziona anche come organo endocrino attivo e secerne una serie di citochine, come la leptina, adiponectina, resistina, IL-6, IL-10, e il TNF α (10). Di queste, leptina e adiponectina sono prevalentemente secrete dagli adipociti bianchi e i loro livelli circolanti oscillano in relazione ai livelli di energia immagazzinata nel WAT. Queste adipochine comunicano con altri organi, come cervello, muscolo, fegato, nel regolare l'omeostasi energetica (11). L'adipochina principale responsabile nel comunicare livelli di energia immagazzinati nel WAT al cervello è la leptina. Secreta dagli adipociti del WAT, la leptina segnala all'ipotalamo quando abbiamo un'abbondanza di energia immagazzinata, e grazie a questo, controlla l'appetito (12). In maniera opposta, la grelina, un ormone peptidico secreto dalle cellule endocrine dello stomaco, induce segnali di fame o di insufficienza energetica all'ipotalamo, regolando così l'appetito a breve termine e la distribuzione energetica. Dopo un pasto, quando lo stomaco è pieno, i livelli di grelina sono ridotti.

É in grado la leptina di sopprimere i livelli di grelina ed i segnali di appetito indotti da essa? E' stato dimostrato che la leptina, infatti, potrebbe sopprimere la segnalazione mediata dalla grelina (13). Tuttavia la leptina sembra funzionare principalmente nel

controllo dell'appetito a lungo termine e potrebbe non riuscire a regolare la fame a breve termine. Per esempio, la somministrazione di leptina ad animali che erano stati a digiuno durante la notte non impedisce loro di consumare cibo, il che suggerisce che la leptina non può ignorare i segnali di fame avviati dalla grelina. I livelli di leptina sono direttamente proporzionali alla quantità di energia immagazzinata, e i suoi livelli continuano ad aumentare in proporzione all'energia introdotta. Tuttavia, anche se gli individui obesi hanno livelli circolanti di leptina molto elevati, essa fallisce nel sopprimere l'appetito. Ciò è dovuto allo sviluppo di una resistenza alla leptina (14).

Ad esempio, la somministrazione giornaliera di leptina ad animali obesi riduce la loro assunzione di cibo per alcune settimane prima che sviluppino una resistenza alla leptina e riprendano i loro standard abitudinari di consumo di cibo. Se i livelli di energia sono molto elevati, continuano ad essere indotti i segnali di fame mediati dalla grelina? I livelli di grelina sono inferiori in condizioni di obesità, in cui i livelli di energia sono molto elevati (15). In alcuni studi è stato osservato che l'appetito mediato da grelina è ridotto in condizioni di obesità; tuttavia, è stato anche dimostrato che la grelina stimola l'appetito e l'assunzione di cibo ancor di più in soggetti obesi rispetto a soggetti magri (16). Sembra che la segnalazione mediata dalla grelina fallisca nel riconoscere la grande presenza di energia immagazzinata nel WAT e continui a segnalare la fame quando lo stomaco è vuoto. Questo potrebbe essere in parte dovuto ad un'alterazione nella segnalazione della leptina, ed in condizioni di leptino resistenza, la grelina potrebbe essere più efficace, anche a bassi livelli, ad indurre l'appetito. L'incapacità della leptina nell'indurre il suo segnale sulla fame mediato dalla grelina e la relativa rapidità di sviluppo della leptino resistenza suggeriscono che i processi di sopravvivenza evolutivisti hanno da sempre favorito l'assunzione e la conserva di energia. Sembra che l'assunzione e lo stoccaggio di energia siano meccanismi sviluppati con l'evoluzione dell'uomo e che richiedano un abbattimento del segnale della leptina. Questi rigidi meccanismi che favoriscono l'assunzione e lo stoccaggio di energia contribuiscono all'aumento di peso ed infine all'obesità. Pertanto, l'unica strada per bilanciare l'energia del corpo e prevenire l'obesità è trovare una via per consumare energia.

4 TESSUTO ADIPOSO BRUNO (BAT)

4.1 Storia e funzione del tessuto adiposo bruno (BAT)

Le prime notizie riguardanti il BAT sono addirittura datate 1551, il naturalista svizzero Conrad Gessner documentò per la prima volta il tessuto adiposo bruno nelle marmotte e lo chiamò “*neihter fat nor flesh*” (ne grasso ne carne) (17). Tra la fine del diciannovesimo e l'inizio del ventunesimo secolo il BAT fu scoperto in molti mammiferi (circa 55 specie), incluso l'uomo. A quel tempo, al BAT furono dati molti nomi, come ad esempio 'organo grasso primitivo', 'ghiandola grassa', 'ghiandola dell'ibernazione', 'ghiandola interscapolare', ma solo nel 1895 Hammar lo definì 'grasso bruno' (18). Questi nomi già indicavano le diverse caratteristiche morfologiche e funzionali che il BAT ha rispetto al WAT. Durante i primi anni del 1900, la funzione del BAT non era ancora del tutto chiara, sebbene si pensasse che, a causa delle sue caratteristiche morfologiche, fosse molto differente dal WAT. Nel 1908 Bonnot descrisse il BAT di un soggetto umano in questo modo: "è di colore rosa e lobulato, presenta molto l'aspetto di un pancreas fresco" (19). Inoltre, già a quel tempo, era evidente che la quantità di BAT diminuiva subito dopo la nascita negli esseri umani, a differenza dei roditori e degli animali in letargo, dove invece, continuava a svilupparsi durante tutta la vita (20). Cramer nel 1920 ipotizzò che il BAT fosse un'importante ghiandola secretiva, a causa della propria struttura anatomica, simile ad una ghiandola dotata di un'elevata vascolarizzazione ed una stretta connessione con la tiroide e con la ghiandola adrenale (20). Ipotizzò inoltre, che il BAT potesse essere importante nel mantenere elevati livelli di certe vitamine, dal momento che osservò, che i contenuti di grasso e di lipidi del BAT erano ai minimi termini in animali che morivano in seguito ad un'alimentazione carente in vitamine. Divenne chiara solo nel 1960 la vera funzione fisiologica di questo tipo di tessuto adiposo: produrre calore attraverso un processo chiamato termogenesi (21). Dal momento che tutti gli animali in letargo possedevano il BAT si concluse che quest'organo fosse coinvolto nel mantenimento della temperatura corporea durante l'ibernazione. Nel 1964, Smith & Roberts dimostrarono che l'attività del BAT nei topi aumenta quando sono esposti a temperature fredde (21).

Arrivarono quindi alla conclusione che temperature fredde portano ad un aumento della massa totale del BAT e ad un incremento del consumo di ossigeno misurato in vitro. Da allora in poi la ricerca si dedicò allo studio dell'anatomia e della fisiologia del BAT, e al suo ruolo nella termogenesi non da brivido indotta dal freddo (NST), che è il processo che porta alla produzione di calore durante l'esposizione al freddo. Solo nel 1978 si comprese il vero potenziale termogenico del BAT (22) e fu scoperta la proteina responsabile della dissipazione energetica nel mitocondrio; fu chiamata proteina disaccoppiante 1 (UCP1), o termogenina (23), collocata in grande quantità nella membrana mitocondriale interna degli adipociti bruni e vera protagonista del meccanismo molecolare della termogenesi. Un anno più tardi fu ipotizzato che il BAT giocasse un importante ruolo anche nella termogenesi indotta dalla dieta (DIT) (24).

La vera e propria riscoperta funzionale del BAT avvenne però nel 2009, grazie a studi effettuati con una tecnica innovativa chiamata tomografia ad emissione di positroni (PET), questa tecnica moderna, solitamente utilizzata in campo oncologico per determinare la presenza di tumori, mise fine alla credenza che il BAT fosse presente nella razza umana solo in infanti e bambini, dimostrandone la presenza, anche se in piccola parte, nella maggior parte degli individui adulti. Questa scoperta ha fatto in modo che, dal 2009, il BAT riacquistasse moltissimo interesse da parte di tutto il mondo della ricerca, e che tutt'oggi sia considerato uno dei maggiori argomenti di ricerca, con la speranza di poterne sfruttare le caratteristiche (immagine 3).

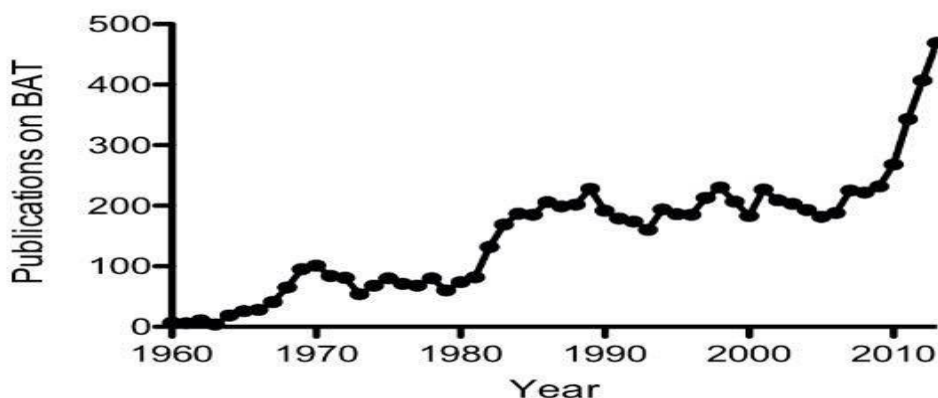


Immagine 3: *Pubblicazioni annuali di PubMed con i termini di ricerca: "brown adipose tissue" (BAT)*

4.2 Tessuto adiposo bruno nell'uomo

Inizialmente si pensava che il BAT fosse presente nei neonati e che si perdesse con la crescita, fino a scomparire del tutto in età giovanile (25). Studi anatomici sui neonati mostravano che BAT altamente vascolarizzato era localizzato a livello delle ascelle, del collo, intorno ai reni e tra le scapole, quest'ultimo nei neonati viene considerato come un organo anatomico separato e prende il nome di 'ghiandola interscapolare' (immagine 4)

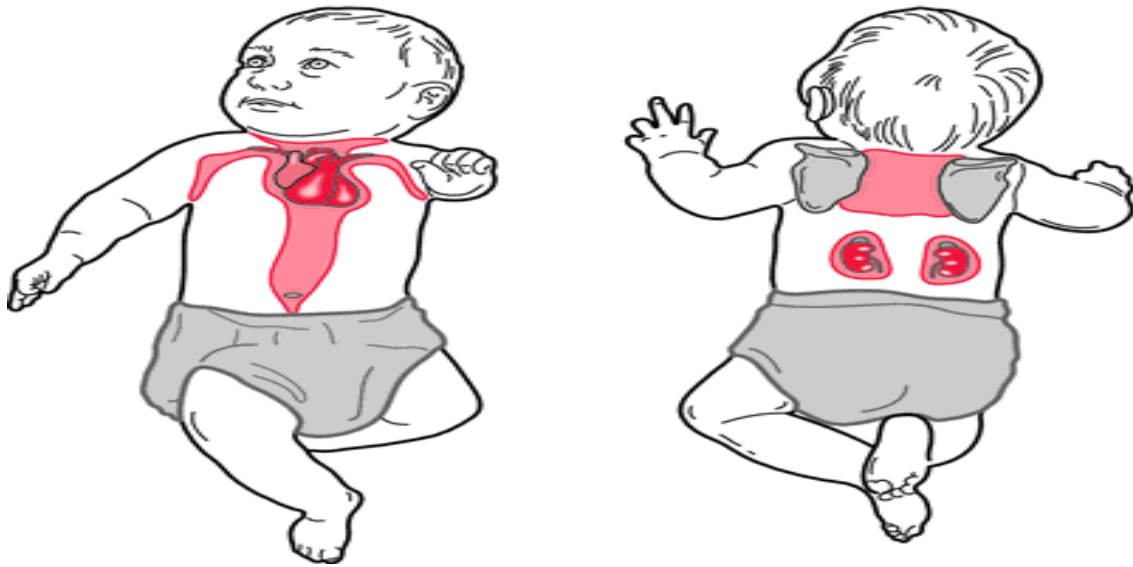
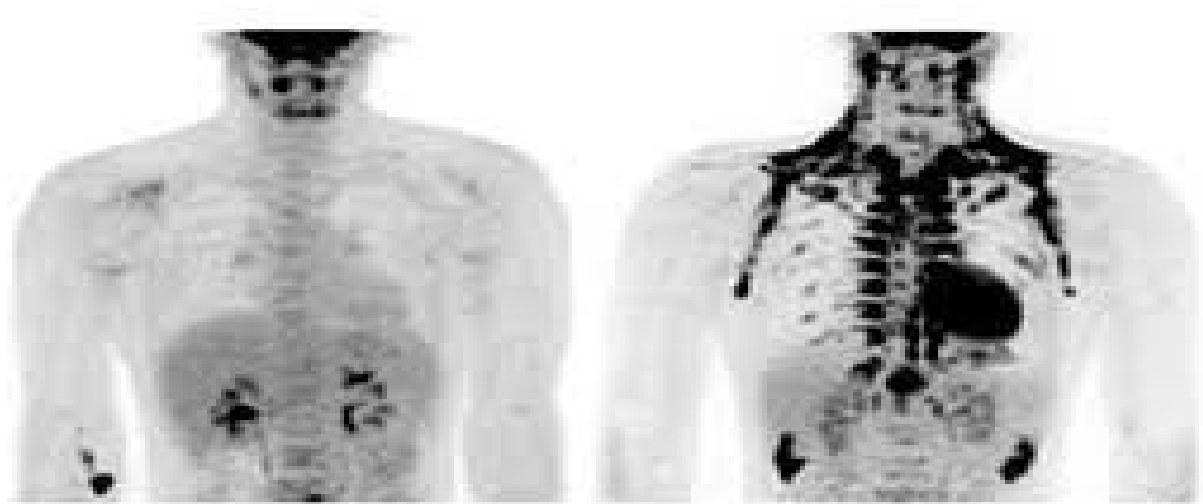


Immagine 4: localizzazione del tessuto adiposo bruno nei neonati

Negli adulti invece, dopo molti dibattiti e ricerche siamo arrivati alla conclusione che il BAT attivo è per lo più localizzato al di sopra delle clavicole, in una regione anatomica chiamata deposito adiposo sopraclavicolare, da qui si estende fino alle ascelle e decorre parallelo alla spina toracica fino agli spazi intercostali posteriori. Inoltre è localizzato nel collo e bilateralmente nella regione cervicale.

BAT attivo è stato anche trovato all'interno delle regioni mediastinali, perirenali e periadrenali oltre alla possibilità di trovarlo all'interno del tessuto adiposo mesenterico e pelvico. Questi depositi diventano più visibili dopo l'esposizione al freddo.



Tessuto adiposo bruno (scuro) mostrato nelle immagini di una PET, dopo l'esposizione al freddo (dx) e a temperatura ambiente (sinistra)

Immagine 5: localizzazione del tessuto adiposo bruno umano mostrato nelle immagini di una PET dopo l'esposizione al freddo (destra) e a temperatura ambiente (sinistra)

Una distribuzione anatomica più dettagliata del BAT è stata descritta negli anni 1960 nei neonati (26) e nel 1970 e negli adulti (27). In questi anni si appurò che i più grandi siti di BAT si trovano nei depositi cervicali e ascellari perirenali. Inoltre, si osservò che il rilievo a forma di aquilone nel sito interscapolare dei neonati era quantitativamente trascurabile negli adulti umani. In seguito ad analisi istologiche del BAT in neonati (28) e negli esseri umani adulti (29) fu determinata la capacità termogenica. L'analisi istologica del BAT umano dimostrò che il citoplasma era densamente ricco di mitocondri e altamente vascolarizzato, proprio come nei roditori, e a causa di queste caratteristiche, sommate alla grande presenza di ferro associato alla presenza di citocromi nei mitocondri, veniva definito bruno. Come il classico WAT, anche il BAT è formato da adipociti che però sono più piccoli rispetto ai classici bianchi, i lipidi sono contenuti in multiple goccioline molto piccole, che danno all'adipocita un particolare aspetto istologico multiloculare (immagine 6).

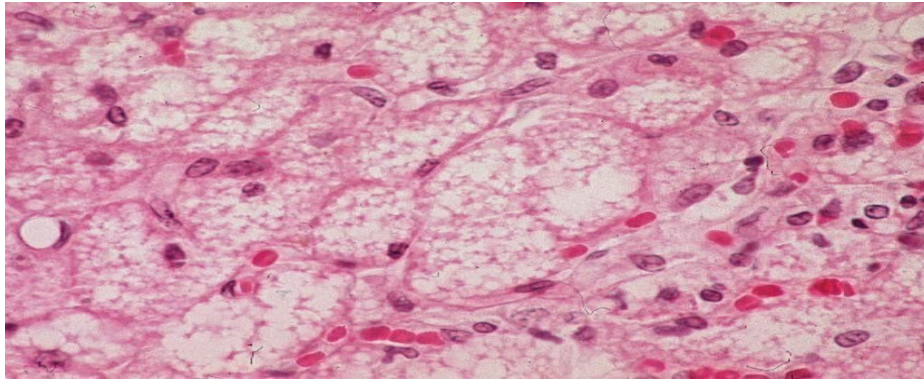


Immagine 6: *immagine istologica del tessuto adiposo bruno*

È interessante notare che in un'indagine post mortem eseguita da Huttem et. al è stato dimostrato che gli individui che lavoravano all'aperto, esposti al freddo, presentano un BAT molto più sviluppato e pronunciato rispetto ad individui che lavorano al caldo (29). Infine è stato dimostrato che, anche i mitocondri del BAT umano presentano elevate concentrazioni di UCP1 ed hanno caratteristiche biochimiche simili a quelle degli animali (30). Astrup et al. (1985) misurò il contributo dell'attività del BAT durante la somministrazione di efedrina, un agonista adrenergico che attiva la funzione del BAT.

La termogenesi del BAT è stata stimata misurando due temperature; quella rilevata da termocoppie poste in profondità nel tessuto adiposo perirenale, e quella del flusso sanguigno nel BAT perirenale (31). Il contributo stimato del BAT per la termogenesi indotta da efedrina era basso, ed un ruolo più importante era stato associato al muscolo scheletrico, lasciando le funzioni del BAT nel dimenticatoio.

Venti anni dopo, il ruolo del BAT nel metabolismo energetico umano è diventato di nuovo un tema caldo. Nel 2009, tre studi sull'uomo utilizzando la tecnica PET hanno dimostrato che l'esposizione al freddo aumenta il processo di termogenesi e l'assorbimento del glucosio da parte del tessuto adiposo bruno che si trova nella regione del collo e sopraclavicolare (32,34). Biopsie di tessuto adiposo della regione del collo in cui è stato trovato assorbimento di 18fluorodesossiglucosio ([¹⁸F]FDG), utilizzato come tracciante nella tomografia ad emissione di positroni, hanno evidenziato la presenza di UCP-1, conferma del fatto che il tessuto era BAT ed era attivo (34,35). È interessante notare che molti studi moderni abbiano evidenziato che l'attività del BAT sia

inversamente correlata alla percentuale di grasso corporeo e all'indice di massa corporea, suggerendo che il BAT possa essere coinvolto nello sviluppo dell'obesità (32,33,36,37). Data la sua elevata capacità metabolica, il BAT è visto come un potenziale bersaglio per aumentare la spesa energetica e quindi come terapia per curare l'obesità e le sue complicanze metaboliche secondarie, come il diabete di tipo 2.

4.3 Origine embrionale del tessuto adiposo bruno

Negli ultimi anni, la ricerca, grazie a modelli cellulari ha del tutto chiarito l'origine embrionale del BAT, ed attualmente sembrano esserci differenti pathway di sviluppo. L'origine del BAT classico è collegata alla stessa del muscolo scheletrico (38), entrambi deriverebbero da specifiche cellule del dermomiotomo (Porzione del mesoderma).

Questa conclusione è supportata dal fatto che il regolatore della differenziazione del muscolo scheletrico, il fattore miogenico 5 (Myf5) (proteina espressa dal gene MYF5), che ha un ruolo fondamentale nella differenziazione muscolare e nella miogenesi, è espresso soltanto negli adipociti bruni e nei miociti, o nei loro precursori.

Anche le proteine morfogenetiche ossee (BMPs) hanno mostrato un importante ruolo nella differenziazione degli adipociti bruni.

Tra i molti fattori di trascrizione coinvolti nella differenziazione del BAT, due meritano una particolare attenzione: il PGC- α (Peroxisome Proliferator-Activated Receptor Gamma Coactivator 1 alpha) e la proteina PRDM16.

La PGC- α stimola la biogenesi mitocondriale e il metabolismo ossidativo, ed è cruciale per l'adattamento all'esposizione al freddo (39,40). La sua espressione aumenta notevolmente durante l'esposizione al freddo e la sua assenza nei preadipociti bruni smorza notevolmente l'aumento dell'UCP1 su segnalazione adrenergica (41). PRDM16 invece è una proteina zinc finger, che ha dimostrato essere preferenzialmente espressa negli adipociti bruni rispetto agli adipociti bianchi. Essa agisce come un fattore di trascrizione in combinazione con PGC-1 α .

4.4 Adipociti beige nel tessuto adiposo bianco

Nei roditori, come nell'uomo, gli adipociti bruni sono presenti in tipici depositi, come ad

esempio il deposito interscapolare, e queste cellule sono note con il nome di adipociti bruni "classici".

Tuttavia, oltre al classico BAT è stato scoperto un tipo distinto di adipocita all'interno dei depositi WAT, ed è stato chiamato adipocita brite (42) o adipocita beige (43). Il profilo di espressione genica ha dimostrato che questi adipociti beige provengono da una diversa linea cellulare rispetto agli adipociti bruni classici, non derivano quindi da progenitori che esprimono Myf5. Inoltre, questi adipociti beige possono formarsi all'interno di depositi WAT, in particolare in quello inguinale, attraverso un processo chiamato *'Browning'* in seguito ad una stimolazione adrenergica a lungo termine o dopo un'esposizione al freddo prolungata. Allo stato basale, queste cellule beige assomigliano molto agli adipociti bianchi uniloculari, mentre dopo la stimolazione sviluppano un fenotipo più simile agli adipociti bruni. Inoltre, queste cellule non esprimono né marcatori miogenici né marcatori specifici caratteristici degli adipociti bruni, come Zic1, Lhx8, Meox2, e PRDM16 (42), ma esprimono dei loro marcatori specifici (per esempio Hoxc9) (45). In uno studio interessante, Wu et al. (43) sono stati in grado di isolare le cellule beige dal deposito adiposo sottocutaneo inguinale ed hanno trovato pool distinti di cellule progenitrici che danno origine a queste cosiddette linee cellulari beige. Questi adipociti beige sono caratterizzati da marcatori genetici unici, come CD137, Tmem26, e Tbx1, e non contengono marcatori caratteristici del BAT come Ebf3, Eva1 e Fbxo31 (immagine 7 C). Inoltre, hanno scoperto che cellule beige non stimolate assomigliano agli adipociti bianchi in quanto hanno entrambe una bassa espressione dei marcatori caratteristici degli adipociti bruni: UCP-1, Cidea, e Cox7a1. Tuttavia, attraverso stimolazione cAMP, i livelli assoluti di mRNA UCP1 e la capacità respiratoria erano paragonabili a quelli degli adipociti bruni classici. In coerenza con questo, Petrovic et al. (43) dimostrarono che, sia cellule beige reclutate dal deposito inguinale, che le più pure del deposito WAT, contengono preadipociti che possono essere indotti ad adipociti beige funzionali. Anche in questo caso, è stata osservata in condizioni basali una bassa espressione di UCP-1, tuttavia, dopo il trattamento con Rosiglitazone (PPAR attivatore) le cellule beige incrementavano l'espressione di UCP-1 e mostravano molte caratteristiche degli adipociti bruni classici.

Inoltre, il consumo di ossigeno di queste cellule aumentava dopo il trattamento con noradrenalina. In conclusione, è chiaro che gli adipociti beige siano differenti dal punto di vista molecolare ed evolutivo rispetto agli adipociti bruni classici, tuttavia, dopo stimolazione queste cellule mostrano un potenziale termogenico comparabile.

4.5 Tipi di adipociti bruni negli esseri umani

Gli esseri umani hanno adipociti bruni, beige o di entrambi i tipi? Gli studi di misurazione del BAT tramite FDG-PET/TC (tomografia ad emissione di positroni utilizzando come marcatore il 18 fluoro-desossiglucosio) non possono determinare il tipo di tessuto adiposo, in quanto questo metodo misura solo l'assorbimento del glucosio. Tuttavia, biopsie della regione sovraclavicolare (45) e della regione peritiroidea (35) hanno dimostrato una miscela di entrambi i tipi di adipociti, bianco e bruno, mostrando che gli adipociti bruni si raggruppano in isole all'interno del WAT.

Queste isole di adipociti bruni erano localizzate in aree sovraclavicolari sottocutanee, nei depositi mediastino posteriore, retroperitoneale, intra-addominale e mesenterico.

È interessante notare inoltre come un recente studio che ha esaminato diversi depositi adiposi in 13 bambini post-mortem (di età compresa tra 3 giorni e 18 anni) ha dimostrato la presenza di adipociti beige dispersi all'interno WAT (46).

Nello studio di Wu et al. (43), sono state analizzate biopsie dal punto di vista dell'espressione genica del tessuto adiposo umano (sia WAT che BAT) nella zona sovraclavicolare, dove è stato trovato un incremento dell'espressione di mRNA codificante i geni caratteristici delle cellule beige (D137, Tmem26, Tbx1) e non del classico BAT murino (Ebf3, Eva1, Fbxo31) (Figura 7D). Inoltre, è stata eseguita un'immunoistochimica per identificare i marker delle proteine beige (CD137 e Tmem26), ed è risultata una colorazione positiva per entrambe le proteine nelle cellule che contenevano UCP-1. Quindi, il BAT umano della zona sovraclavicolare degli adulti ha caratteristiche beige. Nello studio di Sharp et al. (46), l'RNA totale è stato isolato dai depositi BAT di bambini post-mortem, ed è interessante notare che tutti i depositi BAT esprimevano geni selettivi per cellule beige e nessun gene selettivo per il classico BAT

(Figura 7D). Essi hanno scoperto che questi depositi BAT erano ben correlati con l'espressione dei geni del grasso bruno (ad esempio PGC1 α e PRDM16) e con geni delle cellule beige (ad esempio Cited1). Questi risultati indicano quindi che il BAT umano potrebbe essere addirittura composto principalmente da adipociti beige.

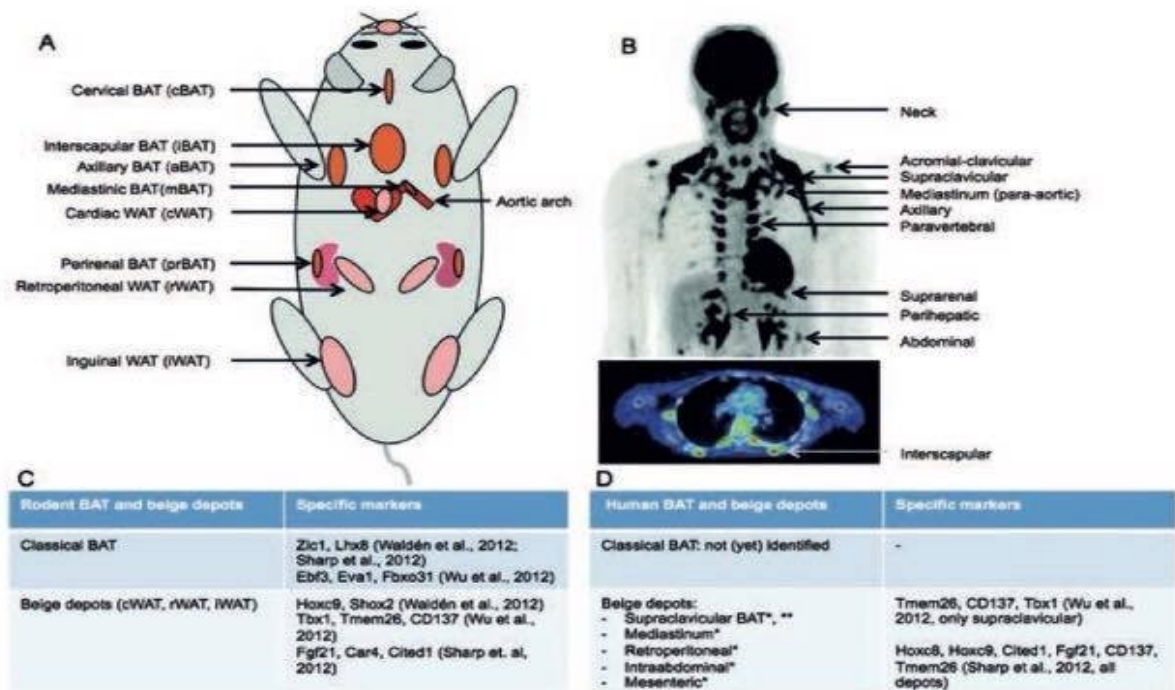


Immagine 7: Panoramica del tessuto adiposo bruno e dei depositi adiposi beige nei roditori e nell'uomo: (A) L'immagine mostra depositi BAT classici e depositi WAT suscettibili al processo di browning nel topo (depositi beige). (B) La parte superiore mostra un'immagine PET di un adulto umano magro durante l'assorbimento di 18fluoro-deossiglucosio (18F-FDG) nel BAT durante l'esposizione al freddo, mentre l'immagine in basso, captata con la tecnica PET/CT, dimostra un raro esempio di BAT interscapolare in un adulto magro. (C) Marcatori specifici sia del BAT che dei depositi beige nei topi. (D) Marcatori specifici del BAT umano determinati sulla base di marcatori trovati nei depositi beige dei topi.

5. FISIOLOGIA DEL BAT

In questo capitolo cercheremo di analizzare la fisiologia de BAT, come esso, attraverso il processo di termogenesi riesca a produrre calore e a bruciare grasso.

5.1 Produzione di calore

La produzione di calore mediata dal BAT, tramite il processo di termogenesi, avviene nei mitocondri degli adipociti bruni attraverso il processo di disaccoppiamento mitocondriale, che ha come protagonista la proteina di transmembrana UCP1 (32Kd).

La funzione del mitocondrio è di convertire l'energia dei carboidrati, grassi e proteine in adenosina trifosfato (ATP), che è la molecola energetica carrier che può essere utilizzata da tutti i processi cellulari della cellula che richiedono energia. Per formare ATP, l'enzima ATP sintetasi (V complesso della catena di trasporto degli elettroni) utilizza il gradiente protonico creato dalla catena di trasporto degli elettroni, nella membrana interna mitocondriale, per generare energia necessaria ad accoppiare un fosfato all'ADP e quindi formare ATP. La proteina UCP1, localizzata nella membrana interna mitocondriale, è in grado di disaccoppiare questo processo, facilitando il ritorno del flusso di protoni nella matrice mitocondriale ed impedendo così la produzione di ATP, ciò porta alla produzione di calore (immagine 8) (48). La proteina UCP1 è attivata dagli acidi grassi ed è inibita dai nucleotidi.

La termogenesi indotta dall'UCP1 (ad esempio, durante l'esposizione a freddo) è sotto il controllo dell'ipotalamo (48,49). I segnali periferici provenienti dai termorecettori della pelle e del nucleo sono integrati dall'ipotalamo.

4.2 Sistema nervoso simpatico e asse tiroideo

Il sistema nervoso simpatico (SNS) è fondamentale nel processo di termogenesi, quando la termogenesi è richiesta, il cervello esercita le sue azioni attraverso di esso.

Il SNS, in risposta ad uno stimolo di freddo captato dai termorecettori, stimola la termogenesi rilasciando il neurotrasmettitore noradrenalina (NE) a livello delle terminazioni nervose post-sinaptiche per innescare i recettori adrenergici ($\alpha 1$ -, $\alpha 2$ -, $\beta 1$ -,

β 2-, β 3-ARs), in particolare modo il recettore β 3, presente in maggior concentrazione negli adipociti bruni. Inoltre, stimola la midollare del surrene a rilasciare adrenalina e NE come ormoni (47). Nell'attivazione della termogenesi del BAT il sistema nervoso simpatico (SNS) ha un'importanza cruciale, mentre la capacità termogenica del BAT si ipotizza sia supportata anche da fattori endocrini, principalmente dell'attività tiroidea, con la produzione di triiodotironina (T3) e tiroxina (4). Dopo stimolazione simpatica, la NE è rilasciata a livello delle terminazioni nervose che attivano i recettori adrenergici disposti sugli adipociti bruni. Questo porta ad un aumento dei livelli di cAMP e all'attivazione della proteina chinasi A (PKA), che ha sia effetti acuti che cronici sul BAT. La risposta acuta della PKA è quella di aumentare la lipolisi, la lipasi ormone sensibile (HSL) agisce sui trigliceridi (TG), con conseguente aumento dei livelli di acidi grassi liberi (FFA), proprio questo processo di lipolisi è quello che provoca la perdita di peso.

Questi FFA sono essenziali per la dissipazione dell'energia mitocondriale, poiché sono utilizzati come substrati e sono necessari all'attivazione dell'UCP1 nella membrana mitocondriale interna. Questo effetto acuto aumenta l'attività dell'UCP1 in pochi secondi. Inoltre, una prolungata stimolazione del BAT per ore e giorni si tradurrà in una maggiore quantità di proteine UCP-1, maggiore biogenesi mitocondriale, ed sia iperplasia che ipertrofia del BAT (50). L'ormone tiroideo si ipotizza funzioni in modo sinergico con la NE e ciò è necessario per generare una completa risposta termogenica (51). Fondamentale è l'enzima iodotironina deiodinasi di tipo 2, che riesce a trasformare il proormone tiroxina inattivo (T4) nell'ormone bioattivo triiodotironina (T3).

In contrasto con la vasta conoscenza nei roditori, la regolamentazione e l'attivazione del BAT umano è ancora poco conosciuta. Per esempio, i pazienti con feocromocitoma, che hanno elevati livelli di catecolamine nel plasma a causa di un tumore secernente catecolamine dalla ghiandola surrenale, hanno alti tassi di assorbimento [18F]FDG allo stato basale del BAT che scompaiono dopo l'asportazione del tumore (52,53).

Così, elevati livelli sistemici di NE possono attivare il BAT umano. A sostegno di ciò, l'inibizione dei recettori beta-adrenergici con propranololo (betabloccante non selettivo) diminuisce l'assorbimento di [18F]FDG nel BAT sopraclavicolare a temperature ambientali (54,55). Biopsie di grasso umano del collo hanno mostrato una densa innervazione di

SNS (35) e una grande presenza di mRNA codificante recettori adrenergici β_3 in cellule UCP-1 positive (45). Infine, in uno studio, la rottura delle fibre simpatiche in un paziente con la sindrome di Horner (carezza di attività simpatica), aboliva completamente l'assorbimento di [18F]FDG del BAT (56). È stato inoltre dimostrato che livelli elevati di ormoni tiroidei sono in grado di aumentare il disaccoppiamento mitocondriale anche nel muscolo scheletrico (57,58). Anche se questi risultati possono suggerire che l'ormone tiroideo svolga un ruolo importante nell'attivazione del BAT, a differenza del SNS, sappiamo ancora troppo poco sul suo coinvolgimento.

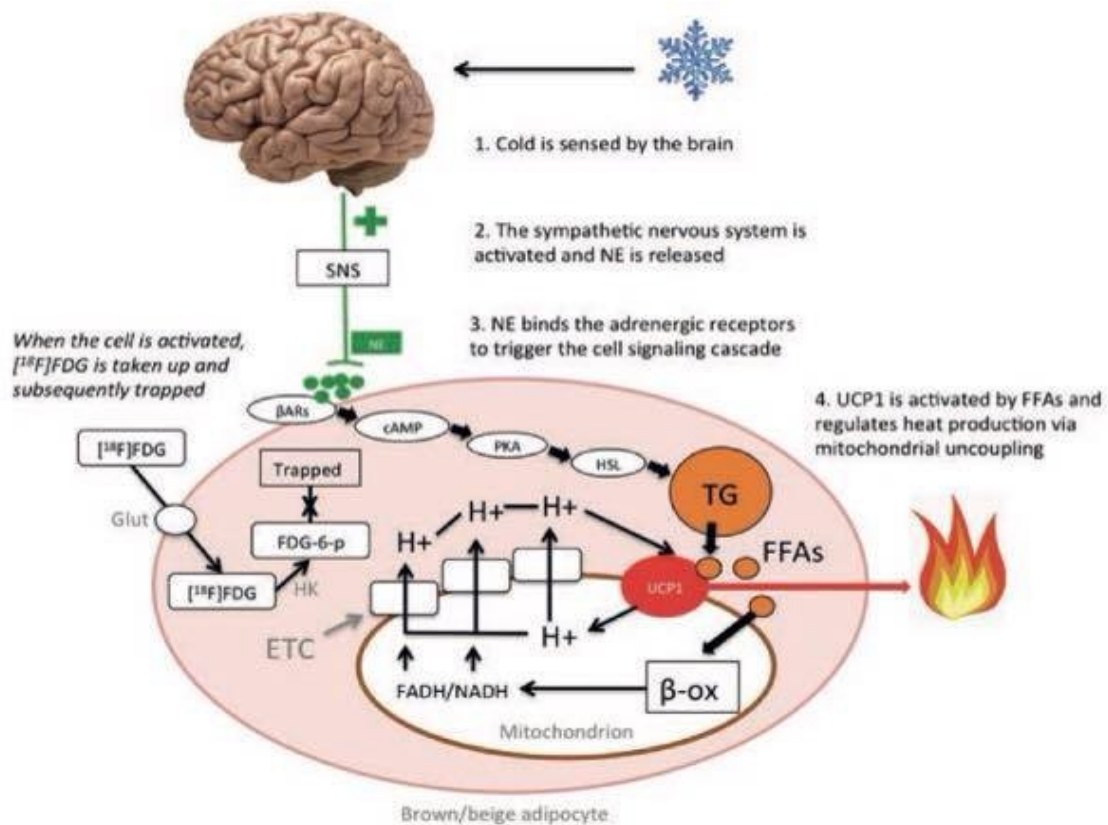


Immagine 8: Schema di attivazione simpatica degli adipociti bruni/beige: L'esposizione al freddo viene rilevata tramite termorecettori localizzati nella pelle e nel corpo che inviano le informazioni all'ipotalamo attraverso i nervi sensoriali. Se lo stimolo è sufficiente, il sistema nervoso simpatico (SNS) si attiva e rilascia noradrenalina (NE) nelle fessure sinaptiche. Successivamente la NE si lega ai recettori adrenergici e attiva l'adenosina monofosfato ciclico (cAMP), che a sua volta stimola la proteina chinasi A (PKA) attivando così la lipasi ormone-sensibile (HSL). HSL idrolizza i trigliceridi (TG) liberando in tal modo gli acidi grassi liberi (FFA) che attivano il disaccoppiamento della proteina 1 (UCP1) ed entrano nel mitocondrio per la beta-ossidazione (β -ox). Il NADH e il FADH sono utilizzati per i protoni (H^+), che sono pompate attraverso i complessi proteici (caselle bianche) della catena di trasporto degli elettroni (ETC), formando così una forza protonica che trasporta i protoni nuovamente al mitocondrio tramite l'UCP1. L'energia immagazzinata nella forza protonica viene poi rilasciata come calore (47). Inoltre, quando la cellula è attivata dal SNS, i trasportatori del glucosio (GLUT) occupano il tracciante del glucosio $[^{18}\text{F}]$ FDG. Il tracciante viene quindi fosforilato dall'esochinasi (HK) a glucosio-6 fosfato, che non viene ulteriormente metabolizzato ed intrappolato nella cellula. Questo può essere rilevato dal PET-scanner.

5.3 TERMOGENESI

5.3.1 Termogenesi indotta dal freddo

Il modo più semplice per attivare e ampliare il BAT è l'esposizione a basse temperature. Ad esempio, esponendo i roditori a basse temperature, non solo attiviamo il BAT nel breve termine, ma ne aumentiamo anche la massa totale nel lungo termine (59). Studi sull'esposizione al freddo in soggetti umani hanno dimostrato che l'attivazione e l'aumento della massa del BAT va di pari passo alla perdita di peso corporeo (60). Al contrario, l'esposizione a temperature più calde provoca diminuzione della termogenesi a causa di una riduzione dell'attività del SNS sul BAT (61). Come fa il freddo ad indurre l'attivazione del BAT? L'esposizione al freddo provoca il rilascio di catecolamine, come la NE dai terminali dei nervi simpatici che agiscono sui recettori B-adrenergici degli adipociti bruni (62). I Recettori B-adrenergici stimolano la via di segnalazione cAMP/PKA /CREB, che a sua volta induce la proliferazione di perossisomi, che attivano il recettore γ coattivator 1a (PGC1a), il principale regolatore della termogenesi UCP1-mediata (63). Il complesso cAMP/recettore B-adrenergico induce il PGC1a anche attraverso il p38MAPK, che attiva il PGC1a, rimuovendo la sua repressione P160-mediata, ed aumentando così la stabilità della proteina PGC1a (64). Nel complesso, l'espressione di PGC1a, nonché la sua attività trascrizionale è fortemente indotta in risposta all'esposizione al freddo. Il PGC1a a sua volta attiva una serie di fattori nucleari e non nucleari, funzionando da regolatore centrale di numerosi percorsi coinvolti nella biogenesi mitocondriale e nella termogenesi (66,67,68). Ad esempio, la PGC1a induce direttamente l'espressione di UCP1, coattiva l'espressione dei fattori respiratori nucleari 1 e 2 (NRF1) (NFR2) che regolano l'espressione di geni che codificano per subunità coinvolte nella catena respiratoria, e induce altri fattori indispensabili per la biogenesi mitocondriale e la fosforilazione ossidativa (69,70). Regolando tutti questi fattori, PGC1a ha un forte impatto su vari aspetti del metabolismo energetico mitocondriale. Di conseguenza, l'eliminazione di PGC1a nei topi si traduce in una termogenesi alterata in risposta all'esposizione a freddo (71,72). Al contrario, un'espressione indotta di PGC1a è

sufficiente a indurre una serie di geni coinvolti nella biogenesi mitocondriale e nella termogenesi, incluso l'UCP1 negli adipociti bianchi (66,73), suggerendo un ruolo centrale della PGC1a nella termogenesi.

5.3.2 Il ruolo del BAT nella termogenesi facoltativa indotta dalla dieta

E' ben noto che nei roditori il BAT svolge un ruolo importante nella termogenesi non da brivido (NST) indotta dal freddo. La termogenesi "non da brivido" rappresenta un aumento della produzione di calore non associata alla contrazione muscolare ed è dovuta alla maggiore attività del sistema nervoso simpatico collegato a particolari tessuti, ovvero al BAT, il muscolo scheletrico, e il fegato nei mammiferi. Un'alterazione del BAT comporta elevata intolleranza al freddo in questi animali (62).

Poco si sa, invece, circa il ruolo del BAT nella termogenesi indotta dalla dieta (DIT). La DIT può essere divisa in due parti, una parte obbligatoria e una facoltativa. La parte obbligatoria del dispendio energetico è dovuta all'assunzione e all'assorbimento del cibo (74), mentre la facoltativa probabilmente coinvolge il disaccoppiamento mitocondriale (75).

Rothwell & Stock nel 1978 nei loro studi hanno dimostrato che, una sovralimentazione di settimane con diete povere di nutrienti in roditori porta ad un aumento di peso minore di quello previsto se confrontato con il loro apporto calorico (24). Questa bassa efficienza metabolica era accompagnata da un aumento di attività del BAT. Oltre a questa forma adattiva di DIT, diversi studi nei ratti hanno dimostrato che il BAT è attivato anche dopo un singolo pasto (77,78), suggerendo la capacità di poter bruciare un eccessivo apporto calorico nella fase postprandiale. Tuttavia, Feldmann et al. hanno dimostrato che, topi che non avevano UCP1, svilupparono obesità in condizioni termo neutrale, e questo era dovuto all'abolizione della DIT (79).

Studi sulla sovralimentazione dell'uomo hanno dimostrato una grande variazione di aumento di peso (80). Per esempio, nella pubblicazione di Bouchard et al (81) viene dimostrato che l'eccessiva assunzione energetica di 353 MJ in 100 giorni induce un aumento di peso che va da 4,3 a 13,3 kg. L'apporto di energia è stato standardizzato, il

che suggerisce che la variazione era, oltre alle differenze di attività fisica, dovuta alla variazione di DIT. Nel 1999, Stock fece una rianalisi di dodici studi sulla sovralimentazione umana e dimostrò che una sovralimentazione con una dieta a basso contenuto proteico determina una minore efficienza metabolica, ipotizzando che questo fosse il risultato di un aumento della DIT (82). Infine, Wijers et al (2007) dimostrarono che la termogenesi indotta dal freddo era correlata con la DIT, suggerendo meccanismi analoghi alla base (83).

Complessivamente questi risultati suggeriscono che il BAT possa essere rilevante in entrambi i 2 processi di NST e DIT, con il ruolo cruciale del SNS nel mediare questi 2 processi.

6 IL SECRETOMA DEL GRASSO BRUNO: FUNZIONI AUTOCRINE, PARACRINE ED ENDOCRINE

Il WAT è noto per rilasciare importanti fattori endocrini come la leptina e l'adiponectina (83,84). Il repertorio di proteine secrete dal grasso bruno e beige e le loro funzioni fisiologiche non sono mai state completamente definite. Studi precedenti hanno dimostrato che il BAT sintetizza diverse molecole segnalatrici che alterano la fisiologia metabolica attraverso meccanismi autocrini, paracrini ed endocrini. Molecole biologicamente attive, come ad esempio ormoni tiroidei e metaboliti lipidici possono agire localmente per modulare lo sviluppo del BAT e la termogenesi, mentre i fattori secreti da esso possono entrare in circolazione ed esercitare effetti metabolici in altri tessuti. Recenti analisi sul profilo del secretoma hanno rivelato una serie distinta di fattori secreti dal BAT (85). Mentre l'esistenza di una specifica proteina secreta dal BAT sembra improbabile, sembra esistere una lista crescente di fattori extracellulari che, in risposta all'attivazione termogenica, vengono secreti. In questa sezione, riassumiamo diversi fattori proteici e non proteici prodotti dal BAT e discutiamo il loro potenziale ruolo nell'omeostasi e nella segnalazione metabolica.

6.1 La Neoregolina (Nrg4)

La Nrg4 è stata recentemente identificata come un fattore secreto dal BAT durante la differenziazione degli adipociti marroni (85).

L'espressione della NRG4 è fortemente indotta durante l'adipogenesi bruna ed aumenta ulteriormente in seguito all'attivazione dei recettori adrenergici degli adipociti bruni (85,86). L'esposizione al freddo acuto stimola l'espressione di NRG4 nel BAT, mentre una lunga acclimazione al freddo eleva i livelli di mRNA NRG4 sia nel BAT che nel WAT inguinale. NRG4 appartiene alla famiglia dei fattori di crescita epidermici (EGF), ligandi extracellulari che si legano e attivano i recettori tirosin-chinasici ErbB3 e ErbB4 (87,88). NRG4 è sintetizzata come una proteina di membrana che contiene un dominio *EGF-like* responsabile del legame con il recettore. Era inaspettato il fatto che la Nrg4 sia comunque largamente dispensabile al BAT per il proprio sviluppo e funzione (85).

Infatti, i topi privi NRG4 sono identici ai corrispondenti controlli di tipo selvatico nella difesa contro l'ipotermia causata da esposizione al freddo. Questi risultati suggeriscono che, nonostante l'elevata espressione nel BAT, NRG4 non è prettamente richiesta per la termogenesi indotta dal freddo. L'espressione di Nrg4 da parte del tessuto adiposo è ridotta in diversi modelli di obesità murina ed è correlata negativamente con la massa di grasso corporeo negli esseri umani, suggerendo quindi che l'insufficienza di NRG4 possa essere una caratteristica comune nei casi di obesità. Il significato del segnale della NRG4 nei casi obesi è stato dimostrato utilizzando topi NRG4 knockout e transgenici. In questi, la carenza di NRG4 aggravava l'obesità indotta dalla dieta e i disordini metabolici nei topi, mentre l'espressione transgenica di NRG4 nei tessuti adiposi aveva effetti opposti. A livello meccanicistico, NRG4 si lega ed attiva i recettori tirosin chinasici ErbB3 e ErbB4, che portano alla traduzione del segnale e all'attivazione del fattore di trascrizione (STAT)5 negli epatociti. Quest'ultimo attenua l'induzione di nuova lipogenesi in risposta all'attivazione del recettore epatico X (LXR).

Studi precedenti hanno dimostrato che NRG4 stimola la crescita dei neuriti in colture cellulari PC-21 (86,89), aumentando la possibilità che questo fattore possa agire su tessuti extraepatici per esercitare i propri effetti metabolici.

6.2 Fattore di crescita dei fibroblasti (FGF)21

FGF21 è un fattore endocrino prodotto da diversi tessuti, tra cui il fegato, il BAT e il muscolo scheletrico (90,91). Mentre il fegato fornisce una fonte importante di FGF21 nella circolazione, il grasso bruno, in particolari condizioni come ad esempio l'esposizione al freddo, contribuisce anche al FGF21 plasmatico (92,90). Prolungate esposizioni al freddo incrementano marcatamente l'espressione dell'mRNA FGF21 nel BAT dei roditori, mentre la sua espressione nel fegato si riduce. Un'analisi sul flusso arteriovenoso ha rivelato che il FGF21 rilasciato dal BAT attivo entra nella circolazione e contribuisce all'aumento del FGF21 plasmatico in seguito ad un'esposizione al freddo (90). Un simile aumento del livello di FGF21 indotto dal freddo è stato osservato anche negli esseri umani (93). Il FGF21 è noto per esercitare effetti pleiotropici sul metabolismo glucidico e lipidico, in particolare la β -ossidazione degli acidi grassi epatici e la gluconeogenesi durante il digiuno (94,95). La somministrazione sistemica di FGF21 corregge l'obesità nei topi e migliora l'omeostasi metabolica negli esseri umani (96,97). Studi recenti hanno dimostrato che FGF21 stimola il programma termogenico negli adipociti bruni e promuove il browning degli adipociti bianchi (93,98). Inoltre, il FGF21 regola indirettamente la termogenesi del grasso bruno attraverso un'azione sul sistema nervoso centrale che stimola la connessione fra SNS e tessuto adiposo (99). Pertanto, il rilascio inducibile di FGF21 sta emergendo come un segnale molecolare importante che incide sul metabolismo sistemico e sulla termogenesi.

4.3 Fattori di crescita dell'endotelio vascolare (VEGF)

I VEGF sono ampiamente distribuiti tra i vari tessuti ed espressi ad alti livelli nel BAT come fattore di crescita dell'endotelio vascolare A (VEGFA) e fattore di crescita dell'endotelio vascolare B (VEGFB) (100). Stress acuto da freddo aumenta in modo significativo l'espressione di VEGFA nel BAT, ma non di VEGFB (101,102). L'espressione indotta dal freddo di VEGFA è mediata attraverso la via B-adrenergica e può essere dimostrato in vitro trattando adipociti bruni differenziati con noradrenalina. Il VEGFA derivato dal BAT ha molte funzioni endocrine e paracrine, in quanto stimola direttamente la proliferazione dei progenitori degli adipociti e delle circostanti cellule

endoteliali vascolari (102,103). I topi transgenici *fat-specific VEGFA* sono protetti da obesità indotta dalla dieta e da disturbi metabolici come risultato di effetti pleiotropici indotti dai segnali del VEGF, inclusa la stimolazione dell'angiogenesi, la termogenesi del BAT e la modulazione della polarizzazione dei macrofagi (105).

La sovraespressione del VEGFA nel BAT aumenta la termogenesi nei topi solamente durante l'esposizione cronica al freddo, ed in parte migliora la disfunzione metabolica associata con obesità indotta dalla dieta (106). Tuttavia, i livelli plasmatici di VEGFA rimangono invariati nei topi transgenici, il che suggerisce, che il contributo di VEGFA sistemico da parte del tessuto adiposo bruno sia molto modesto (105). Similmente al VEGFA, il VEGFB esercita effetti locali sui tessuti adiposi, stimolando in parte la proliferazione delle cellule endoteliali e l'assorbimento degli acidi grassi (107,108).

4.4 Proteine ossee morfogeniche (BMP)

Le BMP sono membri della famiglia dei fattori di crescita trasformanti (TGF)B, superfamiglia di proteine di segnale extracellulari inizialmente trovate nella regolazione, formazione e riparazione di ossa e cartilagini (109). Diversi membri delle BMP sono impiegati nella regolazione della differenziazione adipocitaria e nella spesa energetica (110). Il trattamento con BMP7 aumenta l'espressione genica di UCP1, la biogenesi mitocondriale durante la differenziazione degli adipociti bruni e promuove la differenziazione dei progenitori mesenchimali inducendoli verso la linea degli adipociti bruni (111). Le BMP7 incrementano anche la formazione degli adipociti beige derivanti dal muscolo scheletrico e dal grasso bianco sottocutaneo (112). Tuttavia, le risorse cellulari di BMP7 all'interno dei tessuti adiposi restano da chiarire. BMP4 inoltre promuove l'adipogenesi e la formazione di adipociti beige (113). L'espressione transgenica di BMP4 aumenta il dispendio energetico e protegge i topi dall'obesità indotta dalla dieta, mentre i topi privi di BMP4 sviluppano più facilmente un'insulino-resistenza. In accordo con il ruolo diretto delle BMP sullo sviluppo del grasso bruno, i topi privi del recettore di tipo 1A BMP hanno una massa grassa bruna significativamente più ridotta, che è associata all'attivazione compensatoria dell'imbrunimento del grasso bianco (114). Al di là degli effetti locali delle BMP sul grasso bruno, il BMP8b sembra

agire anche sull'ipotalamo per regolare il dispendio energetico (115). In questo caso, BMP8b potrebbe avere un ruolo importante nel mediare i feedback tra tessuto adiposo e sistema nervoso simpatico.

4.5 Interleuchina (IL)-6

IL-6 è una citochina prodotta da molteplici tessuti del corpo, compresi i tessuti adiposi, muscolo scheletrico e cellule del sistema immunitario. Al di là del suo ruolo nella risposta infiammatoria, IL-6 esercita effetti profondi e pleiotropici sul metabolismo del glucosio e sul bilancio energetico (116). I topi privi di IL-6 sviluppano obesità e intolleranza al glucosio indotta dalla dieta. I livelli plasmatici di IL-6 incrementano notevolmente durante l'esercizio, quindi, IL-6 si propone come un'importante miochina che contribuisce ai benefici metabolici dell'attività fisica. È interessante notare che l'immunomodulatore antiinfiammatorio Amlexanox, un inibitore della serina/treonina protein chinasi *tank-binding* 1 (TBK1) e del fattore nucleare factor-kB (Ikk), induce l'espressione del gene IL-6 nel tessuto adiposo sottocutaneo ed incrementa fortemente i livelli plasmatici di IL-6 (117,118).

Un'attivazione cronica del segnale IL-6 promuove l'imbrunimento del grasso bianco e incrementa la spesa energetica nel contesto della cachessia associata al cancro (119). Recenti studi hanno definito l'IL-6 derivato dal BAT come un mediatore chiave nel miglioramento dell'omeostasi del glucosio e nella sensibilità all'insulina in seguito a trapianto del grasso bruno (92). Sarebbe di grande interesse stabilire il significato della IL-6 rilasciata dal tessuto adiposo bruno nella regolazione fisiologica del metabolismo omeostatico.

4.6 Fattore di crescita nervosa (NGF)

NGF è un fattore di crescita che promuove la sopravvivenza e la proliferazione dei neuroni, compresi i neuroni sensoriali periferici e i simpatici (120). Ci sono due tipi di recettori strutturalmente diversi individuati per il NGF, il recettore ad alta affinità, tirosin chinasi A (TrkA) e il recettore a bassa affinità, neurotrofina p75 (121,123).

Tramite il legame con TrkA, NGF attiva le vie di segnale PI3K/AKT e Ras/MAPK e promuove la sopravvivenza e la proliferazione delle cellule.

È interessante notare che il NGF è prodotto insieme con il suo recettore p75 dal grasso bruno e anche dagli adipociti bruni in coltura (123). La sua espressione è ridotta in risposta all'esposizione al freddo o al trattamento con NE (124). I segnali di NGF passano attraverso il TrkA per promuovere la crescita degli assoni simpatici e l'innervazione di tessuti bersaglio (125,126). E' possibile che la segnalazione NGF possa aumentare o rimodellare l'innervazione simpatica del tessuto adiposo bruno.

4.7 L'adiponectina

L'adiponectina fu inizialmente identificata come un fattore secreto rilasciato dagli adipociti bianchi, per poi risultare essere espresso anche dal BAT (127,128). L'espressione di adiponectina nel WAT e le sue concentrazioni plasmatiche sono correlate negativamente con l'obesità. Nei topi, la carenza di adiponectina aggrava l'insulino resistenza indotta dalla dieta (129), mentre un incremento acuto dei livelli circolanti di adiponectina diminuisce i livelli di produzione epatica di glucosio (130). Oltre al suo ruolo nel metabolismo epatico, l'adiponectina stimola l'ossidazione degli acidi grassi, l'assorbimento di glucosio nel muscolo scheletrico (131) e regola il dispendio energetico agendo sull'ipotalamo (132). Uno studio recente ha dimostrato che il tessuto adiposo del midollo osseo è una delle principali fonti di adiponectina circolante durante la restrizione calorica (133), e come tale, il contributo del grasso bruno alla segnalazione endocrina da parte dell'adiponectina è probabilmente minore se comparata ad altri depositi di grasso.

4.8 Ormoni e metaboliti

Gli adipociti bruni sono noti anche per la produzione di molecole biologicamente attive che modulano la termogenesi, come l'ormone tiroideo (T3, triiodotironina), la retinaldeide e l'acido retinoico. L'ormone tiroideo è stato riconosciuto come un importante regolatore della termogenesi. L'espressione della tiroxina 50-deiodinasi di tipo 2 (DIO2), che converte la tiroxina a T3, è limitata e fortemente indotta durante

l'attivazione del BAT (134). Topi con un'ablazione targata del DIO2 soffrono di ipotermia se esposti al freddo al freddo, nonostante normali livelli di T3 plasmatici, suggerendo che il T3 derivato dal BAT agisca principalmente a livello locale per stimolare la termogenesi (135). Sia la retinaldeide che l'acido retinoico agiscono da agonisti per il recettore dell'acido retinoico e sembrano modulare la termogenesi del BAT attraverso i loro effetti sullo sviluppo del grasso bruno e l'espressione dei geni termogenici (136). Gli adipociti bruni esprimono anche la 11 β -idrossisteroide deidrogenasi-1, un enzima responsabile della conversione del cortisone biologicamente inerte a cortisolo attivo (137), suggerendo che i glucocorticoidi prodotti per via endogena possano regolare la biologia del tessuto adiposo bruno attraverso un meccanismo autocrino. L'esposizione al freddo stimola fortemente la lipolisi del tessuto adiposo, con conseguente aumento del rilascio di acidi grassi dagli adipociti. Oltre a fornire un'importante fonte di combustibile, gli acidi grassi liberi impegnano una classe unica di recettori accoppiati a proteine G, chiamati recettori di acidi grassi liberi (FFARs) (138,139). L'espressione dei FFAR è altamente tessuto specifica, in tal modo, non si può escludere che l'attivazione dei FFARs da parte degli acidi grassi liberi susciti risposte metaboliche pleiotropiche in tessuti differenti. Tra gli acidi grassi liberati dagli adipociti, gli esteri degli acidi grassi ramificati rappresentano una nuova classe di lipidi biologicamente attivi che migliorano la tolleranza al glucosio e riducono l'infiammazione del tessuto adiposo nell'obesità (140). Il tessuto adiposo bruno rilascia notevoli quantità di lattato che deriva dalla glicolisi che avviene durante l'esposizione al freddo. Studi recenti hanno dimostrato che il tessuto adiposo esprime alti livelli del recettore 81 accoppiato a proteine G (Gpr81), un recettore affine al lattato, e che l'attivazione del Gpr81 da parte del lattato attenua i segnali dei recettori adrenergici e inibisce la lipolisi negli adipociti (141). Pertanto, è probabile che, lattato rilasciato dal grasso bruno durante la termogenesi indotta dal freddo possa determinare un freno della lipolisi in risposta all'attivazione del recettore adrenergico.

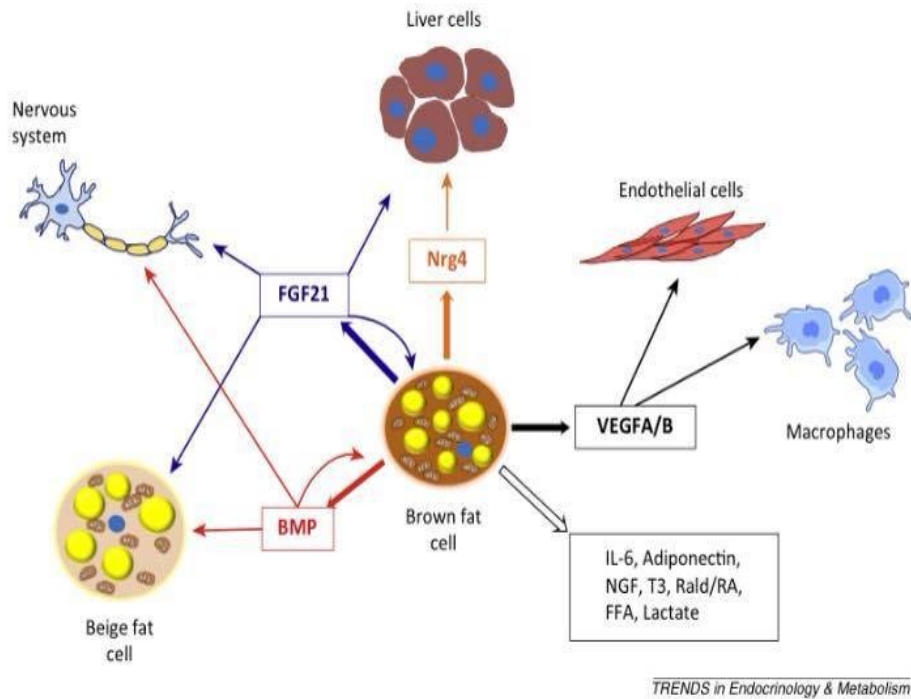


Immagine 9: I principali fattori secreti dall'adipocita bruno

7 ATTIVATORI BAT CONOSCIUTI NELL'UOMO

Dalla scoperta del BAT funzionale negli esseri umani adulti, alcuni studi hanno esaminato le possibili strategie per attivarlo, al fine di avere effetti metabolici per far fronte all'obesità e alle complicanze relative, di seguito cercherò di descrivere le principali strategie studiate da molti gruppi di ricerca

7.1 Esposizione al freddo e acclimazione

E' noto da studi su animali che un'esposizione a lungo termine porta ad un aumento di adipociti esprimenti UCP1 in entrambi i depositi BAT e WAT (beige). Attualmente è la strategia che ha raccolto più studi di tutte, sono stati fatti molti esperimenti sull'esposizione al freddo.

Uno studio sull'acclimatazione al freddo nell'uomo, già nel 1961, dimostrò che un'esposizione al freddo a lungo termine è efficace per aumentare la termogenesi, con

una diminuzione dei brividi, indicando un ruolo potenziale per il BAT (142).

Studi con la tecnica PET hanno dimostrato che in seguito ad acclimazioni fredde l'assorbimento di $(18)\text{FDG}$ nel BAT, proporzionale alla quantità di BAT, può incrementare di 10 volte (143).

Studi recenti mostrano che, anche un'esposizione al freddo di 2 ore ad una temperatura di 19°C è sufficiente ad attivare il BAT preesistente.

Infine, in tre diversi studi, sottoponendo individui ad un'esposizione al freddo ($10\text{-}17^{\circ}\text{C}$) dalle 2 alle 6 ore al giorno, dai 10 giorni alle 6 settimane, i risultati erano simili e tutti mostravano un significativo incremento della quantità e attività del BAT, fino ad un aumento del 45%, anche in individui che avevano un BAT basale trascurabile.

L'esposizione al freddo aumenta l'attività del BAT tramite il SNS, come mostrato da un aumento dei livelli plasmatici di NE durante l'esposizione al freddo (143,144). Sarebbe possibile in un futuro prescrivere terapie di esposizione al freddo per indurre la termogenesi e trattare l'obesità?

Anche se è noto da tempo che il freddo può efficacemente indurre la termogenesi, finora non sono ancora stati riportati casi di procedure terapeutiche di esposizione al freddo, e potrebbero essere molto difficile da attuare per il trattamento dell'obesità a causa della nostra incapacità di tollerare tali condizioni di freddo per periodi prolungati di tempo, mentre brevi periodi tollerabili di esposizione al freddo potrebbero non essere sufficienti per ottenere una significativa attivazione del BAT. Inoltre, anche se da un lato l'esposizione al freddo potrebbe bruciare un'elevata quantità di grasso, dall'altro andremmo in contro a molte complicanze mediche impreviste, come stress, l'ipotermia, cambiamenti della pressione sanguigna e problemi respiratori.

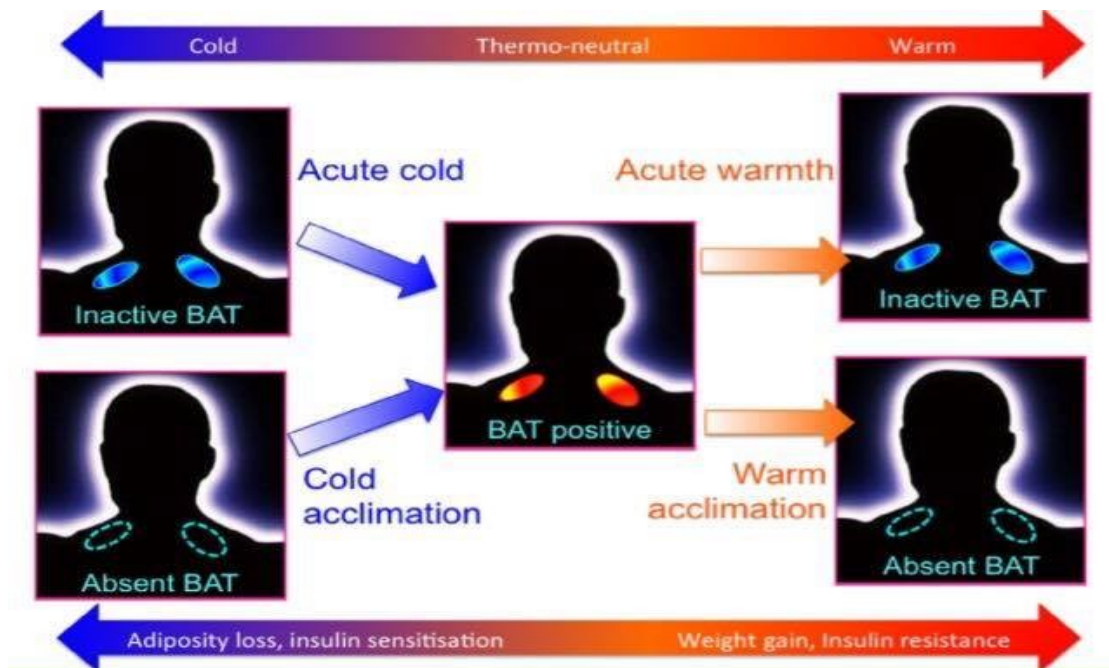


Immagine 10: *Diagramma schematico della relazione tra la temperatura, il BAT e il metabolismo. Temperature fredde (2 ore a 19 C°) attivano il BAT preesistente come osservato con PET/CT, mentre acclimazioni fredde (4 settimane a 19 C° durante la notte) ne aumentano la quantità, anche fra individui che non ne hanno. Al contrario, esposizione al caldo (2 ore a 24-27 C°) silenziano l'attività del BAT, mentre acclimazioni (4 settimane a 27 C°) diminuiscono la quantità del BAT. Una soppressione del BAT è associata ad un incremento di insulino resistenza in individui che avevano precedentemente un'elevata quantità di BAT.*

7.2 Sistema nervoso simpatico

7.2.1 E' possibile evitare l'esposizione al freddo ed attivare direttamente il recettore B-adrenergico per indurre la termogenesi BAT-mediata?

Studi su roditori e successivamente su esseri umani hanno rivelato che aumentando la stimolazione β -adrenergica viene indotta ed incrementata la termogenesi (145,146).

Effettivamente nei roditori, agonisti del recettore B3-adrenergico (B3-AR) sono stati dimostrati capaci di indurre la termogenesi e aumentare il tasso metabolico (147). Questi agonisti B3-AR sono risultati in grado di aumentare il dispendio energetico e ciò

sembrava essere benefico nel contrastare l'obesità e il diabete nei roditori. Tuttavia, utilizzare agonisti B3-AR per aumentare la termogenesi BAT-mediata negli esseri umani non ha avuto lo stesso successo, a causa del bassissimo livello di espressione dei recettori B3-AR negli adipociti bruni umani (148). Pertanto, questi agonisti non erano in grado di indurre la stessa risposta termogenica desiderata nel BAT umano, ma addirittura causavano diversi effetti indesiderati (148). In alternativa, i tentativi di utilizzare simpaticomimetici non specifici, come efedrina e sibutramina per indurre la termogenesi hanno provocato gravi effetti collaterali, come ictus e complicanze cardiovascolari, a causa di un'azione non specifica dovuta all'ampio spettro d'azione adrenergico (149).

7.2.2 Tre studi con simpaticomimetici: Isoprenalina ed efedrina

Recentemente tre studi hanno misurato l'effetto della stimolazione adrenergica sull'attività del BAT negli adulti umani. Il primo studio ha misurato l'attività del BAT negli adulti magri durante l'infusione di isoprenalina (β -agonista adrenergico non selettivo) e confrontata con l'esposizione al freddo (144). Sorprendentemente, nove soggetti su dieci non hanno mostrato alcuna attività del BAT durante l'infusione di isoprenalina, mentre l'esposizione al freddo aumentava l'attività del BAT in tutti i soggetti. Il secondo studio effettuato da Cypess et al. ha studiato gli effetti dell'efedrina (1 mg/kg) sull'attività del BAT e gli ha confrontati con l'esposizione al freddo, arrivando alla conclusione che l'efedrina non comporta l'attività del BAT, mentre l'esposizione al freddo attiva il BAT in tutti i soggetti (152). Tuttavia, il terzo studio, utilizzando alte dosi di efedrina, maggiori rispetto agli studi precedenti (2,5 mg / kg), ha mostrato un aumento di attività del BAT in sei su nove adulti umani magri, ma non in soggetti obesi (153).

Questo è il primo studio che ha mostrato che il trattamento farmacologico del BAT negli esseri umani è possibile. Il livello di attività del BAT era comunque 4 volte inferiore a quello osservato durante l'esposizione al freddo. La spiegazione della mancanza di un effetto di stimolazione adrenergica sistemica sul BAT è probabilmente dovuta al fatto che le concentrazioni raggiunte dalla NE sulla superficie cellulare adipocitaria bruna durante la stimolazione centrale (ad esempio l'esposizione a freddo) siano superiori rispetto alle concentrazioni dei simpaticomimetici utilizzati in questi studi. Quindi, la stimolazione

farmacologica del BAT è possibile, tuttavia sono necessari alti dosaggi e una forte stimolazione agonista simpatica ovviamente ha un effetto a livello cardiovascolare indesiderato a causa dell'ampio spettro d'azione dei simpaticomimetici. Tutti e tre gli studi osservano un aumento della pressione sanguigna ed un incremento della frequenza cardiaca, con un maggiore aumento nella pressione sanguigna sistolica (45 mmHg).

Pertanto, nello sviluppare approcci volti ad attivare farmacologicamente il BAT potrebbero essere vincenti strategie che bypassano la stimolazione b-adrenergica ed attivano direttamente il PGC1a nel BAT.

Tuttavia, lo sviluppo di un tale approccio è difficilmente possibile, perché il PGC1a oltre a essere il regolatore centrale della termogenesi UCP1 mediata nel BAT è anche coinvolto profondamente in una serie di altri meccanismi cellulari quali il metabolismo di glucosio, il metabolismo degli acidi grassi, la biogenesi mitocondriale e il metabolismo ossidativo in altri organi come i muscoli, il fegato, il cuore e il cervello (150,151). Pertanto, sarà estremamente difficile identificare un agente farmacologico che agisce e attiva solo il PGC1a presente nel BAT senza causare effetti collaterali, in quanto esso svolge un ruolo attivo in altri organi quali il fegato e muscoli.

7.3 Regolatori molecolari

Un approccio alternativo potrebbe essere quello di identificare i regolatori molecolari specifici del PGC1a e dell'UCP1 nel BAT ed agire su di essi per modulare la termogenesi del BAT. A causa del loro ruolo critico nella termogenesi, l'espressione e l'attività del PGC1a e dell'UCP1 sono controllati con precisione da un numero di proteine che regolano sia positivamente che negativamente, come acceleratori o freni, la loro azione, controllando indirettamente la termogenesi.

Una serie di fattori, quali: FOXC2, SRC1, CREB, SIRT3, Erra, e p38MAPK sono stati identificati come regolatori positivi del PGC1a (154). La delezione specifica di questi fattori nei topi ha dimostrato alterare il processo di termogenesi PGC1a/UCP1-mediato e ridurre il dispendio energetico, dimostrando che questi topi sono inclini all'obesità indotta dalla dieta ed indicando l'importanza di questi fattori nell'attivazione della termogenesi (155). Pertanto, invece di agire direttamente su PGC1a, l'attivazione farmacologica di

questi fattori potrebbe servire come approccio alternativo per migliorare la termogenesi, dal momento che i loro effetti sono mediati attraverso la PGC1 α . Al contrario, fattori come pRB, p107, RIP140, Cidea, LXRA, ID, TWIST1, e TRPV4 sono stati definiti regolatori negativi della PGC1 α /UCP1 e quindi capaci di sopprimere la termogenesi BAT-associata. La delezione specifica di questi fattori nei topi ha determinato una maggiore attivazione ed espansione del BAT con un aumento della spesa energetica, con topi maggiormente protetti dall'obesità indotta dalla dieta e dall'età (156,157,158). Pertanto, l'intervento farmacologico di questi fattori può funzionare come approccio alternativo per migliorare la termogenesi mediata dal BAT. Tuttavia, purtroppo, la maggior parte di questi regolatori positivi e negativi non sono solamente espressi nel BAT ed in funzione della termogenesi PGC1/UCP1-mediata, ma sono anche espressi in altri tessuti e partecipano ad una vasta gamma di processi cellulari. Pertanto, strategie volte ad indirizzare specificamente uno o più di questi fattori nel modulare la termogenesi del BAT potrebbero essere estremamente impegnative a causa di molti effetti collaterali che potrebbero verificarsi in altri organi.

7.4 Capsinoidi

Un'altra strategia per attivare il BAT attraverso il SNS è tramite l'assunzione di alcuni componenti alimentari.

Uno di questi componenti sono i capsinoidi (analoghi non pungenti della capsaicina), composto attivo trovato nel peperoncino noto per aumentare l'attività del BAT nei roditori (159), e il metabolismo basale negli esseri umani (160). Un recente studio ha dimostrato che i capsinoidi potrebbero essere efficaci nell'attivazione del BAT umano (161) senza indurre effetti collaterali indesiderati. Anche se l'effetto dell'assunzione dei capsinoidi sull'attività del BAT non è stato misurato direttamente, è stato dimostrato che, soggetti con BAT attivo (basato sul freddo PET-CT) spendono una maggior quantità di energia durante l'assunzione di capsinoidi, rispetto a soggetti senza BAT. Il meccanismo proposto è che i capsinoidi riescano ad attivare il Canale TRP1 che si trova nel tratto digestivo superiore e che questo porti ad un incremento di attività del nervo simpatico nei confronti del BAT, come dimostrato nel BAT interscapolare dei ratti (162). E' necessaria

una prova diretta dell'effetto dei capsinoidi sul BAT negli esseri umani per trarre conclusioni definitive. Infine, se effettivamente la somministrazione a lungo termine di questi composti bioattivi possa indurre la perdita di peso tramite il BAT, rimane da dimostrare.

7.5 Insulina

Un altro modo per aumentare l'assorbimento del glucosio nel BAT è attraverso l'insulina (163). In un importante studio, l'assorbimento e la perfusione di glucosio nel BAT sono state comparate durante l'infusione di insulina e l'esposizione a temperature fredde, dimostrando che l'insulina aumenta l'assorbimento di [18F]FDG nel BAT a livelli simili del muscolo scheletrico e a livelli più alti del WAT. Questo molto probabilmente a causa dell'elevata espressione di GLUT4 (trasportatore di glucosio) nel BAT rispetto al WAT. Tuttavia, l'aumento di assorbimento di [18F]FDG nel BAT non era accompagnato da un aumento della perfusione, suggerendo che il glucosio viene trasportato esclusivamente nel BAT senza termogenesi concomitante che prende luogo.

Dal momento che l'insulina porta ad un alto assorbimento di glucosio nel BAT, sarebbe interessante misurare se il BAT sia coinvolto nell'assorbimento del glucosio e in una possibile termogenesi nel momento postprandiale. E' noto da studi sui roditori che i pasti singoli possono attivare il BAT, e questo potrebbe essere dovuto al rilascio di insulina (62).

7.6 Browning del WAT

Un'altra strategia sotto studio è quella di colpire specificatamente i preadipociti e i progenitori adiposi del WAT, ed indurli a differenziarsi in cellule beige attraverso un processo chiamato *browning* del WAT. Ciò potenzialmente aumenterebbe la quantità di adipociti beige, migliorando il dispendio energetico e riducendo il peso corporeo. In risposta a vari stimoli, quali il freddo, agonisti B-adrenergici e agonisti PPAR γ , sono state rilevati depositi di adipociti beige, in particolare nel WAT inguinale (164). Questi adipociti sono chiamati "Beige" o "Brite" e, come gli adipociti bruni, hanno elevato contenuto mitocondriale ed esprimono geni termogenici come PGC1 α e UCP1.

Sebbene anche gli adipociti beige partecipino alla termogenesi in modo simile agli adipociti bruni, la loro origine precisa non è del tutto nota. Studi iniziali hanno suggerito che gli adipociti bianchi maturi e differenziati del WAT possono transdifferenziarsi in adipociti beige quando stimolati dal freddo o da agonisti B₃-adrenergici (165). Tuttavia, successivi studi hanno rivelato che gli adipociti beige non nascono da adipociti bianchi differenziati, ma derivano da cellule progenitrici adipose (166). I progenitori adiposi del WAT si ritiene siano bipotenziali e in condizioni di eccessivo afflusso di energia, si differenzino in adipociti bianchi, mentre, in risposta al freddo o ad uno stimolo B-adrenergico, si differenzino in adipociti beige (167). Come risultato, i geni termogenici dell'UCP1 e dell'PGC1 α sono espressi negli adipociti beige solo quando vi è uno stimolo esterno, come l'esposizione al freddo o agonisti B-adrenergici. Questo è in contrasto con gli adipociti bruni, dove i geni termogenici, almeno a livelli basali, sono espressi costantemente (168).

Di conseguenza, la capacità termogenica degli adipociti beige è reversibile, e queste cellule possono perdere questa capacità quando lo stimolo viene meno (169). Sembra addirittura che gli adipociti beige siano suscettibili alla transdifferenziazione in adipociti bianchi quando vi è un elevato afflusso di energia. Come nel WAT murino, anche nel WAT umano è noto che ci siano cellule progenitrici adipose che esprimono UCP1 in risposta all'attivazione del PPAR- γ e che presentino caratteristiche degli adipociti beige (170). Possiamo quindi forzare i progenitori adiposi localizzati nel WAT a differenziarsi in adipociti beige negli esseri umani? Ovviamente l'esposizione al freddo e gli agonisti B-adrenergici possono indurre ad un imbrunimento del WAT negli esseri umani. Tuttavia, entrambi questi approcci sono difficili da attuare negli esseri umani a causa della natura non specifica degli agonisti B-AR e all'incapacità degli esseri umani di tollerare condizioni di freddo per periodi di tempo prolungati. Possiamo evitare l'esposizione al freddo e i B agonisti, e comunque indurre il processo di Browning nel WAT? Recenti studi hanno identificato con successo alcuni geni importanti come PRDM16 e Ebf2 che partecipano alla programmazione degli adipociti bruni (171,172,173). Questi risultati, potenzialmente, ci permetteranno di aggirare i B-agonisti e la stimolazione indotta dal freddo e di formulare approcci più specifici mirati specificatamente ad indurre il

Browning del WAT. Non sorprende che, a causa del loro ruolo dominante nella programmazione degli adipociti bruni, l'espressione indotta di PRDM16 o Ebf2 è sufficiente a convertire i precursori adiposi bianchi in adipociti beige che esprimono UCP1. Allo stesso modo, la sovraespressione di PRDM16 nel tessuto adiposo del topo provoca imbrunimento del WAT e protegge i topi contro obesità indotta dalla dieta (174). Sulla base di questi studi è chiaro che le strategie volte ad indurre l'espressione di PRDM16 o EBF2 siano sufficienti ad indurre il processo di Browning nel WAT, e sicuramente questa strategia è una delle più fiduciose ed accreditate in una futura applicazione nel trattamento dell'obesità.

7.7 Nuovi presunti attivatori del BAT

Oltre agli attivatori del BAT descritti in precedenza, nuove scoperte recentissime, che provengono da studi sui roditori, suggeriscono altri importanti attivatori del BAT.

Il focus di questo paragrafo sarà sull'ormone irisina (rilasciato dal muscolo) e sui peptidi natriuretici (rilasciati dal cuore). Questi ormoni vengono rilasciati in particolari condizioni fisiologiche (esercizio fisico e stress cardiaco).

7.7.1 Esercizio e tessuto adiposo bruno: Irisina

L'esercizio fisico è ben noto per i suoi effetti benefici sul metabolismo sistemico.

Negli ultimi decenni numerosi studi sugli animali si sono posti come domanda se l'esercizio fisico abbia effetti benefici anche sull'attività ed espansione del BAT. E' stato ipotizzato che l'esercizio fisico possa influenzare l'attività del BAT tramite il SNS, dato che l'esercizio è già noto per aumentare l'attività generale del SNS (175). Tuttavia, la maggior parte degli studi non hanno trovato alcun effetto stimolante da parte dell'esercizio fisico sull'attività del BAT (175,176), ad eccezione di studi che utilizzano come protocolli di esercizio il nuoto (177,178), che probabilmente induce l'attività del BAT per compensare la perdita di calore nell'acqua.

Studi recenti su roditori hanno osservato effetti stimolanti dell'esercizio fisico su adipociti bruni e beige (179,180). Uno studio sui ratti ha dimostrato che un lieve esercizio fisico è

benefico per la classica risposta metabolica del BAT all'esposizione al freddo (181). È stato inoltre dimostrato che l'esercizio fisico in combinazione con l'esposizione al freddo porta ad un elevato aumento di espressione di UCP1 nel BAT, rispetto alla sola esposizione al freddo (12°C), suggerendo che l'attività fisica è necessaria per un'ottimale produzione di calore da parte del BAT. Uno studio condotto da Xu et al. (180) ha dimostrato che l'esercizio fisico nei topi aumenta il reclutamento di cellule progenitrici adipocitarie del BAT interscapolare ed aumenta la presenza di UCP1. È interessante notare che, in aggiunta a questi effetti stimolatori del BAT classico da parte dell'esercizio, è stato riscontrato anche un aumento d'espressione del programma genico della termogenesi nel tessuto adiposo epididimale (viscerale), compreso l'aumento di UCP1. Un altro studio ha mostrato la presenza di cellule beige all'interno del deposito retroperitoneale (viscerale) dei topi già dopo una settimana di esercizio (182).

Inoltre, un recente studio ha dimostrato che un esercizio fisico di resistenza si traduce prevalentemente in un imbrunimento del WAT sottocutaneo (179). In questo studio, Boström et al. scoprirono che topi che iperesprimono il coattivatore trascrizionale PGC1 α mostrano un maggiore imbrunimento del WAT inguinale.

Dal momento che alcuni studi hanno dimostrato che l'esercizio aumenta anche l'espressione del PGC1 α , è stato esaminato l'effetto dell'esercizio di resistenza sui marcatori di imbrunimento, osservando effetti simili. In ulteriori studi, è stato identificato un nuovo ormone chiamato Irisina, che viene rilasciato dal muscolo scheletrico dopo proteolisi della proteina di membrana FNDC5. Boström et al. hanno scoperto che l'irisina induce un imbrunimento negli adipociti sottocutanei bianchi dimostrandolo con un aumento dell'mRNA UCP1 (7-500 volte) e dall'up-regolazione dei geni termogenici (Ucp1, Elovl3, Cox7a1 e Otop1). La sovraespressione adenovirale-mediata di FNDC5 nel fegato di topo provoca un aumento dei livelli di irisina plasmatica di 3-4 volte, che a sua volta aumenta l'mRNA UCP1 di 13 volte nel WAT sottocutaneo. Inoltre, la stessa tecnica è stata utilizzata in topi C557BL/6, un tipo di topi che sono inclini ad obesità e diabete indotti dalla dieta, ed un aumento dei livelli di irisina in questi porta ad una migliore tolleranza del glucosio, una diminuzione di insulina a digiuno, un aumento del consumo di ossigeno e la riduzione del peso corporeo. Insieme, questi risultati

dimostrano i possibili effetti benefici dell'esercizio di resistenza nel reclutamento di cellule beige all'interno del tessuto adiposo bianco sottocutaneo, ed inoltre, il potenziale dell'irisina nell'indurre un fenotipo metabolico più sano. Possono questi effetti stimolanti dell'esercizio nel reclutamento di cellule beige essere traducibili anche negli esseri umani?

È importante sottolineare che gli autori hanno dimostrato che l'irisina nei topi e nell'uomo sono identici al 100% e che i livelli di irisina plasmatici nei soggetti umani sono raddoppiati dopo 10 settimane di allenamento di resistenza (179). È interessante notare che uno studio su pazienti con insufficienza cardiaca ha dimostrato una maggiore espressione di FNDC5 nel muscolo scheletrico, nel gruppo di pazienti con una migliore prestazione aerobica (183). Al contrario, un recente studio di Timmons et al. (184) ha dimostrato che l'effetto stimolante dovuto all'esercizio sul FNDC5 è limitato. Essi hanno analizzato l'induzione di FNDC5 mediante array di espressione genica in biopsie muscolari di 200 soggetti provenienti da diversi programmi di esercizio (sia durata e resistenza sforzare) da studi pubblicati in precedenza. Essi hanno scoperto che l'esercizio prolungato (6 settimane di resistenza in bicicletta) in giovani adulti, come anche un allenamento di resistenza in uomini da 20-80 anni, non aumentava il FNDC5 mRNA. Tuttavia, solo soggetti anziani molto attivi hanno mostrato un aumento (30%) di FNDC5 rispetto ai controlli sedentari. Gli autori concludono quindi che l'effetto stimolante dell'esercizio fisico sulla produzione di irisina è limitato, e che essa probabilmente dà solo un piccolo contributo agli ampi benefici complessivi che l'esercizio provoca sullo stato metabolico.

Un altro recente documento sull'irisina presenta dati provenienti da studi trasversali sul ruolo fisiologico dell'irisina negli esseri umani con correlazioni di parametri antropometrici, metabolici e ormonali (185). La presenza di FNDC5 nei tessuti umani, nel muscolo scheletrico, nel pericardio, nell'arteria intracranica e nel retto (muscoli cardiaci e lisci) è stata confermata. Tuttavia, in uno studio trasversale di 117 donne di mezza età (range BMI 20-47.7 kg/m²), non è stato trovato alcun supporto per un ruolo benefico dell'irisina nella regolazione del metabolismo. È interessante notare che un esercizio anaerobico acuto in soggetti giovani e sani aumenti i livelli di irisina, mentre un

esercizio cronico di 8 settimane (tre volte a settimana) non lo faccia.

Questi primi studi sull'uomo mettono in discussione i potenziali effetti benefici dell'irisina sullo stato metabolico. Oltre al rilascio fisiologico di irisina attraverso l'esercizio, dovrà essere esaminato con studi clinici l'uso terapeutico dell'irisina.

7.7.2 Peptidi natriuretici e tessuto adiposo bruno

Un recente studio ha dimostrato che i peptidi natriuretici cardiaci (NPs) sono in grado di innescare il processo di imbrunimento degli adipociti bianchi nei topi e nell'uomo (186).

I peptidi cardiaci, l'atriale (ANP) e il ventricolare (BNP), sono prevalentemente noti per il loro ruolo nel controllo omeostatico della pressione sanguigna che favorisce la vasodilatazione, la natriuresi e la diuresi, e inibisce il rilascio di renina e aldosterone (187). Successivamente, a questi ormoni è stato attribuito un ruolo nella regolazione della lipolisi, come dimostrato sia in vitro come in vivo (188).

I peptidi natriuretici mediano questi effetti lipolitici prevalentemente attraverso il recettore NPA (NPRA), mentre il recettore di eliminazione (NPRC) rimuove i peptidi dalla circolazione. Il legame degli NPs per il recettore guanilato ciclasi NPRA porta ad un aumento cellulare di cGMP che stimola la lipolisi agendo sulla lipasi ormone-sensibile (HSL) (189). Questi effetti lipolitici degli NPs sono stati osservati solo nel WAT umano. Ciò è stato confermato dallo studio di Bordicchia et al. (186) in cui, culture adipocitarie primarie di topi di tipo selvatico non mostravano alcuna risposta lipolitica in seguito ad infusione di ANP. Tuttavia, nei topi NPRC knockout hanno trovato una maggiore lipolisi in questi adipociti, dimostrando gli effetti inibitori di questo recettore di eliminazione (NPRC). È interessante notare che questi topi knockout avevano ridotto la massa di tessuto adiposo ed avevano un fenotipo adiposo più bruno. A supporto di ciò, geni marcatori degli adipociti bruni, come PRDM16, erano elevati sia nel BAT che nel WAT (inguinale e dell'epididimo). Questi risultati hanno indicato gli effetti di imbrunimento del WAT attraverso gli NPs. È stato poi dimostrato che, l'esposizione dei topi al freddo (4°C per 6 h) incrementava significativamente i livelli di BNP e di ANP nel plasma e l'espressione di mRNA BNP nel cuore. Inoltre, l'infusione di BNP nel topo aumentava l'espressione di mRNA UCP1 e PGC1 α sia nel WAT che nel BAT(186).

Complessivamente questi dati dimostrano che i peptidi natriuretici hanno la capacità di aumentare l'attività e il reclutamento di BAT nei topi in vitro e in vivo.

Hanno gli NPs effetti simili negli esseri umani? Una somministrazione sistemica di ANP tramite una microdialisi aumenta la lipolisi negli uomini sani (190). Un ruolo funzionale per gli effetti lipolitici degli NPs potrebbe essere il supplemento di substrato di acidi grassi al cuore ed ai muscoli durante l'esercizio fisico aerobico (191). Inoltre si ritiene che gli NPs siano importanti regolatori dell'ossidazione postprandiale di acidi grassi nell'uomo (192).

È interessante notare che nell'uomo, bassi livelli di NPs sono associati ad ipertensione, obesità, resistenza all'insulina e diabete (193,194). Inoltre, la perdita di peso nei soggetti obesi a causa di un cambiamento di stile di vita (195-196) ha mostrato un aumento dei livelli di BNP dopo la perdita di peso. È interessante notare che i pazienti con insufficienza cardiaca che soffrono di una grave perdita di peso (cachessia) subiscono un aumento dei livelli di entrambe le forme di NPs (198, 198) e un aumento di spesa energetica. E potrebbe essere suggerito che livelli elevati di NPs aumentino il reclutamento e l'attività degli adipociti bruni, e quindi una maggiore spesa energetica. Birkenfeld et al. (190,192) hanno dimostrato che l'infusione di ANP aumenta il dispendio energetico post-prandiale, mentre la spesa energetica a digiuno non viene influenzata. Il dosaggio (25 ng/kg/min) di ANP utilizzato da Birkenfeld et al. (192) aumentava le concentrazioni plasmatiche di ANP quadruplicandole (circa 300 pg/mL), comunque inferiori a quelle trovate in pazienti con insufficienza cardiaca (> 500 pg/mL). Questa dose relativamente bassa influenzava la mobilizzazione di lipidi e la termogenesi postprandiale (e possibilmente BAT) senza causare effetti avversi. Attualmente, l'uso terapeutico della NPs (carperitide e nesiritide) in pazienti con insufficienza cardiaca acuta e insufficienza cardiaca scompensata è possibile solo per mezzo di infusione e non per via orale (199).

L'effetto potenziale dei NPs sul Browning negli esseri umani è stato dimostrato nello studio di Bordicchia et al. dove hanno testato se le NPs possano indurre un programma genico termogenico in cellule staminali multipotenti derivanti dal tessuto adiposo umano (hMADS) e in adipociti sottocutanei. È interessante notare che ANP e BNP attivano

l'espressione di PGC1 α e UCP1, inducono la biogenesi mitocondriale e aumentano la respirazione totale e disaccoppiata. Questi risultati mostrano il ruolo potenziale delle particelle natriuretiche nell'aumentare la termogenesi acuta e nel reclutare il tessuto adiposo bruno nell'uomo. Essi hanno dimostrato che il meccanismo d'azione delle particelle natriuretiche condivide un obiettivo comune con la via adrenergica, cioè il p38 MAPK. L'attivazione della via p38 MAPK porta ad un aumento della trascrizione di UCP1 e PGC1 α (186). Inoltre, è stato dimostrato che il trattamento con ANP di hMADS porta ad un incremento di UCP1, PGC1 α e di citocromo c, simile a quello che si verifica durante una stimolazione β -adrenergica. Gli autori hanno anche scoperto che, sia le vie di segnalazione adrenergiche, che quelle dei NPs, lavorano entrambe a concentrazioni molto basse (fisiologiche). L'attivazione della pathway NPs potrebbe pertanto svolgere un ruolo di primo piano in aggiunta al percorso adrenergico nell'indurre effetti a lungo e a breve termine sul BAT. Attualmente questa è l'unica prova diretta degli effetti di Browning attraverso NPs negli esseri umani.

Conclusioni

Lo studio del tessuto adiposo bruno è un settore ampio della ricerca e grazie alla recente riscoperta nell'uomo, tramite l'utilizzo di tecniche PET, ha riacquisito importanza ed è attualmente oggetto di studio in tutto il mondo.

Il fine sperato è quello di poterlo sfruttare per controbilanciare l'afflusso energetico che provoca sovrappeso ed obesità, numerosi studi infatti hanno dimostrato che l'aumento in quantità e attivazione del BAT induce un fenotipo magro e sano, capace di arginare l'afflusso energetico introdotto trasformandolo in energia termica, come dimostrato in molti modelli animali. Gli studi hanno quindi come fine quello di trovare strategie e molecole capaci di provocare fenomeni di ipertrofia e iperplasia del BAT.

Inoltre, è recente la scoperta di un terzo tipo di adipocita, l'adipocita beige, che si sviluppa nel WAT in seguito ad un'esposizione al freddo o ad una stimolazione adrenergica. Quindi la strategia di Browning indotto è attualmente sotto studio e presenta molte aspettative.

Se un paziente obeso non ha alcuna presenza di BAT non avremo modo di attivarlo e la strategia del Browning potrebbe essere la più indicata a causa dell'ampia presenza di preadipociti bianchi, anche se convertire i progenitori adipocitari del WAT ipertrofico di un individuo obeso in cellule beige non può essere facile, perché quando c'è un afflusso costante di energia nel corpo, i progenitori adiposi potrebbero preferire di differenziarsi in adipociti bianchi al fine di immagazzinare energia in arrivo, piuttosto che differenziarsi in cellule beige per bruciare l'energia in eccesso.

Abbiamo già detto che l'esposizione al freddo, per quanto sia la via più efficace per stimolare il BAT, sia molto difficile da utilizzare come terapia, anche se l'ipotesi di regolare la temperatura al minimo del range termoneutrale in edifici pubblici ed in casa potrebbe incrementare, anche se di poco, il potenziale termogenico del BAT.

Agonisti adrenergici non possono essere sfruttati a causa dell'alto dosaggio richiesto che provocherebbe moltissimi effetti avversi, come stress cardiovascolare.

I Capsinoidi e l'Insulina potrebbero essere dei metodi innovativi di attivazione del BAT che eliminano effetti collaterali; i capsinoidi potrebbero attivare il SNS diminuendo i

rischi di effetti collaterali, l'insulina invece ha mostrato la capacità di indurre l'assorbimento di glucosio nel BAT a livelli maggiori che nel WAT, però rimane da chiarire se effettivamente dopo stimolazione con insulina la termogenesi abbia luogo.

Interessante e di recente scoperta sono le nuove strategie di attivazione del BAT che sono quella dell'irisina e dei peptidi natriuretici, anche se risposte definitive nell'uomo sono ancora carenti.

Un'altra via potenziale ma meno apprezzata potrebbe essere quella di sviluppare terapie che mirano ai fattori extracellulari rilasciati dal BAT. Questi fattori potrebbero partecipare nel coordinare i vari aspetti dell'adattamento metabolico durante la termogenesi ed esercitare benefici metabolici sul tessuto adiposo e su tessuti periferici. Per esempio, l'espressione di FGF21 è fortemente espressa nel grasso bruno in risposta al freddo, ed elevati livelli promuovono ossidazione dei grassi epatici e migliorano l'omeostasi del glucosio. Riflettendo sui risultati ottenuti dai diversi studi si può giungere alla conclusione che il BAT rappresenterà sicuramente un punto di partenza nel trattamento dell'obesità e delle patologie associate ad essa, in quanto le sue potenzialità sono promettenti, la ricerca però deve ancora impegnarsi nel trovare una strategia valida, che non presenti elevati effetti avversi e che possa sfruttare a pieno le sue capacità. In questo momento, anche se le strategie di dispendio energetico mediate dal BAT sembrano essere teoricamente possibili, sarà estremamente difficile applicarle negli esseri umani al fine di ridurre la massa del WAT e trattare l'obesità. Ciò è dovuto principalmente al fatto che, non solo lo stile di vita, ma anche fattori biologici come lo sviluppo della leptino-resistenza, la soppressione dell'appetito indotta dalla grelina e la capacità illimitata del WAT di espandersi e immagazzinare energia favoriscano lo stoccaggio di energia rispetto alla spesa energetica. Sarà una sfida monumentale per il BAT quella di far fronte a questi fattori biologici, ridurre la massa del WAT e ripristinare l'equilibrio energetico del corpo.

BIBLIOGRAFIA

1. Poirier P, Eckel RH. 2002. Obesity and cardiovascular disease. *Curr Atheroscler Rep* 4: 448–453.
2. Hursting SD. 2014. Obesity, energy balance, and cancer: A mechanistic perspective. *Cancer Treat Res* 159:21–33.
3. Dhurandhar EJ, Keith SW. 2014. The aetiology of obesity beyond eating more and exercising less. *Best Pract Res Clin Gastroenterol* 28:533–544.
4. Avena NM, Gold JA, Kroll C, Gold MS. 2012. Further developments in the neurobiology of food and addiction: Update on the state of the science. *Nutrition* 28:341–343.
5. Gimble JM, Bunnell BA, Chiu ES, Guilak F. 2011. Concise review: Adipose-derived stromal vascular fraction cells and stem cells: let's not get lost in translation. *Stem Cells* 29: 749–754.
6. MacKellar J, Cushman SW, Periwal V. 2010. Waves of adipose tissue growth in the genetically obese Zucker fatty rat. *PloS one* 5:e8197.
7. Moitra J, Mason MM, Olive M, Krylov D, Gavrilova O, Marcus-Samuels B, Feigenbaum L, Lee E, Aoyama T, Eckhaus M, Reitman ML, Vinson C. 1998. Life without white fat: A transgenic mouse. *Genes Dev* 12:3168–3181.
8. Nunez NP, Oh WJ, Rozenberg J, Perella C, Anver M, Barrett JC, Perkins SN, Berrigan D, Moitra J, Varticovski L, Hursting SD, Vinson C. 2006. Accelerated tumor formation in a fatless mouse with type 2 diabetes and inflammation. *Cancer Res* 66:5469–5476.
9. Wang F, Mullican SE, DiSpirito JR, Peed LC, Lazar MA. 2013. Lipoatrophy and severe metabolic disturbance in mice with fat-specific deletion of PPARgamma. *Proc Natl Acad Sci USA* 110:18656–18661.

10. Guerre-Millo M. 2004. Adipose tissue and adipokines: For better or worse. *Diabetes Metab* 30:13–19.
11. Trayhurn P, Wood IS. 2004. Adipokines: inflammation and the pleiotropic role of white adipose tissue. *Br J Nutr* 92:347–355.
12. Attele AS, Shi ZQ, Yuan CS. 2002. Leptin, gut, and food intake. *Biochem Pharmacol* 63: 1579–1583.
13. Barazzoni R, Zanetti M, Stebel M, Biolo G, Cattin L, Guarnieri G. 2003. Hyperleptinemia prevents increased plasma ghrelin concentration during short-term moderate caloric restriction in rats. *Gastroenterology* 124:1188–1192.
14. Myers MG, Cowley MA, Munzberg H. 2008. Mechanisms of leptin action and leptin resistance. *Annu Rev Physiol* 70:537–556.
15. DiabeTschop M, Weyer C, Tataranni PA, Devanarayan V, Ravussin E, Heiman ML. 2001. Circulating ghrelin levels are decreased in human obesity. *Tes* 50:707–709.
16. Druce MR, Wren AM, Park AJ, Milton JE, Patterson M, Frost G, Ghatei MA, Small C, Bloom SR. 2005. Ghrelin increases food intake in obese as well as lean subjects. *Int J Obes* 29:1130–1136.
17. Conradi Gesneri medici Tigurine Historiae Animalium Lib. I de Quadripedibus uiuiparis. 1551:842
18. Cramer W. On Glandular Adipose Tissue, and its Relation to other Endocrine Organs and to the Vitamine Problem. *Br J Exp Pathol.* 1920;1(4):184-96
19. Aherne W, and Hull D. Brown adipose tissue and heat production in the newborn infant. *J Pathol Bacteriol.* 1966;91(1):223-34.

20. Cramer W. On Glandular Adipose Tissue, and its Relation to other Endocrine Organs and to the Vitamine Problem. *Br J Exp Pathol.* 1920;1(4):184-96.
21. Smith RE, and Roberts JC. Thermogenesis of brown adipose tissue in cold-acclimated rats. *Am J Physiol.* 1964;206(1):143-8.
22. Foster DO, and Frydman ML. Nonshivering thermogenesis in the rat. II. Measurements of blood flow with microspheres point to brown adipose tissue as the dominant site of the calorogenesis induced by noradrenaline. *Can J Physiol Pharmacol.* 1978;56(1):110-22.
23. Nicholls DG, Bernson VS, and Heaton GM. The identification of the component in the inner membrane of brown adipose tissue mitochondria responsible for regulating energy dissipation. *Experientia Suppl.* 1978;32:89-93.
24. Rothwell NJ, and Stock MJ. A role for brown adipose tissue in diet-induced thermogenesis. *Nature.* 1979;281(5726):31-5.
25. Bonnot E. The Interscapular Gland. *J Anat Physiol.* 1908;43(Pt 1):43-58.
26. Aherne W, and Hull D. Brown adipose tissue and heat production in the newborn infant. *J Pathol Bacteriol.* 1966;91(1):223-34.
27. Heaton J. The distribution of brown adipose tissue in the human. *J Anat.* 1972; 112(Pt1):35-9.
28. Aherne W, and Hull D. Brown adipose tissue and heat production in the newborn infant. *J Pathol Bacteriol.* 1966;91(1):223-34.
29. Huttunen P, Hirvonen J, and Kinnula V. The occurrence of brown adipose tissue in outdoor workers. *Eur J Appl Physiol Occup Physiol.* 1981;46(4):339-45.

30. Lean ME, James WP, Jennings G, and Trayhurn P. Brown adipose tissue uncoupling protein content in human infants, children and adults. *Clin Sci (Lond)*.
31. Astrup A, Bulow J, Madsen J, and Christensen NJ. Contribution of BAT and skeletal muscle to thermogenesis induced by ephedrine in man. *Am J Physiol*. 1985;248(5 Pt 1):E507-15.
32. Van Marken Lichtenbelt WD, Vanhommerig JW, Smulders NM, Drossaerts JM, Kemerink GJ, Bouvy ND, Schrauwen P, and Teule GJ. Cold-activated brown adipose tissue in healthy men. *N Engl J Med*. 2009;360(15):1500-8.
33. Saito M, Okamatsu-Ogura Y, Matsushita M, Watanabe K, Yoneshiro T, Nio-Kobayashi J, Iwanaga T, Miyagawa M, Kameya T, Nakada K, 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.
34. Virtanen KA, Lidell ME, Orava J, Heglind M, Westergren R, Niemi T, Taittonen M, Laine J, Savisto NJ, Enerback S, et al. Functional brown adipose tissue in healthy adults. *N Engl J Med*. 2009;360(15):1518-
35. Zingaretti MC, Crosta F, Vitali A, Guerrieri M, Frontini A, Cannon B, Nedergaard J, and Cinti S. The presence of UCP1 demonstrates that metabolically active adipose tissue in the neck of adult humans truly represents brown adipose tissue. *Faseb J*. 2009;23(9):3113-20.
36. Cypess AM, Lehman S, Williams G, Tal I, Rodman D, Goldfine AB, Kuo FC, Palmer EL, Tseng YH, Doria A, et al. Identification and importance of brown adipose tissue in adult humans. *N Engl J Med*. 2009;360(15):1509-17.

37. Vijgen GH, Bouvy ND, Teule GJ, Brans B, Schrauwen P, and van Marken Lichtenbelt WD. Brown adipose tissue in morbidly obese subjects. *PLoS One*. 2011;6(2):e17247.
38. Timmons JA, Wennmalm K, Larsson O, Walden TB, Lassmann T, Petrovic N, Hamilton DL, Gimeno RE, Wahlestedt C, Baar K, Nedergaard J, Cannon B. Myogenic gene expression signature establishes that brown and white adipocytes originate from distinct cell lineages. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2007;104(11):4401-6.
39. Wu Z, Puigserver P, Andersson U, et al. Mechanisms controlling mitochondrial biogenesis and respiration through the thermogenic coactivator PGC-1. *Cell* 1999;98:115–124
40. 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;92:829–839
41. 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;3:333–341
42. Petrovic N, Walden TB, Shabalina IG, Timmons JA, Cannon B, and Nedergaard J. Chronic peroxisome proliferator-activated receptor gamma (PPARgamma) activation of epididymally derived white adipocyte cultures reveals a population of thermogenically competent, UCP1-containing adipocytes molecularly distinct from classic brown adipocytes. *J Biol Chem*. 2010;285(10):7153-64.
43. Wu J, Bostrom P, Sparks LM, Ye L, Choi JH, Giang AH, Khandekar M, Virtanen KA, Nuutila P, Schaart G, et al. Beige adipocytes are a distinct type of thermogenic fat cell in mouse and human. *Cell*. 2012;150(2):366-

- 76.
44. Waldén T, Hansen I, Timmons J, Cannon B, and Nedergaard J. Recruited vs. nonrecruited molecular signatures of brown, "brite," and white adipose tissues. *Am J Physiol Endocrinol Metab.* 2012;302(1):31.
 45. Virtanen KA, Lidell ME, Orava J, Heglind M, Westergren R, Niemi T, Taittonen M, Laine J, Savisto NJ, Enerback S, et al. Functional brown adipose tissue in healthy adults. *N Engl J Med.* 2009;360(15):1518- 25.
 46. Sharp L, Shinoda K, Ohno H, Scheel D, Tomoda E, Ruiz L, Hu H, Wang L, Pavlova Z, Gilsanz V, et al. Human BAT Possesses Molecular Signatures That Resemble Beige/Brite Cells. *PLoS One.* 2012;7(11).
 47. Cannon B, and Nedergaard J. Brown adipose tissue: function and physiological significance. *Physiol Rev.* 2004;84(1):277-359.
 48. Bartness TJ, Vaughan CH, and Song CK. Sympathetic and sensory innervation of brown adipose tissue. *Int J Obes (Lond).* 2010;34 Suppl 1(S36-42).
 49. Morrison SF, Madden CJ, and Tupone D. Central control of brown adipose tissue thermogenesis. *Front Endocrinol (Lausanne).* 2012;3(5).
 50. Lowell BB, and Spiegelman BM. Towards a molecular understanding of adaptive thermogenesis. *Nature.* 2000;404(6778):652-60.
 51. Silva J. Thermogenic mechanisms and their hormonal regulation. *Physiol Rev.* 2006;86(2):435-64.
 52. Hadi M, Chen C, Whatley M, Pacak K, and Carrasquillo J. Brown fat imaging with (18)F-6-fluorodopamine PET/CT, (18)F-FDG PET/CT, and (123)I-MIBG SPECT: a study of patients being evaluated for pheochromocytoma. *J Nucl Med.* 2007;48(7):1077-83.

53. Yamaga L, Thom A, Wagner J, Baroni R, Hidal J, and Funari M. The effect of catecholamines on the glucose uptake in brown adipose tissue demonstrated by (18)F-FDG PET/CT in a patient with adrenal pheochromocytoma. *Eur J Nucl Med Mol Imaging*. 2008;35(2):446-7.
54. Parysow O, Mollerach AM, Jager V, Racioppi S, San Roman J, and Gerbaudo VH. Low-dose oral propranolol could reduce brown adipose tissue F-18 FDG uptake in patients undergoing PET scans. *Clin Nucl Med*. 2007;32(5):351-7.
55. Soderlund V, Larsson SA, and Jacobsson H. Reduction of FDG uptake in brown adipose tissue in clinical patients by a single dose of propranolol. *Eur J Nucl Med Mol Imaging*. 2007;34(7):1018-22.
56. Lebron L, Chou A, and Carrasquillo J. Interesting image. Unilateral F-18 FDG uptake in the neck, in patients with sympathetic denervation. *Clin Nucl Med*. 2010;35(11):899-901.
57. Lebon V, Dufour S, Petersen KF, Ren J, Jucker BM, Slezak LA, Cline GW, Rothman DL, Shulman GI. Effect of triiodothyronine on mitochondrial energy coupling in human skeletal muscle. *J Clin Invest*. 2001;108(5):733-7.
58. Mitchell C, Savage D, Dufour S, Schoenmakers N, Murgatroyd P, Befroy D, Halsall D, Northcott S, Raymond-Barker P, Curran S, et al. Resistance to thyroid hormone is associated with raised energy expenditure, muscle mitochondrial uncoupling, and hyperphagia. *J Clin Invest*. 2010;120(4):1345-54.
59. Klingenspor M. 2003. Cold-induced recruitment of brown adipose tissue thermogenesis. *Exp Physiol* 88:141–148.
60. Cypess AM, Lehman S, Williams G, Tal I, Rodman D, Goldfine AB, Kuo FC, Palmer EL, Tseng YH, Doria A, Kolodny GM, Kahn CR. 2009.

Identification and importance of brown adipose tissue in adult humans. *N Engl J Med* 360:1509–1517.

61. Van der Lans AA, Hoeks J, Brans B, Vijgen GH, Visser MG, Vosselman MJ, Hansen J, Jorgensen JA, Wu J, Mottaghy FM, Schrauwen P, van Marken Lichtenbelt WD. 2013. Cold acclimation recruits human brown fat and increases nonshivering thermogenesis. *J Clin Invest* 123:3395–3403.
62. Cannon B, Nedergaard J. 2004. Brown adipose tissue: Function and physiological significance. *Physiol Rev* 84:277–359.
63. Herzig S, Long F, Jhala US, Hedrick S, Quinn R, Bauer A, Rudolph D, Schutz G, Yoon C, Puigserver P, Spiegelman B, Montminy M. 2001. CREB regulates hepatic gluconeogenesis through the coactivator PGC-1. *Nature* 413:179–183.
64. Cao W, Daniel KW, Robidoux J, Puigserver P, Medvedev AV, Bai X, Floering LM, Spiegelman BM, Collins S. 2004. P38 mitogen-activated protein kinase is the central regulator of cyclic AMP-dependent transcription of the brown fat uncoupling protein 1 gene. *Mol Cell Biol* 24:3057–3067.
65. Puigserver P, Rhee J, Donovan J, Walkey CJ, Yoon JC, Oriente F, Kitamura Y, Altomonte J, Dong H, Accili D, Spiegelman BM. 2003. Insulin-regulated hepatic gluconeogenesis through FOXO1-PGC-1alpha interaction. *Nature* 423:550–555.
66. Puigserver P, Wu Z, Park CW, Graves R, Wright M, Spiegelman BM. 1998. A cold-inducible coactivator of nuclear receptors linked to adaptive thermogenesis. *Cell* 92:829–839.
67. Knutti D, Kaul A, Kralli A. 2000. A tissue-specific coactivator of steroid receptors, identified in a functional genetic screen. *Mol Cell Biol* 20:2411–2422.

68. Vega RB, Huss JM, Kelly DP. 2000. The coactivator PGC-1 cooperates with peroxisome proliferator-activated receptor alpha in transcriptional control of nuclear genes encoding mitochondrial fatty acid oxidation enzymes. *Mol Cell Biol* 20:1868–1876.
69. Wu Z, Puigserver P, Andersson U, Zhang C, Adelmant G, Mootha V, Troy A, Cinti S, Lowell B, Scarpulla RC, Spiegelman BM. 1999. Mechanisms controlling mitochondrial biogenesis and respiration through the thermogenic coactivator PGC-1. *Cell* 98: 115–124.
70. Austin S, St-Pierre J. 2012. PGC1alpha and mitochondrial metabolism-emerging concepts and relevance in ageing and neurodegenerative disorders. *J Cell Sci* 125:4963–4971.
71. Lin J, Wu PH, Tarr PT, Lindenberg KS, St-Pierre J, Zhang CY, Mootha VK, Jager S, Vianna CR, Reznick RM, Cui L, Manieri M, Donovan MX, Wu Z, Cooper MP, Fan MC, Rohas LM, Zavacki AM, Cinti S, Shulman GI, Lowell BB, Krainc D, Spiegelman BM. 2004. Defects in adaptive energy metabolism with CNS-linked hyperactivity in PGC-1alpha null mice. *Cell* 119:121–135.
72. Uldry M, Yang W, St-Pierre J, Lin J, Seale P, Spiegelman BM. 2006. Complementary action of the PGC-1 coactivators in mitochondrial biogenesis and brown fat differentiation. *Cell Metab* 3:333–341.
73. Tiraby C, Tavernier G, Lefort C, Larrouy D, Bouillaud F, Ricquier D, Langin D. 2003. Acquisition of brown fat cell features by human white adipocytes. *J Bio Chem* 278:33370–33376.
74. Van Baak MA. Meal-induced activation of the sympathetic nervous system and its cardiovascular and thermogenic effects in man. *Physiol Behav.* 2008;94(2):178-86.

75. Sims EA, and Danforth E, Jr. Expenditure and storage of energy in man. *J Clin Invest.* 1987;79(4):1019-25.
76. Glick Z, Teague RJ, and Bray GA. Brown adipose tissue: thermic response increased by a single low protein, high carbohydrate meal. *Science.* 1981;213(4512):1125-7.
77. Glick Z, Wickler SJ, Stern JS, and Horwitz BA. Regional blood flow in rats after a single low-protein, high- carbohydrate test meal. *Am J Physiol.* 1984;247(1 Pt 2):R160-6.
78. Feldmann HM, Golozoubova V, Cannon B, and Nedergaard J. UCP1 ablation induces obesity and abolishes diet-induced thermogenesis in mice exempt from thermal stress by living at thermoneutrality. *Cell Metab.* 2009;9(2):203-9.
79. Wijers SL, Saris WH, and van Marken Lichtenbelt WD. Recent advances in adaptive thermogenesis: potential implications for the treatment of obesity. *Obes Rev.* 2009;10(2):218-26.
80. Bouchard C, Tremblay A, Despres JP, Nadeau A, Lupien PJ, Theriault G, Dussault J, Moorjani S, Pinault S, and Fournier G. The response to long-term overfeeding in identical twins. *N Engl J Med.* 1990;322(21):1477-82.
81. Stock MJ. Gluttony and thermogenesis revisited. *Int J Obes Relat Metab Disord.* 1999;23(11):1105-17.
82. Wijers SL, Saris WH, and van Marken Lichtenbelt WD. Individual thermogenic responses to mild cold and overfeeding are closely related. *J Clin Endocrinol Metab.* 2007;92(11):4299-305.

83. Trujillo, M.E. et al. (2006) Adipose tissue-derived factors: impact on health and disease. *Endocr. Rev.* 27, 762–778
84. Waki, H. et al. (2007) Endocrine functions of adipose tissue. *Annu. Rev. Pathol.* 2, 31–56
85. Wang, G.X. et al. (2014) The brown fat-enriched secreted factor Nrg4 preserves metabolic homeostasis through attenuation of hepatic lipogenesis. *Nat. Med.* 20, 1436–1443
86. Rosell, M. et al. (2014) Brown and white adipose tissues: intrinsic differences in gene expression and response to cold exposure in mice. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* 306, E945–E964
87. Hobbs, S.S. et al. (2002) Neuregulin isoforms exhibit distinct patterns of ErbB family receptor activation. *Oncogene* 21, 8442–8452
88. Hayes, N.V. et al. (2008) Characterization of the cell membrane-associated products of the Neuregulin 4 gene. *Oncogene* 27, 715–720
89. Hayes, N.V. et al. (2007) Identification and characterization of novel spliced variants of neuregulin 4 in prostate cancer. *Clin. Cancer Res.* 13, 3147–3155
90. Hondares, E. et al. (2011) Thermogenic activation induces FGF21 expression and release in brown adipose tissue. *J. Biol. Chem.* 286, 12983–12990
91. Nishimura, T. et al. (2000) Identification of a novel FGF, FGF-21, preferentially expressed in the liver. *Biochim. Biophys. Acta* 1492, 203–206

92. Stanford, K.I. et al. (2013) Brown adipose tissue regulates glucose homeostasis and insulin sensitivity. *J. Clin. Invest.* 123, 215–223
93. Lee, P. et al. (2014) Irisin and FGF21 are cold-induced endocrine activators of brown fat function in humans. *Cell Metab.* 19, 302–309
94. Badman, M.K. et al. (2007) Hepatic fibroblast growth factor 21 is regulated by PPARalpha and is a key mediator of hepatic lipid metabolism in ketotic states. *Cell Metab.* 5, 426–437
95. Potthoff, M.J. et al. (2009) FGF21 induces PGC-1alpha and regulates carbohydrate and fatty acid metabolism during the adaptive starvation response. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 106, 10853–10858
96. Coskun, T. et al. (2008) Fibroblast growth factor 21 corrects obesity in mice. *Endocrinology* 149, 6018–6027
97. Gaich, G. et al. (2013) The effects of LY2405319, an FGF21 analog, in obese human subjects with type 2 diabetes. *Cell Metab.* 18, 333–340
98. Fisher, F.M. et al. (2012) FGF21 regulates PGC-1alpha and browning of white adipose tissues in adaptive thermogenesis. *Genes Dev.* 26, 271–281
99. Owen, B.M. et al. (2014) FGF21 acts centrally to induce sympathetic nerve activity, energy expenditure, and weight loss. *Cell Metab.* 20, 670–677
100. Lagercrantz, J. et al. (1998) A comparative study of the expression patterns for vegf, vegf-b/vrf and vegf-c in the developing and adult mouse. *Biochim. Biophys. Acta* 1398, 157–163

101. Asano, A. et al. (2001) Isoform-specific regulation of vascular endothelial growth factor (VEGF) family mRNA expression in cultured mouse brown adipocytes. *Mol. Cell. Endocrinol.* 174, 71–76
102. Asano, A. et al. (1997) Adrenergic activation of vascular endothelial growth factor mRNA expression in rat brown adipose tissue: implication in cold-induced angiogenesis. *Biochem J.* 328, 179-183
103. Bagchi, M. et al. (2013) Vascular endothelial growth factor is important for brown adipose tissue development and maintenance. *FASEB J.* 27, 3257–3271
104. Leung, D.W. et al. (1989) Vascular endothelial growth factor is a secreted angiogenic mitogen. *Science* 246, 1306–1309
105. Elias, I. et al. (2012) Adipose tissue overexpression of vascular endothelial growth factor protects against diet-induced obesity and insulin resistance. *Diabetes* 61, 1801–1813
106. Sun, K. et al. (2014) Brown adipose tissue derived VEGF-A modulates cold tolerance and energy expenditure. *Mol. Metab.* 3, 474–483
107. Aase, K. et al. (1999) Localization of VEGF-B in the mouse embryo suggests a paracrine role of the growth factor in the developing vasculature. *Dev. Dyn.* 215, 12–25
108. Hagberg, C.E. et al. (2010) Vascular endothelial growth factor B controls endothelial fatty acid uptake. *Nature* 464, 917–921
109. Carreira, A.C. et al. (2014) Bone morphogenetic proteins: structure, biological function and therapeutic applications. *Arch. Biochem. Biophys.* 561, 64–73

110. Zamani, N. et al. (2011) Emerging roles for the transforming growth factor- β superfamily in regulating adiposity and energy expenditure. *Endocr. Rev.* 32, 387–403
111. Tseng, Y.H. et al. (2008) New role of bone morphogenetic protein 7 in brown adipogenesis and energy expenditure. *Nature* 454, 1000–1004
112. Schulz, T.J. et al. (2011) Identification of inducible brown adipocyte progenitors residing in skeletal muscle and white fat. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 108, 143–148
113. Qian, S.W. et al. (2013) BMP4-mediated brown fat-like changes in white adipose tissue alter glucose and energy homeostasis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 110, E798–E807
114. Schulz, T.J. et al. (2013) Brown-fat paucity due to impaired BMP signalling induces compensatory browning of white fat. *Nature* 495, 379–383
115. Whittle, A.J. et al. (2012) BMP8B increases brown adipose tissue thermogenesis through both central and peripheral actions. *Cell* 149, 871–885
116. Pal, M. et al. (2014) From cytokine to myokine: the emerging role of interleukin-6 in metabolic regulation. *Immunol. Cell Biol.* 92, 331–339
117. Reilly, S.M. et al. (2013) An inhibitor of the protein kinases TBK1 and IKK- ϵ improves obesity-related metabolic dysfunctions in mice. *Nat. Med.* 19, 313–321
118. Reilly, S.M. et al. (2015) A subcutaneous adipose tissue-liver signalling axis controls hepatic gluconeogenesis. *Nat. Commun.* 6, 6047
119. Petruzzelli, M. et al. (2014) A switch from white to brown fat

- increases energy expenditure in cancer-associated cachexia. *Cell Metab.* 20, 433–447
120. Fiore, M. et al. (2009) Nerve growth factor as a signaling molecule for nerve cells and also for the neuroendocrine-immune systems. *Rev. Neurosci.* 20, 133–145
 121. Jing, S. et al. (1992) Nerve growth factor mediates signal transduction through trk homodimer receptors. *Neuron* 9, 1067–1079
 122. Kaplan, D.R. et al. (1991) The trk proto-oncogene product: a signal transducing receptor for nerve growth factor. *Science* 252, 554–558
 123. Nechad, M. et al. (1994) Production of nerve growth factor by brown fat in culture: relation with the in vivo developmental stage of the tissue. *Comp. Biochem. Physiol. Comp. Physiol.* 107, 381–388
 124. Nisoli, E. et al. (1996) Expression of nerve growth factor in brown adipose tissue: implications for thermogenesis and obesity. *Endocrinology* 137, 495–503
 125. Belliveau, D.J. et al. (1997) NGF and neurotrophin-3 both activate TrkA on sympathetic neurons but differentially regulate survival and neuritogenesis. *J. Cell Biol.* 136, 375–388
 126. Kuruvilla, R. et al. (2004) A neurotrophin signaling cascade coordinates sympathetic neuron development through differential control of TrkA trafficking and retrograde signaling. *Cell* 118, 243–255
 127. Turer, A.T. et al. (2012) Adiponectin: mechanistic insights and clinical implications. *Diabetologia* 55, 2319–2326
 128. Zhang, Y. et al. (2002) Regulation of adiponectin and leptin gene expression in white and brown adipose tissues: influence of beta3-

- adrenergic agonists, retinoic acid, leptin and fasting. *Biochim. Biophys. Acta* 1584, 115-122
129. Maeda, N. et al. (2002) Diet-induced insulin resistance in mice lacking adiponectin/ACRP30. *Nat. Med.* 8, 731–737
130. Combs, T.P. et al. (2001) Endogenous glucose production is inhibited by the adipose-derived protein Acrp30. *J. Clin. Invest.* 108, 1875–1881
131. Yamauchi, T. et al. (2002) Adiponectin stimulates glucose utilization and fatty-acid oxidation by activating AMP-activated protein kinase. *Nat. Med.* 8, 1288–1295
132. Kubota, N. et al. (2007) Adiponectin stimulates AMP-activated protein kinase in the hypothalamus and increases food intake. *Cell Metab.* 6, 55–68
133. Cawthorn, W.P. et al. (2014) Bone marrow adipose tissue is an endocrine organ that contributes to increased circulating adiponectin during caloric restriction. *Cell Metab.* 20, 368–375
134. Silva, J.E. et al. (1983) Adrenergic activation of triiodothyronine production in brown adipose tissue. *Nature* 305, 712–713
135. de Jesus, L.A. et al. (2001) The type 2 iodothyronine deiodinase is essential for adaptive thermogenesis in brown adipose tissue. *J. Clin. Invest.* 108, 1379–1385
136. Kiefer, F.W. et al. (2012) Retinaldehyde dehydrogenase 1 regulates a thermogenic program in white adipose tissue. *Nat. Med.* 18, 918–925
137. Liu, J. et al. (2013) Essential roles of 11beta-HSD1 in regulating brown adipocyte function. *J. Mol. Endocrinol.* 50, 103–113
138. Hara, T. et al. (2014) Role of free fatty acid receptors in the regulation

- of energy metabolism. *Biochim. Biophys. Acta* 1841, 1292–1300
139. Offermanns, S. (2014) Free fatty acid (FFA) and hydroxy carboxylic acid (HCA) receptors. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 54, 407–434
 140. Yore, M.M. et al. (2014) Discovery of a class of endogenous mammalian lipids with anti-diabetic and anti-inflammatory effects. *Cell* 159, 318–332
 141. Ahmed, K. et al. (2010) An autocrine lactate loop mediates insulin-dependent inhibition of lipolysis through GPR81. *Cell Metab.* 11, 311–319
 142. Davis T, Chambercold acclimatization in man. *J Appl Physiol.* 1961;16(10):1-5.
 143. Orava J, Nuutila P, Lidell ME, Oikonen V, Nojonen T, Viljanen T, Scheinin M, Taittonen M, Niemi T, Enerback S, et al. Different metabolic responses of human brown adipose tissue to activation by cold and insulin. *Cell Metab.* 2011;14(2):272-9.
 144. Vosselman MJ, van der Lans AA, Brans B, Wierdsma R, van Baak MA, Schrauwen P, and van Marken Lichtenbelt WD. Systemic beta-adrenergic stimulation of thermogenesis is not accompanied by brown adipose tissue activity in humans. *Diabetes.* 2012;61(12):3106-13.
 145. Collins S. beta-Adrenoceptor Signaling Networks in Adipocytes for Recruiting Stored Fat and Energy Expenditure. *Front Endocrinol (Lausanne).* 2011;2:102.
 146. Schiffelers SL, Saris WH, Boomsma F, and van Baak MA. beta(1)- and beta(2)-Adrenoceptor-mediated thermogenesis and lipid utilization in obese and lean men. *J Clin Endocrinol Metab.* 2001;86(5):2191-9.
 147. Arch JR, Ainsworth AT, Ellis RD, Piercy V, Thody VE, Thurlby PL,

- Wilson C, Wilson S, Young P. 1984. Treatment of obesity with thermogenic beta-adrenoceptor agonists: Studies on BRL 26830A in rodents. *Int J Obes* 1:1–11.
148. Arch JR. 2002. Beta(3)-Adrenoceptor agonists: Potential, pitfalls and progress. *Eur J Pharmacol* 440:99–107.
149. Di Dalmazi G, Vicennati V, Pasquali R, Pagotto U. 2013. The unrelenting fall of the pharmacological treatment of obesity. *Endocrine* 44:598–609.
150. Puigserver P, Rhee J, Donovan J, Walkey CJ, Yoon JC, Oriente F, Kitamura Y, Altomonte J, Dong H, Accili D, Spiegelman BM. 2003. Insulin-regulated hepatic gluconeogenesis through FOXO1-PGC-1alpha interaction. *Nature* 423:550–555.
151. Austin S, St-Pierre J. 2012. PGC1alpha and mitochondrial metabolism-emerging concepts and relevance in ageing and neurodegenerative disorders. *J Cell Sci* 125:4963–4971.
152. Cypess AM, Chen YC, Sze C, Wang K, English J, Chan O, Holman AR, Tal I, Palmer MR, Kolodny GM, et al. Cold but not sympathomimetics activates human brown adipose tissue in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2012;109(25):10001-5.
153. Carey AL, Formosa MF, Van Every B, Bertovic D, Eikelis N, Lambert GW, Kalff V, Duffy SJ, Cherk MH, and Kingwell BA. Ephedrine activates brown adipose tissue in lean but not obese humans. *Diabetologia*. 2013;56(1):147-55.
154. Seale P, Kajimura S, Spiegelman BM. 2009. Transcriptional control of brown adipocyte development and physiological function-of mice and men. *Genes Dev* 23:788–797.

155. Picard F, Gehin M, Annicotte J, Rocchi S, Champy MF, O'Malley BW, Chambon P, Auwerx J. 2002. SRC-1 and TIF2 control energy balance between white and brown adipose tissues. *Cell* 111:931–941.
156. Zhou Z, Yon Toh S, Chen Z, Guo K, Ng CP, Ponniah S, Lin SC, Hong W, Li P. 2003. Cidea-deficient mice have lean phenotype and are resistant to obesity. *Nat Genet* 35: 49–56.
157. Scime A, Grenier G, Huh MS, Gillespie MA, Bevilacqua L, Harper ME, Rudnicki MA. 2005. Rb and p107 regulate preadipocyte differentiation into white versus brown fat through repression of PGC-1alpha. *Cell Metab* 2:283–295.
158. Kiskinis E, Hallberg M, Christian M, Olofsson M, Dilworth SM, White R, Parker MG. 2007. RIP140 directs histone and DNA methylation to silence Ucp1 expression in white adipocytes. *EMBO J* 26:4831–4840.
159. Kawabata F, Inoue N, Masamoto Y, Matsumura S, Kimura W, Kadowaki M, Higashi T, Tominaga M, Inoue K, and Fushiki T. Non-pungent capsaicin analogs (capsinoids) increase metabolic rate and enhance thermogenesis via gastrointestinal TRPV1 in mice. *Biosci Biotechnol Biochem*. 2009;73(12):2690-7.
160. Whiting S, Derbyshire E, and Tiwari B. Capsaicinoids and capsinoids. A potential role for weight management? A systematic review of the evidence. *Appetite*. 2012;59(2):341-8.
161. Yoneshiro T, Aita S, Kawai Y, Iwanaga T, and Saito M. Nonpungent capsaicin analogs (capsinoids) increase energy expenditure through the

- activation of brown adipose tissue in humans. *Am J Clin Nutr*. 2012;95(4):845-50.
162. Ono K, Tsukamoto-Yasui M, Hara-Kimura Y, Inoue N, Nogusa Y, Okabe Y, Nagashima K, and Kato F. Intra-gastric administration of capsiate, a transient receptor potential channel agonist, triggers thermogenic sympathetic responses. *J Appl Physiol*. 2011;110(3):789-98.
163. Orava J, Nuutila P, Lidell ME, Oikonen V, Noponen T, Viljanen T, Scheinin M, Taittonen M, Niemi T, Enerback S, et al. Different metabolic responses of human brown adipose tissue to activation by cold and insulin. *Cell Metab*. 2011;14(2):272-9.
164. Himms-Hagen J, Melnyk A, Zingaretti MC, Ceresi E, Barbatelli G, Cinti S. 2000. Multilocular fat cells in WAT of CL-316243-treated rats derive directly from white adipocytes. *Am J Physiol Cell Physiol* 279:C670–C681.
165. Barbatelli G, Murano I, Madsen L, Hao Q, Jimenez M, Kristiansen K, Giacobino JP, De Matteis R, Cinti S. 2010. The emergence of cold-induced brown adipocytes in mouse white fat depots is determined predominantly by white to brown adipocyte transdifferentiation. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 298:E1244–E1253.
166. Wang QA, Tao C, Gupta RK, Scherer PE. 2013b. Tracking adipogenesis during white adipose tissue development, expansion and regeneration. *Nat Med* 19:1338–1344.
167. Wu J, Bostrom P, Sparks LM, Ye L, Choi JH, Giang AH, Khandekar M, Virtanen KA, Nuutila P, Schaart G, Huang K, Tu H, van Marken

- Lichtenbelt WD, Hoeks J, Enerback S, Schrauwen P, Spiegelman BM. 2012. Beige adipocytes are a distinct type of thermogenic fat cell in mouse and human. *Cell* 150:366–376.
168. Wu J, Cohen P, Spiegelman BM. 2013. Adaptive thermogenesis in adipocytes: is beige the new brown?. *Genes Dev* 27:234–250.
169. Rosenwald M, Perdikari A, Rulicke T, Wolfrum C. 2013. Bi-directional interconversion of brite and white adipocytes. *Nature Cell Bio* 15:659–667.
170. Elabd C, Chiellini C, Carmona M, Galitzky J, Cochet O, Petersen R, Penicaud L, Kristiansen K, Bouloumie A, Casteilla L, Dani C, Ailhaud G, Amri EZ. 2009. Human multipotent adipose-derived stem cells differentiate into functional brown adipocytes. *Stem Cells* 27:2753–2760.
171. Seale P, Bjork B, Yang W, Kajimura S, Chin S, Kuang S, Scime A, Devarakonda S, Conroe HM, Erdjument-Bromage H, Tempst P, Rudnicki MA, Beier DR, Spiegelman BM. 2008. PRDM16 controls a brown fat/skeletal muscle switch. *Nature* 454:961–967.
172. Seale P, Kajimura S, Spiegelman BM. 2009. Transcriptional control of brown adipocyte development and physiological function-of mice and men. *Genes Dev* 23:788–797.
173. Rajakumari S, Wu J, Ishibashi J, Lim HW, Giang AH, Won KJ, Reed RR, Seale P. 2013. EBF2 determines and maintains brown adipocyte identity. *Cell Metab* 17:562–574.
174. Seale P, Conroe HM, Estall J, Kajimura S, Frontini A, Ishibashi J, Cohen P, Cinti S, Spiegelman BM. 2011. Prdm16 determines the thermogenic program of subcutaneous white adipose tissue in mice. *J Clin Invest* 121:96–105.

175. Wickler SJ, Stern JS, Glick Z, and Horwitz BA. Thermogenic capacity and brown fat in rat sex exercise-trained by running. *Metabolism*. 1987;36(1):76-81.
176. Shibata H, and Nagasaka T. The effect of forced running on heat production in brown adipose tissue in rats. *Physiol Behav*. 1987;39(3):377-80.
177. Hirata K. Enhanced calorogenesis in brown adipose tissue in physically trained rats. *Jpn J Physiol*. 1982;32(4):647-53.
178. Oh-ishi S, Kizaki T, Toshinai K, Haga S, Fukuda K, Nagata N, and Ohno H. Swimming training improves brown-adipose-tissue activity in young and old mice. *Mech Ageing Dev*. 1996;89(2):67-78.
179. Boström P, Wu J, Jedrychowski M, Korde A, Ye L, Lo J, Rasbach K, Boström E, Choi J, Long J, et al. A PGC1- α -dependent myokine that drives brown-fat-like development of white fat and thermogenesis. *Nature*. 2012;481(7382):463-8.
180. Xu X, Ying Z, Cai M, Xu Z, Li Y, Jiang SY, Tzan K, Wang A, Parthasarathy S, He G, et al. Exercise ameliorates high-fat diet-induced metabolic and vascular dysfunction, and increases adipocyte progenitor cell population in brown adipose tissue. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*. 2011;300(5):R1115-25.
181. Seebacher F, and Glanville EJ. Low levels of physical activity increase metabolic responsiveness to cold in a rat (*Rattus fuscipes*). *PLoS One*. 2010;5(9):e13022.
182. De Matteis R, Lucertini F, Guescini M, Polidori E, Zeppa S, Stocchi V, Cinti S, and Cuppini R. Exercise as a new physiological stimulus for

- brown adipose tissue activity. *Nutr Metab Cardiovasc Dis.* 2012;23(6):582-90.
183. Lecker S, Zavin A, Cao P, Arena R, Allsup K, Daniels K, Joseph J, Schulze P, and Forman D. Expression of the Irisin Precursor FNDC5 in Skeletal Muscle Correlates with Aerobic Exercise Performance in Patients with Heart Failure. *Circ Heart Fail.* 2012;5(6):812-8
184. Timmons JA, Baar K, Davidsen PK, and Atherton PJ. Is irisin a human exercise gene? *Nature.* 2012;488(7413):E9-10; discussion E-1.
185. Huh JY, Panagiotou G, Mougios V, Brinkoetter M, Vamvini MT, Schneider BE, and Mantzoros CS. FNDC5 and irisin in humans: I. Predictors of circulating concentrations in serum and plasma and II. mRNA expression and circulating concentrations in response to weight loss and exercise. *Metabolism.* 2012;61(12):1725-38.
186. Bordicchia M, Liu D, Amri EZ, Ailhaud G, Dessi-Fulgheri P, Zhang C, Takahashi N, Sarzani R, and Collins S. Cardiac natriuretic peptides act via p38 MAPK to induce the brown fat thermogenic program in mouse and human adipocytes. *J Clin Invest.* 2012;122(3):1022-36.
187. Levin E, Gardner D, and Samson W. Natriuretic peptides. *N Engl J Med.* 1998;339(5):321-8.
188. Sengenès C, Zakaroff-Girard A, Moulin A, Berlan M, Bouloumié A, Lafontan M, and Galitzky J. Natriuretic peptide-dependent lipolysis in fat cells is a primate specificity. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol.* 2002;283(1):65.
189. Sengenès C, Berlan M, De Glisezinski I, Lafontan M, and Galitzky J. Natriuretic peptides: a new lipolytic

- pathway in human adipocytes. *Faseb J.* 2000;14(10):1345-51.
190. Birkenfeld AL, Boschmann M, Moro C, Adams F, Heusser K, Franke G, Berlan M, Luft FC, Lafontan M, and Jordan J. Lipid mobilization with physiological atrial natriuretic peptide concentrations in humans. *J Clin Endocrinol Metab.* 2005;90(6):3622-8.
191. Moro C, Polak J, Hejnova J, Klimcakova E, Crampes F, Stich V, Lafontan M, and Berlan M. Atrial natriuretic peptide stimulates lipid mobilization during repeated bouts of endurance exercise. *Am J Physiol Endocrinol Metab.* 2006;290(5):9.
192. Birkenfeld AL, Budziarek P, Boschmann M, Moro C, Adams F, Franke G, Berlan M, Marques MA, Sweep FC, Luft FC, et al. Atrial natriuretic peptide induces postprandial lipid oxidation in humans. *Diabetes.* 2008;57(12):3199-204.
193. Khan A, Cheng S, Magnusson M, Larson M, Newton-Cheh C, McCabe E, Coviello A, Florez J, Fox C, Levy D, et al. Cardiac natriuretic peptides, obesity, and insulin resistance: evidence from two community-based studies. *J Clin Endocrinol Metab.* 2011;96(10):3242-9.
194. Magnusson M, Jujic A, Hedblad B, Engström G, Persson M, Struck J, Morgenthaler N, Nilsson P, Newton-Cheh C, Wang T, et al. Low plasma level of atrial natriuretic peptide predicts development of diabetes: the prospective Malmo Diet and Cancer study. *J Clin Endocrinol Metab.* 2012;97(2):638-45.
195. Chainani-Wu N, Weidner G, Purnell D, Frenda S, Merritt-Worden T,

- Kemp C, Kersh E, and Ornish D. Relation of B-type natriuretic peptide levels to body mass index after comprehensive lifestyle changes. *Am J Cardiol.* 2010;105(11):1570-6.
196. St Peter J, Hartley G, Murakami M, and Apple F. B-type natriuretic peptide (BNP) and N-terminal pro- BNP in obese patients without heart failure: relationship to body mass index and gastric bypass surgery. *Clin Chem.* 2006;52(4):680-5.
197. de Lemos J, McGuire D, and Drazner M. B-type natriuretic peptide in cardiovascular disease. *Lancet.* 2003;362(9380):316-22.
198. Tikkanen I, Fyhrquist F, Metsärinne K, and Leidenius R. Plasma atrial natriuretic peptide in cardiac disease and during infusion in healthy volunteers. *Lancet.* 1985;2(8446):66-9.
199. Saito Y. Roles of atrial natriuretic peptide and its therapeutic use. *J Cardiol.* 2010;56(3):262-70.