

Premio Giovanni Maria Lancisi per l'Anno Accademico
2018-2019

03 novembre 2020

Tesi di Laurea: "Studio morfologico, immunoistochimico e di espressione genica del tessuto adiposo di soggetti obesi con e senza diagnosi di NAFLD" (Sintesi)

Autore: G. Cicarelli

Relatore: M.G. Cavallo

Correlatore: F. A. Cimini

Introduzione

La steatosi epatica non-alcol correlata è una condizione clinico-patologica caratterizzata da accumulo di grasso nelle cellule parenchimali del fegato; essa comprende un ampio spettro di quadri istologici quali la steatosi, la steatoepatite (NASH, Non-Alcolic Steatohepatitis) e la cirrosi^{1,2}. I meccanismi fisiopatologici alla base dello sviluppo e della progressione della NAFLD sono complessi e non ancora completamente chiariti. Negli ultimi anni è stata sempre più avvalorata la teoria della "multiple parallel hits hypothesis"³. Secondo questa teoria, l'accumulo iniziale di trigliceridi nel fegato (*first hit*) renderebbe l'organo più sensibile a diversi altri fattori, responsabili, quindi, dell'infiammazione e del danno epatico³. Dati sperimentali suggeriscono che, tra questi fattori, l'infiammazione e la conseguente disfunzione del tessuto adiposo (TA) possano svolgere un ruolo cruciale^{4, 5}. L'infiammazione del TA è una condizione patologica complessa, dovuta ad eccessivo introito calorico e al conseguente accumulo di acidi grassi. Le caratteristiche anatomopatologiche riscontrate in questa condizione sono l'ipertrofia degli adipociti, le alterazioni del compartimento stromale, l'infiltrazione macrofagica, l'espressione di citochine pro-infiammatorie, l'ipossia e la

morte adipocitaria, l'eccessiva deposizione di collagene⁶⁻⁹. Queste modificazioni conducono ad una riduzione progressiva della funzionalità dell'organo e provocano l'instaurarsi di uno stato pro-infiammatorio sistemico¹⁰⁻¹². Inoltre, l'evoluzione dell'infiammazione del TA verso la fibrosi limita la capacità dell'organo di immagazzinare lipidi e causa un aumento degli acidi grassi liberi in circolo, promuovendo così l'accumulo di questi in organi ectopici, come il fegato^{4, 5, 13, 14}. Per questo motivo sembra che il TA disfunzionale possa rappresentare il *primum movens* per lo sviluppo della steatosi epatica non alcolica (NAFLD, non-alcoholic fatty liver disease) e possa anche promuoverne l'evoluzione. In particolare, questa associazione è stata dimostrata da Duval e collaboratori che hanno studiato lo sviluppo di NAFLD in topi sottoposti ad una dieta ipercalorica per 21 settimane. Nei modelli murini, alla diagnosi di NAFLD si associavano alterazioni morfologiche del TA epididimale, come le cosiddette "crown-like structures" costituite da adipociti atrofici circondati da cellule infiammatorie¹⁵.

Sulla base di queste premesse, lo scopo di questo studio è stato quello di indagare le alterazioni morfologiche, immunoistochimiche e di espressione genica

del TA in relazione alla presenza di NAFLD in soggetti adulti obesi.

Materiali e metodi

Popolazione

Per questo studio sono stati reclutati 40 soggetti obesi tra quelli afferenti presso il Day Hospital di Endocrinologia, Dipartimento di Medicina Sperimentale, Sapienza Università di Roma, per eseguire le valutazioni cliniche precedenti all'intervento di chirurgia bariatrica.

Il protocollo di studio è stato valutato e approvato dal Comitato Etico locale e lo studio è stato condotto in conformità con le procedure delineate nella Dichiarazione di Helsinki. La firma del consenso informato da parte di tutti i partecipanti ha preceduto l'arruolamento nello studio.

Per essere eleggibili, i pazienti dovevano soddisfare i seguenti criteri di inclusione: sesso maschile o femminile, etnia caucasica, età compresa tra 18 e 65 anni, Body Mass Index (BMI) > 35 kg/m², assenza di storia attuale o passata di eccessiva assunzione di alcol definita come consumo quotidiano > 30 grammi/die nell'uomo e > 20 grammi/die nella donna, negatività sierologica per presenza di antigene di superficie dell'epatite B e anticorpi per epatite C, assenza di storia o elementi clinici compatibili con diagnosi di cirrosi epatica, insufficienza epatica cronica, insufficienza renale, scompenso cardiaco, cancro e patologie psichiatriche.

Analisi cliniche e di laboratorio

Tutti i partecipanti sono stati sottoposti a *work-up* clinico comprensivo di esame obiettivo, misurazioni antropometriche e indagini di laboratorio. Peso ed altezza sono stati misurati indossando abiti leggeri e senza scarpe. Il BMI è stato calcolato come peso in kg diviso per il quadrato dell'altezza in metri (kg/m²). La circonferenza vita (cm) è stata misurata nel punto di mezzo tra la 12a costa e

la cresta iliaca. La pressione arteriosa sistemica (sistolica, PAS; diastolica, PAD; mmHg) è stata misurata dopo cinque minuti di riposo attraverso strumento elettronico provvisto di bracciale della misura appropriata alla circonferenza del braccio del paziente, con l'arto superiore collocato all'altezza del cuore. Sono state eseguite, quindi, tre misurazioni consecutive ed è stata riportata la media della seconda e terza misurazione ai fini delle analisi statistiche.

L'intera popolazione è stata sottoposta a prelievo venoso a digiuno per la misurazione dei valori sierici di glucosio (mg/dl), emoglobina glicosilata (HbA1c, %), colesterolo totale (mg/dl), colesterolo HDL (HDL, mg/dl), trigliceridi (mg/dl), aspartato aminotransferasi (AST, IU/l) e alanina aminotransferasi (ALT, IU/l) attraverso metodiche di laboratorio standardizzate.

I livelli di colesterolo LDL (LDL, mg/dl) sono stati calcolati applicando la formula di Friedwald.

I pazienti con glicemia a digiuno <126 mg/dl sono stati sottoposti a curva da carico orale standard con 75 gr di glucosio (OGTT) e prelievi per misurazione della glicemia e dell'insulinemia ai tempi 0', 30', 60', 90', 120' minuti dall'ingestione del glucosio.

Il grado di IR e quello di secrezione insulinica sono stati stimati attraverso calcolo degli indici statici e dinamici HOMA-IR (Homeostasis Model Assessment of Insulin Resistance)¹⁶, HOMA-β¹⁶ e QUICKI¹⁶.

Biopsia e istologia epatica e del tessuto adiposo

Tutta la popolazione di studio si è sottoposta ad intervento di chirurgia bariatrica con procedura di *sleeve-gastrectomy*.

Durante la seduta operatoria sono state eseguite biopsia epatica e di TA viscerale. I frammenti di fegato e TA sono stati prelevati,

fissati in formalina durante la notte, inclusi in paraffina ed infine sezionati. La lettura delle *slide* è stata eseguita da un unico patologo esperto *blinded* per l'identità, la storia clinica e i parametri biochimici dei pazienti.

Per il tessuto epatico, è stata richiesta una lunghezza minima del campione bioptico di 15 mm o almeno la presenza di 10 spazi portali completi. Per l'istologia del fegato sono state ottenute sezioni di 3-4 μ m per colorazione con Ematossilina/Eosina e tricromica di Masson. La NASH è stata diagnosticata in base ai criteri di Brunt¹⁷ ed è stato inoltre calcolato il *NAFLD activity score* (NAS).

Lo studio istochimico e la deposizione di fibre collagene nel TA sono stati eseguiti con *fast green FCF/Sirius*. L'infiltrazione macrofagica è stata quantificata attraverso valutazione immunoistochimica dell'espressione nucleare del CD68 in relazione al numero totale dei nuclei (1:100, M0876; Dako) e le modificazioni nella densità micro-vascolare con la valutazione del CD34 (clone QBEnd/10; Leyca Biosystem, Newcastle, UK). Un doppio *immunostaining* ha permesso di identificare contemporaneamente la presenza di cellule adipocitarie apoptotiche (TUNEL assay) sul totale degli adipociti (Perilipin, ab3526; Abcam). Le cellule apoptotiche sono state identificate con kit *Apoptag plus peroxidase In Situ Apoptosis Detection* (Millipore, Merck KGaA, Darmstadt, Germany). Le biopsie di TA sono state poi classificate in base alla presenza e severità di danno infiammatorio, consistente in infiltrazione e attivazione macrofagica, apoptosi adipocitaria e fibrosi. Per approfondire lo studio dell'infiammazione nel TA sono state eseguite specifiche colorazioni immunoistochimiche con anticorpi vs Neutrin-1 (1:200, AF1109; R&D Systems), Caveolin-1 (1:500, 610059; BD Biosciences), UNC5B (1:200, ab54430; Abcam), IL-8 (1:100, LS-B2809, LS Bio IL-1b), MIP-1 α (1:150, clone 3E1, LS-C174781, LS Bio), MIP-2 (1:100, aa34-107, LS-C294368, LS Bio) e TIMP1 (1:100, aa157-188IHC-plus, LS-B10535, LS Bio).

Biologia molecolare

Nel TA è stata inoltre valutata l'espressione mRNA di un ampio pattern di molecole immuno-infiammatorie (WISP1, GrB, Neutrin1, UNC5B, Caveolin1, IL8, MIP-1 α , MIP-2, TIMP1, Caspase3, Caspase7, PARP1, HIF-1 α).

Analisi statistica

Tutte le analisi sono state eseguite impiegando il software statistico SPSS versione 23. I valori sono riportati nel testo e nelle tabelle come media \pm deviazione standard (SD) per le variabili continue e come percentuale per le variabili categoriche. I confronti tra due gruppi sono stati eseguiti attraverso l'impiego del test T di Student per le variabili continue e test χ^2 per le variabili categoriche. Le variabili non distribuite normalmente sono state sottoposte a trasformazione logaritmica naturale. La significatività delle correlazioni bivariate è stata valutata attraverso calcolo del coefficiente di Spearman o attraverso correlazioni parziali aggiustate per età e sesso. Un valore di $p < 0.05$ è stato considerato statisticamente significativo.

Risultati

Le caratteristiche cliniche e biochimiche della popolazione sono riportate nella Tab. 1. Dei 40 soggetti partecipanti allo studio sottoposti a chirurgia bariatrica, il 75% è risultato affetto da NAFLD, in particolare il 50% da steatosi epatica semplice e il 25% da NASH, mentre il restante 25% non evidenziava danno epatico. Le caratteristiche cliniche e biochimiche della popolazione in relazione alla presenza o assenza di NAFLD sono illustrate nella Tab. 2.

I pazienti affetti da NAFLD differivano significativamente dai soggetti senza NAFLD per diversi parametri tra cui: BMI (43 ± 9.5 vs 47.3 ± 5.4 kg/m², $p=0.02$), trigliceridi (133.1 ± 44.6 vs 96.9 ± 22.3 mg/dl, $p=0.03$), glicemia (101.8 ± 17.3 vs 92.5 ± 4.1 mg/dl, $p=0.02$), HbA1c (7.4 ± 1.47 vs $5.8 \pm 0.8\%$, $p=0.004$),

HOMA-IR (3.61 ± 2.1 vs 1.75 ± 0.9 , $p=0.01$), HOMA- β (170.28 ± 41.6 vs 95.98 ± 34.3 %, $p=0.02$) e ALT (33 ± 15.8 vs 17 ± 38 IU/l, $p=0.009$). Nei soggetti con diagnosi istologica di NAFLD la prevalenza di SM era significativamente maggiore rispetto ai soggetti sani ($p=0.02$) (Tab. 2).

I pazienti con NAFLD presentavano inoltre una maggiore severità del danno infiammatorio del TA all'istologia rispetto alla sottopopolazione senza NAFLD. In particolare la diagnosi di NAFLD si associava ad incrementata presenza di macrofagi CD68⁺ ($r=0.33$, $p=0.04$, Fig. 1), riduzione della densità microvascolare ($r=-0.42$, $p=0.03$) e aumentata fibrosi ($r=0.38$, $p=0.04$). La NAFLD si associava anche all'espressione nel TA di numerosi marcatori di stress, infiammazione e fibrosi tissutale come UNC5B ($r=0.58$, $p=0.02$), CASP7 ($r=0.4$, $p=0.01$), HIF1- α ($r=0.43$, $p=0.02$), IL-8 ($r=0.4$, $p=0.03$), MIP2 ($r=0.4$, $p=0.03$), WISP-1 ($r=0.35$, $p=0.04$) e GrB ($r=0.3$, $p=0.04$) (Tab. 3).

Parametri	Soggetti obesi n=40
Età	43.7 ± 9.6
Sesso (M/F)	10/30
BMI (kg/m ²)	43.6 ± 5.6
Circonferenza vita (cm)	128 ± 11.4
PAS (mmHg)	128.3 ± 16.1
PAD (mmHg)	84.8 ± 18.2
Colesterolo totale (mg/dl)	200.8 ± 29
HDL-C (mg/dl)	48.3 ± 9.8
LDL-C (mg/dl)	126.3 ± 25
Trigliceridi (mg/dl)	124 ± 42.9
Glicemia (mg/dl)	98.4 ± 29.3
HbA1c (%)	6.59 ± 2.1
HOMA-IR	4.59 ± 2.9
HOMA- β %	163.69 ± 82.1
QUICKI	0.32 ± 0.11
AST (IU/l)	22.9 ± 9.8
ALT (IU/l)	28.8 ± 15.4
Sindrome metabolica (%)	80%, 32
Diabete (% , n)	15%, 6

Tab. 1: Caratteristiche cliniche e biochimiche della popolazione

Parametri	Non NAFLD (n=10)	NAFLD (n=30)	P-value
Età (anni)	44.9 ± 9.5	43 ± 9.5	0.63
Sesso (M/F)	0/10	10/20	0.058*
BMI (kg/m ²)	47.3 ± 5.4	43 ± 9.5	0.02
Circonferenza vita (cm)	128 ± 15.5	128 ± 7.7	0.99
PAS (mmHg)	129.2 ± 12	125.1 ± 11.3	0.44
PAD (mmHg)	83.3 ± 8.7	86.2 ± 22.5	0.76
Colesterolo totale (mg/dl)	213.1 ± 33	196.7 ± 27.1	0.17
HDL-C (mg/dl)	51.6 ± 8.8	47.2 ± 10	0.28
LDL-C (mg/dl)	141.7 ± 26.7	121.2 ± 22.8	0.08
Trigliceridi (mg/dl)	96.9 ± 22.3	133.1 ± 44.6	0.03
Glicemia (mg/dl)	92.5 ± 4.1	101.8 ± 17.3	0.02
HbA1c (%)	5.8 ± 0.8	7.4 ± 1.47	0.004
HOMA-IR	1.75 ± 0.9	3.61 ± 2.1	0.01
HOMA- β %	95.98 ± 34.3	170.28 ± 41.6	0.02
QUICKI	0.31 ± 0.18	0.33 ± 0.11	0.4
AST (IU/l)	18.7 ± 5.9	24.4 ± 10.5	0.07
ALT (IU/l)	17 ± 38	33 ± 15.8	0.009
Sindrome metabolica	10%, 1	53%, 16	0.02*
Diabete (% , n)	0%, 0	20%, 6	0.15*

Tab. 2: Caratteristiche cliniche e biochimiche dei pazienti in relazione alla presenza o meno di NAFLD

*Chi-Quadro (χ^2)

	Coefficiente di Spearman	p-value
Presenza di macrofagi CD68+ nel TA	0.33	0.04
Densità microvascolare nel TA	-0.42	0.03
Fibrosi nel TA	0.38	0.04
Espressione di UNC5B nel TA	0.58	0.02
Espressione di CASP7 nel TA	0.4	0.01
Espressione di HIF1- α nel TA	0.43	0.02
Espressione di IL-8 nel TA	0.4	0.03
Espressione di MIP-2 nel TA	0.4	0.03
Espressione di WISP-1 nel TA	0.35	0.04
Espressione di GrB nel TA	0.3	0.04

Tab. 3: Correlazioni bivariate della diagnosi istologica di NAFLD

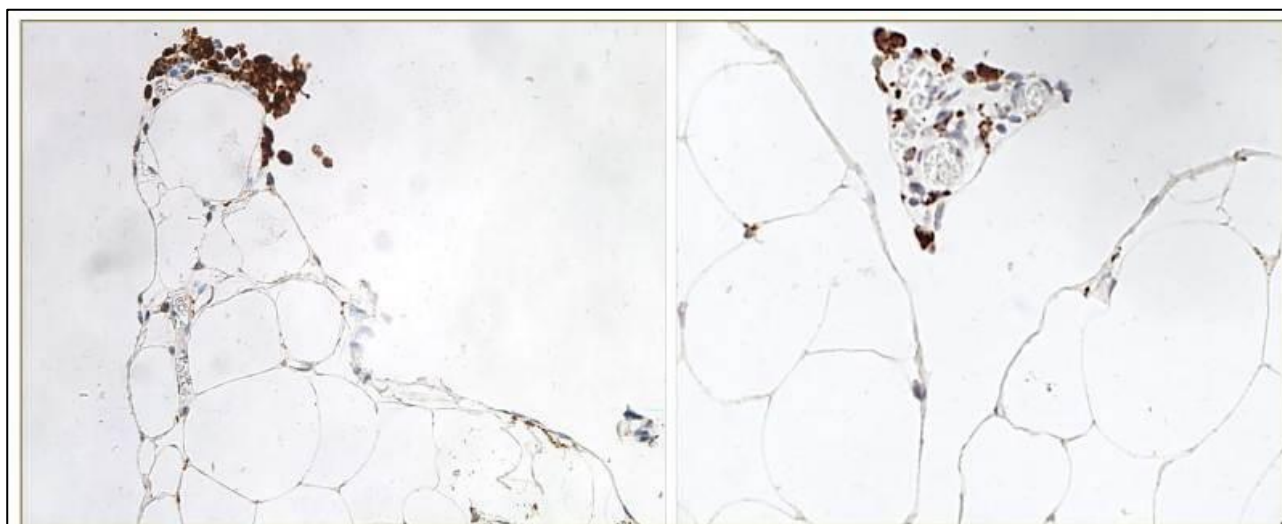


Fig. 1: Infiltrazione macrofaga CD68+ in tessuto adiposo viscerale

Discussione

Questo studio dimostra che, in soggetti obesi, la diagnosi istologica di NAFLD si associa strettamente con i parametri morfologici, immunohistochimici e di espressione genica di disfunzione del TA.

Tale associazione è stata precedentemente dimostrata in modelli murini di NAFLD il cui pannicolo adiposo epididimale presentava adipociti atrofici circondati da cellule infiammatorie, prevalentemente macrofagi, e fibrosi¹⁵. Successivamente, Du Plessis e colleghi hanno dimostrato l'associazione tra l'infiltrazione macrofagica del TA e l'espressione di geni pro-

infiammatori nel TA viscerale e sottocutaneo in soggetti con NAFLD¹⁴.

I nostri dati mostrano che la NAFLD oltre ad essere associata con un quadro morfologico caratteristico di infiammazione del TA è anche strettamente correlata con l'espressione adipocitaria di specifici marcatori di stress (CASP7, HIF1- α), infiammazione (UNC5B, IL-8, MIP2 e WISP-1) e fibrosi (GrB) del tessuto.

L'infiltrazione di macrofagi CD68⁺ nel TA dimostrava la presenza di infiammazione e disfunzione dell'organo ed è stata precedentemente associata, in modelli murini, all'infiltrazione macrofagica nel fegato

durante lo sviluppo di NAFLD, a dimostrazione della presenza di un cross-talk tra questi due organi, in corso di infiammazione^{10-12, 18, 19}. In linea con ciò, la NAFLD si associava anche all'espressione di molecole che mediano l'infiltrazione macrofagica come UNC5B e MIP2. UNC5B, infatti, stimola la ritenzione macrofagica nel TA, in risposta a neutrin-1, prodotta in condizione di aumentato accumulo di grassi^{18, 20}; MIP-2, invece, induce l'adesione endoteliale di cellule immunitarie nel TA, contribuendo all'infiammazione²¹.

La diagnosi di NAFLD si associava, poi, con l'espressione nel TA di IL-8, citochina prodotta da adipociti e cellule infiammatorie nel TA in condizione di obesità, mediatrice dell'infiammazione locale e sistemica e dell'insulino-resistenza d'organo^{22, 23}. Inoltre, per la prima volta negli uomini, abbiamo dimostrato l'espressione adipocitaria di WISP1, una nuova adipochina che inibisce la differenziazione degli adipociti e induce *pathways* infiammatori; nella nostra popolazione, la sua espressione correlava con la presenza di NAFLD^{24, 25}.

Ancora, la NAFLD si associava all'espressione di HIF-1 α , riconosciuto mediatore del segnale ipossico, e di CASP7, enzima della cascata apoptica^{26, 27}. L'ipossia partecipa alla disfunzione del TA inibendo la differenziazione degli adipociti e inducendo la polarizzazione dei macrofagi in senso pro-infiammatorio, mentre l'apoptosi riduce la riserva adipocitaria del TA, limitandone la funzionalità globale^{27, 28}. Questa condizione di ipossia e apoptosi cellulare è legata sia all'infiammazione sia all'alterata vascolarizzazione del TA, che, in queste condizioni, perde la sua normale densità vascolare²⁹. Infatti, l'ipertrofia degli adipociti non è accompagnata da una parallela e funzionale vasculogenesi, probabilmente a causa di un perduto controllo nella regolazione dei fattori angiogenici e angiostatici^{27, 30}. Nella nostra analisi, una ridotta densità microvascolare, caratteristica

di un TA disfunzionale, correlava con la presenza di NAFLD.

Infine, abbiamo dimostrato, per la prima volta nell'uomo, l'espressione nel TA di GrB, una proteasi prodotta dai macrofagi infiltranti che causa morte cellulare, produzione di citochine infiammatorie, alterata permeabilità vascolare e rimodellamento della matrice extracellulare, partecipando quindi all'infiammazione e alla fibrosi del TA³¹⁻³⁴. I livelli di GrB e la fibrosi del TA, valutata allo studio istologico, correlavano tra loro e con la diagnosi di NAFLD.

In conclusione, questo studio dimostra che nei soggetti obesi esiste una stretta associazione tra diagnosi istologica di NAFLD e presenza di disfunzione del tessuto adiposo evidenziata da alterazioni morfologiche, immunoistochimiche e di espressione genica indicative di una condizione di infiammazione, ipossia e fibrosi.

Questi dati forniscono le basi per futuri studi volti ad approfondire il nesso di causalità tra la disfunzione del TA e lo sviluppo di NAFLD in soggetti obesi, ad indagare i meccanismi alla base di tale rapporto e identificare nuove strategie di prevenzione e terapia.

BIBLIOGRAFIA

1. Bhalra N, Angulo P, van der Poorten D et al. The natural history of nonalcoholic fatty liver disease with advanced fibrosis or cirrhosis: an international collaborative study. *Hepatology* 2011; 54: 1208-16.
2. Angulo P, Lindor KD. Non-alcoholic fatty liver disease. *J Gastroenterol Hepatol* 2002; 17 Suppl: S186-90.
3. Tilg H, Moschen AR. Evolution of inflammation in nonalcoholic fatty liver disease: the multiple parallel hits hypothesis. *Hepatology* 2010; 52: 1836-46.
4. Park BJ, Kim YJ, Kim DH et al. Visceral adipose tissue area is an independent risk factor for hepatic steatosis. *J Gastroenterol Hepatol* 2008; 23: 900-7.

5. van der Poorten D, Milner KL, Hui J et al. Visceral fat: a key mediator of steatohepatitis in metabolic liver disease. *Hepatology* 2008; 48: 449-57.
6. Spalding KL, Bernard S, Näslund E et al. Impact of fat mass and distribution on lipid turnover in human adipose tissue. *Nat Commun* 2017; 8: 15253.
7. Skurk T, Mack I, Kempf K, Kolb H, Hauner H, Herder C. Expression and secretion of RANTES (CCL5) in human adipocytes in response to immunological stimuli and hypoxia. *Horm Metab Res* 2009; 41: 183-9.
8. Giordano A, Murano I, Mondini E et al. Obese adipocytes show ultrastructural features of stressed cells and die of pyroptosis. *J Lipid Res* 2013; 54: 2423-36.
9. Hosogai N, Fukuhara A, Oshima K et al. Adipose tissue hypoxia in obesity and its impact on adipocytokine dysregulation. *Diabetes* 2007; 56: 901-11.
10. Weisberg SP, McCann D, Desai M, Rosenbaum M, Leibel RL, Ferrante AW Jr. Obesity is associated with macrophage accumulation in adipose tissue. *J Clin Invest* 2003; 112: 1796-808.
11. Kang YE, Kim JM, Joung KH et al. The Roles of Adipokines, Proinflammatory Cytokines, and Adipose Tissue Macrophages in Obesity-Associated Insulin Resistance in Modest Obesity and Early Metabolic Dysfunction. *PLoS One* 2016; 11: e0154003.
12. Engin AB. Adipocyte-Macrophage Cross-Talk in Obesity. *Adv Exp Med Biol* 2017; 960: 327-43.
13. Szendroedi J, Roden M. Ectopic lipids and organ function. *Curr Opin Lipidol* 2009; 20: 50-6.
14. du Plessis J, van Pelt J, Korf H et al. Association of Adipose Tissue Inflammation With Histologic Severity of Nonalcoholic Fatty Liver Disease. *Gastroenterology* 2015; 149: 635-48.
15. Duval C, Thissen U, Keshtkar S et al. Adipose tissue dysfunction signals progression of hepatic steatosis towards nonalcoholic steatohepatitis in C57BL/6 mice. *Diabetes* 2010; 59: 3181-91.
16. Matsuda M, DeFronzo RA. Insulin sensitivity indices obtained from oral glucose tolerance testing: comparison with the euglycemic insulin clamp. *Diabetes Care* 1999; 22: 1462-70.
17. Brunt EM, Kleiner DE, Wilson LA, Belt P, Neuschwander-Tetri BA; NASH Clinical Research Network (CRN). Nonalcoholic fatty liver disease (NAFLD) activity score and the histopathologic diagnosis in NAFLD: distinct clinicopathologic meanings. *Hepatology* 2011; 53: 810-20.
18. Ramkhalawon B, Hennessey EJ, Ménager M et al. Netrin-1 promotes adipose tissue macrophage retention and insulin resistance in obesity. *Nat Med* 2014; 20: 377-84.
19. Bijnen M, Josefs T, Cuijpers I et al. Adipose tissue macrophages induce hepatic neutrophil recruitment and macrophage accumulation in mice. *Gut* 2018; 67: 1317-27.
20. Gurses KM, Ozmen F, Kocyigit D et al. Netrin-1 is associated with macrophage infiltration and polarization in human epicardial adipose tissue in coronary artery disease. *J Cardiol* 2017; 69: 851-8.
21. Rouault C, Pellegrinelli V, Schilch R et al. Roles of chemokine ligand-2 (CXCL2) and neutrophils in influencing endothelial cell function and inflammation of human adipose tissue. *Endocrinology* 2013; 154: 1069-79.
22. Bruun JM, Pedersen SB, Richelsen B. Regulation of interleukin 8 production and gene expression in human adipose tissue in vitro. *J Clin Endocrinol Metab* 2001; 86: 1267-73.
23. Kobashi C, Asamizu S, Ishiki M et al. Inhibitory effect of IL-8 on insulin action in human adipocytes via MAP kinase pathway. *J Inflamm* 2009; 6: 25.
24. Murahovschi V, Pivovarova O, Ilkavets I et al. WISP1 is a novel adipokine linked to inflammation in obesity. *Diabetes* 2015; 64: 856-66.
25. Jung TW, Kang C, Goh J et al. WISP1 promotes non-alcoholic fatty liver disease and skeletal muscle insulin resistance via TLR4/JNK signaling. *J Cell Physiol* 2018; 233: 6077-87.
26. Ke Q, Costa M. Hypoxia-inducible factor-1 (HIF-1). *Mol Pharmacol* 2006; 70: 1469-80.
27. Tinahones FJ, Coín Aragüez L, Murri M et al. Caspase induction and BCL2 inhibition in human adipose tissue: a potential relationship with insulin signaling alteration. *Diabetes Care* 2013; 36: 513-21.
28. Engin A. Adipose Tissue Hypoxia in Obesity and Its Impact on Preadipocytes and Macrophages: Hypoxia Hypothesis. *Adv Exp Med Biol* 2017; 960: 305-26.
29. Moreno-Indias I, Tinahones FJ. Impaired adipose tissue expandability and lipogenic capacities as ones of the main causes of

- metabolic disorders. *J Diabetes Res* 2015; 2015: 970375.
30. Cao Y. Adipose tissue angiogenesis as a therapeutic target for obesity and metabolic diseases. *Nat Rev Drug Discov* 2010; 9: 107-15.
31. Kim WJ, Kim H, Suk K, Lee WH. Macrophages express granzyme B in the lesion areas of atherosclerosis and rheumatoid arthritis. *Immunol Lett* 2007; 111: 57-65.
32. Buzza MS, Zamurs L, Sun J et al. Extracellular matrix remodeling by human granzyme B via cleavage of vitronectin, fibronectin, and laminin. *J Biol Chem* 2005; 280: 23549-58.
33. Voskoboinik I, Whisstock JC, Trapani JA. Perforin and granzymes: function, dysfunction and human pathology. *Nat Rev Immunol* 2015; 15: 388-400.
34. Yang H, Youm YH, Vandanmagsar B et al. Obesity increases the production of proinflammatory mediators from adipose tissue T cells and compromises TCR repertoire diversity: implications for systemic

inflammation and insulin resistance. *J Immunol* 2010; 185: 1836-45.

Sintesi della Tesi di Laurea discussa il 24 luglio 2019

Dott.ssa Gea Ciccarelli, Corso di Laurea in Medicina e Chirurgia, Facoltà di Farmacia e Medicina, "Sapienza" Università di Roma

Prof.ssa Maria Gisella Cavallo, Ricercatore Dip. Medicina Sperimentale, "Sapienza" Università di Roma

Dott.ssa Flavia Agata Cimini, Dottoranda Dipartimento di Scienze Anatomiche Istologiche Medico Legali e dell'Apparato Locomotore, "Sapienza" Università di Roma

Per la corrispondenza:
ciccarelligea@gmail.com