



SAPIENZA
UNIVERSITÀ DI ROMA

Dottorato di Ricerca in Scienze Endocrinologiche

XXXIII Ciclo – Curricula: Scienze endocrinologiche, metaboliche e andrologiche

**STUDIO DI NUOVI PATHWAYS MOLECOLARI NELLE ALTERAZIONI
DEL SEGNALE INSULINICO IN RELAZIONE ALL'OBESITÀ ED ALLE
SUE COMPLICANZE METABOLICHE**

Dottoranda

Dott.ssa Valentina Ceccarelli

Relatore

Prof.ssa Maria Gisella Cavallo

Anno accademico 2019/2020

Indice

OVERVIEW DELLA TESI.....	4
INSULINO-RESISTENZA E PATOLOGIE CORRELATE.....	6
<i>Obesità e Sindrome Metabolica.....</i>	<i>7</i>
<i>Disfunzione del tessuto adiposo e IR</i>	<i>12</i>
<i>Diabete di tipo 2.....</i>	<i>14</i>
<i>La steatosi epatica associata a malattia metabolica: da NAFLD a MAFLD</i>	<i>16</i>
BILIVERDINA REDUTTASI A	18
<i>Ruolo di BVR-A nel segnale insulinico</i>	<i>18</i>
STUDI SPERIMENTALI.....	22
ABSTRACT	24
<i>I. Studio del segnale insulinico</i>	<i>26</i>
<i>Materiali e Metodi.....</i>	<i>26</i>
<i>Risultati.....</i>	<i>29</i>
<i>II. BVR-A e malattie metaboliche</i>	<i>41</i>
<i>Materiali e Metodi.....</i>	<i>41</i>
<i>Risultati.....</i>	<i>43</i>
<i>III. BVR-A in presenza di infiammazione del VAT e NAFLD</i>	<i>45</i>
<i>Materiali e Metodi.....</i>	<i>45</i>

<i>Risultati</i>	47
DISCUSSIONE	51
CONCLUSIONI	53
BIBLIOGRAFIA	54
PUBBLICAZIONI SCIENTIFICHE SU RIVISTE INTERNAZIONALI DERIVANTI DAL PERIODO DI DOTTORATO	71
<i>a) Pubblicazioni specifiche del progetto di dottorato</i>	71
<i>b) Pubblicazioni derivanti da altri studi collaborativi</i>	72
ABSTRACTS (comunicazioni orali e/o poster con discussione) DERIVANTI DAL PERIODO DI DOTTORATO	73

OVERVIEW DELLA TESI

L'obesità è una condizione clinica in costante aumento a livello globale che rappresenta uno dei principali problemi di salute pubblica del nostro secolo ed è strettamente associata a numerosi fattori di rischio cardiovascolari come sindrome metabolica (SM), diabete di tipo 2 (DT2) e steatosi epatica non alcool correlata (NAFLD) (Van Gaal LF *et al.*, 2014). I meccanismi molecolari alla base delle alterazioni metaboliche dell'obesità sono solo parzialmente compresi e l'insulino-resistenza (IR) è stata suggerita come uno degli elementi chiave (Lee BC *et al.*, 2014; Ye J *et al.*, 2014). Nei soggetti obesi, l'eccesso energetico si accumula sotto forma di grasso nel tessuto adiposo sottocutaneo (SAT) e viscerale (VAT), inducendo cambiamenti morfologici e funzionali degli adipociti, che si accompagnano ad uno stato infiammatorio cronico, con conseguente disfunzione dell'organo adiposo (Ouchi N *et al.*, 2011; Shoelson SE *et al.*, 2007; Wellen KE *et al.*, 2003). Il VAT disfunzionale determina un'aberrante efflusso di acidi grassi liberi (FFA) e il rilascio in circolo di citochine pro-infiammatorie in grado di indurre NAFLD, infiammazione sistemica cronica di basso grado ed alterazioni del segnale insulinico (Cimini F *et al.*, 2020; Barchetta I *et al.*, 2018; Visser M *et al.*, 1999; Kershaw EE *et al.*, 2004; Shi H *et al.*, 2006; Park BJ *et al.*, 2008; Guilherme *et al.*, 2008).

Il segnale insulinico è molto complesso e non ancora completamente caratterizzato; molti dei meccanismi patogenetici noti di IR sono associati ad alterazioni a livello del substrato del recettore insulinico IRS-1 (Whitehead JP *et al.*, 1998; Saltiel AR *et al.*, 2001; Kahn BB *et al.*, 2000). Negli ultimi anni, lo studio dei fattori coinvolti nella cascata insulinica ha permesso di identificare la biliverdina reduttasi-A (BVR-A), tradizionalmente nota per il suo ruolo nella degradazione dell'EME, come fattore di regolazione del *pathway* insulinico a diversi livelli (Songyang *et al.*, 1994; Lerner Marmarosh *et al.*, 2005). Inoltre, studi condotti su modelli murini *knock-out* (KO) per BVR-A, sottoposti a *high fat diet* (HFD), mostrano alterazioni del segnale insulinico, scompenso glicometabolico ed aumentato accumulo di grasso intra-epatico rispetto ai *wild type* (Hinds TD *et al.*, 2016).

Nel loro insieme questi dati suggeriscono una funzione cruciale di BVR-A nella regolazione del segnale insulinico, ma ad oggi non esistono studi condotti sull'uomo volti ad indagare il ruolo di BVR-A nell'ambito delle malattie metaboliche correlate all'IR.

Pertanto, nella prima parte di questa tesi sono state esplorate le alterazioni molecolari del segnale insulinico, valutando l'espressione e l'attivazione di BVR-A e delle proteine coinvolte nella cascata insulinica in cellule periferiche mononucleate (PBMC) di soggetti obesi con SM rispetto a controlli non obesi, comparabili per sesso ed età (Obiettivo I).

Inoltre, è stata investigata l'associazione tra i livelli di BVR-A e i parametri molecolari, clinici e biochimici (Obiettivo II).

Infine, sono stati valutati i livelli di espressione di BVR-A nel VAT in relazione alla presenza di infiammazione locale e di NAFLD (Obiettivo III).

INSULINO-RESISTENZA E PATOLOGIE CORRELATE

L'insulino-resistenza (IR) è una condizione clinica in cui normali livelli di insulina non sono in grado di garantire l'omeostasi del glucosio, per cui è necessaria una secrezione insulinica a livelli sovra-fisiologici per mantenere lo stato euglicemico (Biddinger SB *et al.*, 2006). L' IR è strettamente connessa all'obesità e in particolar modo alla disfunzione del tessuto adiposo (TA) (Guilherme A *et al.*, 2008). L'eccessivo introito calorico infatti costituisce un fattore di stress del TA in quanto modifica i rapporti tra le popolazioni cellulari residenti e stimola l'ipertrofia e l'iperplasia degli adipociti, nonché una maggiore adipogenesi (Bastard JP *et al.*, 2006). Questi meccanismi a loro volta conducono a disfunzione del TA e ad un aumentato rilascio di acidi grassi liberi (FFA), con conseguente aggravamento della resistenza insulinica a livello epatico e muscolare. Gli FFA immessi in circolo dal TA raggiungono direttamente il fegato mediante il circolo portale, senza essere prima metabolizzati dai tessuti periferici come muscolo scheletrico e cuore (Kim JK *et al.*, 2001); così facendo gli FFA in eccesso saturano la capacità ossidativa dei sistemi biologici intraepatici (Bugianesi E *et al.*, 2005) e si accumulano come grasso ectopico a livello di organi parenchimatosi, principalmente a livello del fegato stesso (Machado MV *et al.*, 2012). Inoltre, l'aumento dei livelli sierici di FFA è in grado di inibire il trasporto e la fosforilazione del glucosio all'interno delle cellule muscolari scheletriche (Roden M *et al.*, 1996; Roden M *et al.*, 1999); quest'ultimo effetto sembra essere mediato dall'attivazione della protein-chinasi C (PKC), a sua volta in grado di interferire con il *pathway* intracellulare del segnale insulinico (Dresner A *et al.*, 1999). Contestualmente si ha una riduzione dell'afflusso di sangue agli adipociti con conseguente ipossia ed attivazione di diversi meccanismi infiammatori (Cinti S *et al.*, 2005); vengono quindi reclutati a livello del TA mediatori dell'infiammazione quali macrofagi M1, neutrofili, linfociti CD8+ e linfociti CD4+ Th1 (D'Ignazio L *et al.*, 2016). Queste modificazioni del TA conducono quindi ad un'infiammazione inizialmente locale, e successivamente sistemica, che influenza l'insorgenza dell'IR e delle alterazioni metaboliche notoriamente correlate all'obesità, quali sindrome metabolica (SM), diabete di tipo 2 (DT2) e steatosi epatica non alcool correlata (NAFLD).

Obesità e Sindrome Metabolica

L'obesità è una patologia metabolica cronica, ad eziologia multifattoriale, caratterizzata da un aumento di peso corporeo conseguente ad eccessivo accumulo di grasso. Nella pratica clinica la diagnosi di obesità si basa sulla valutazione del *Body Mass Index* (BMI), che si calcola dividendo il peso del soggetto per il quadrato della sua altezza espressa in metri. Secondo l'OMS (Organizzazione Mondiale della Sanità) negli adulti un BMI compreso tra 25 e 29.9 kg/m² è indice di sovrappeso mentre l'obesità è definita da un BMI ≥ 30 kg/m² (Yumuk V *et al.*, 2015). In particolare, si possono distinguere 3 gradi di obesità: 1° grado (BMI 30-34.9 kg/m²), 2° grado (BMI 35-39.9 kg/m²), 3° grado (BMI ≥ 40 kg/m²). Il BMI, benché accurato, è solo una misura approssimativa dell'accumulo di grasso corporeo in quanto non tiene conto della differenza tra massa magra e massa grassa e della localizzazione topografica del TA. Per ovviare a questo limite e integrare la valutazione del BMI, un elemento utile è la misura della circonferenza vita espressa in centimetri, che permette di valutare l'entità del grasso addominale e viscerale, definendo quindi la presenza di obesità centrale o androide. La distribuzione del TA di tipo androide aumenta il rischio di sviluppare complicanze cardiovascolari, sia perché si associa ad un profilo lipidico alterato (Niederauer CM *et al.*, 2006), sia perché il VAT sembra avere maggiori proprietà aterogene, a causa dell'aumentata mobilizzazione di acidi grassi e dell'elevata produzione di adipochine infiammatorie (Sherar LB *et al.*, 2011), di cui è responsabile. Il valore soglia di circonferenza vita oltre il quale aumenta il rischio di sviluppare patologie correlate all'obesità differisce secondo il genere e l'etnia; per la popolazione europea, questo valore è pari a 80 cm nella donna e a 94 cm nell'uomo (Anjom-Shoae J *et al.*, 2020).

L'obesità è una malattia metabolica in costante aumento a livello globale e rappresenta ad oggi una delle principali cause di disabilità e morte, che colpisce non solo gli adulti ma anche i bambini e gli adolescenti (Frühbeck G *et al.*, 2013). I soggetti obesi presentano infatti un rischio significativamente aumentato di sviluppare patologie cardiovascolari (Alpert MA *et al.*, 2016; Van Gaal *et al.*, 2014), IR e DT2 (Chobot A *et al.*, 2018), NAFLD (Machado MV *et al.*, 2006) e altre patologie quali cancro (Louie SM *et al.*, 2013), sindrome delle apnee ostruttive notturne (Mokhlesi B *et al.*, 2010) e deterioramento cognitivo (Misiak B *et al.*, 2012). In particolare, un'ampia metanalisi che includeva cinquantasette studi prospettici e un totale di 900.000 partecipanti, soprattutto del Nord America e dell'Europa dell'ovest, ha dimostrato che ad ogni aumento di BMI di 5 Kg/m² corrisponde un aumento della mortalità globale del 30%, della mortalità vascolare di circa il 40% , della mortalità legata al DT2, a cause epatiche e renali del 60-120%, della mortalità per neoplasia del 10% e della mortalità legata a patologie respiratorie del 20% (PSC Lancet 2009). Questa metanalisi ha inoltre

dimostrato che soggetti obesi con BMI compreso tra 30 e 35 kg/m² presentano una riduzione della sopravvivenza media di 2-4 anni, che aumenta fino a 8-10 anni nei soggetti obesi con BMI tra 40-45 kg/m² (PSC Lancet 2009). Nel 2014 circa 1.9 miliardi di persone erano sovrappeso e di queste circa 600 milioni erano obese; in assenza di strategie di prevenzione efficaci, ci si aspetta che il 60% della popolazione mondiale sarà in sovrappeso o obesa entro il 2030. Secondo il rapporto “Osservasalute2017” dell’Istituto Superiore di sanità, in Italia, nel 2016, più di un terzo della popolazione adulta (35,5%) era in sovrappeso, mentre una persona su dieci era obesa (10,4%); complessivamente, il 45,9% dei soggetti di età ≥18 anni appariva in eccesso ponderale.

La comprensione delle cause e delle modalità attraverso cui il sovrappeso e l’obesità si stanno diffondendo così rapidamente è oggetto di una sempre maggiore attenzione da parte di studiosi ed esperti. La comunità scientifica è concorde nel riconoscere l’esistenza di una patogenesi multifattoriale dell’obesità, in cui fattori genetici, fisiologici, metabolici, comportamentali e psicosociali agiscono simultaneamente. Per quanto riguarda la componente genetica, è interessante notare come diversi studi abbiano dimostrato un’elevata incidenza di obesità nei figli di genitori obesi o in sovrappeso (Serdula *et al.*, 1993; Whitaker *et al.*, 1997). Negli ultimi anni sono state utilizzate diverse strategie per consentire l’identificazione dei determinanti genetici dell’obesità e gli studi di associazione *genome-wide* hanno consentito di identificare nel genoma umano numerosi loci collegati allo sviluppo di obesità (Goodarzi MO, 2018) Ad oggi, il gene più fortemente e frequentemente connesso allo sviluppo di obesità nell’uomo è il gene FTO (*Fat mass and obesity-associated gene*) presente sul cromosoma 16; alcuni polimorfismi del gene correlano con un aumento di circa il 20-30% del rischio di obesità (Scuteri A *et al.*, 2007; Frayling TM *et al.*, 2007) e con valori di circonferenza vita, peso e BMI maggiori rispetto ai soggetti non portatori delle varianti (Oyeyemi BF *et al.*, 2017). Esistono poi delle rare forme di obesità monogenica, particolarmente gravi e generalmente ad esordio precoce, causate da mutazioni di singoli geni, che rappresentano da sole circa l’1% di tutte le forme di obesità (Kumar S *et al.*, 2017). Le più importanti sono causate da mutazioni a carico dei geni della leptina e del suo recettore (Fairbrother U *et al.*, 2018), della prooppiomelancortina (Shabana *et al.*, 2016), di MC3R (Lee YS *et al.*, 2002) e MC4R (Vaisse C *et al.*, 1998; Yeo GS *et al.*, 1998; Chambers JC *et al.*, 2008). Per quanto riguarda invece i fattori comportamentali, la cattiva condotta alimentare e la scarsa attitudine all’esercizio fisico tipiche delle società altamente industrializzate, hanno contribuito senza dubbio all’aumento della prevalenza del sovrappeso e dell’obesità.

L’aumento dell’incidenza globale dell’obesità ha comportato un parallelo aumento dell’incidenza di sindrome metabolica (SM), condizione clinica strettamente associata alla presenza di IR (Eckel RH *et al.*, 2005).

La SM è una condizione clinica caratterizzata da un insieme di fattori di rischio cardiovascolari altamente correlati e viene diagnosticata in soggetti con almeno tre anomalie metaboliche tra: obesità centrale (circonferenza vita > 102 cm nell'uomo e > 88 cm nella donna), ipertrigliceridemia (trigliceridi > 150 mg/dl), ridotti livelli di colesterolo HDL (< 40 mg/dl nell'uomo, < 50 mg/dl nella donna), ipertensione arteriosa (PAS ≥ 130 mmHg, PAD ≥ 85 mmHg) e alterata regolazione del metabolismo glucidico (glicemia a digiuno ≥ 110 mg/dl) (NCEP-ATP III, 2001). Nel 2005 l'International Diabetes Federation (IDF) ha proposto una propria definizione di SM che pone l'obesità viscerale come elemento essenziale, a cui si aggiungono altri due criteri (ipertrigliceridemia, basso colesterolo HDL, ipertensione, iperglicemia e diabete). A tutt'oggi non è possibile riuscire a stimare correttamente e precisamente la prevalenza globale di SM e delle sue complicanze poiché la variabilità interindividuale e di genere e la variabilità legata all'etnia e all'età rendono difficile la standardizzazione dei criteri diagnostici. L'indagine NHANES (*National Health and Nutrition Examination Survey*) ha stimato che la prevalenza della SM sia pari al 5% tra i soggetti di normopeso, al 22% tra i soggetti in sovrappeso ed al 60% tra i soggetti obesi (Park YW *et al.*, 2003). Inoltre, la prevalenza aumenta ulteriormente con l'età, essendo del 10% negli individui tra i 20 ed i 29 anni, del 20% negli individui di età compresa tra i 40 ed i 49 anni e del 45% negli individui di età compresa tra i 60 ed i 69 anni (Ford ES *et al.*, 2002). L'insieme delle alterazioni metaboliche che si verificano nei soggetti con SM, aumentano sia il rischio di sviluppare DT2 che il rischio di sviluppare eventi cardiovascolari maggiori (Gami AS *et al.*, 2007), ictus ischemico (Air EL *et al.*, 2007), steatosi epatica non alcol correlata (NAFLD) (Lidofsky SD, 2008) e tumore del colon (Giovannucci E, 2007). Sebbene la patogenesi della SM non sia stata ancora completamente chiarita, è stato ampiamente dimostrato lo stretto legame con la condizione di IR, a sua volta causata da alterazioni ancora non del tutto chiarite del meccanismo d'azione dell'insulina.

Fisiologicamente l'insulina svolge le sue attività biologiche attraverso il legame con il proprio recettore, rappresentato da una tirosin-chinasi espressa sulla membrana di tutte le cellule dei mammiferi, sia nei tessuti "target" dell'insulina, quali fegato, muscolo scheletrico e TA, sia in altri tessuti, quali l'endotelio (Artunc F *et al.*, 2016). Il legame dell'insulina con il recettore determina non solo l'auto-fosforilazione di quest'ultimo ma anche la fosforilazione di altre proteine intracellulari, con conseguente propagazione del segnale insulinico. Fisiologicamente si ha l'attivazione di due vie di segnalazione intracellulari: la via della fosfoinositolo-3-chinasi (PI3-chinasi) e la via della proteina-chinasi associata ai microtubuli (MAPK). Queste due vie mediano meccanismi fisiologici diversi (**Figura 1**).

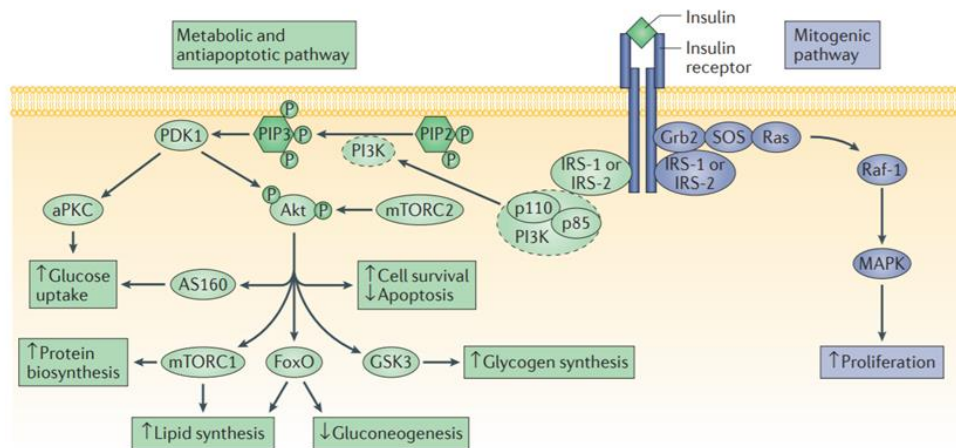


Figura 1 – Funzionamento delle vie di trasduzione del segnale mediate dall'insulina.

Modificata da Artunc F. et al., Nature Reviews Nephrology 12, 721–737 (2016)

L'attivazione della via della PI3-chinasi svolge un'azione gluco-sensibilizzante e vasodilatatrice insulino-mediata, stimolando sia la captazione di glucosio da parte dei tessuti bersaglio (Shepherd PR *et al.*, 1998) che la produzione di ossido nitrico a livello endoteliale (Zeng G *et al.*, 2000), mentre la via della MAP-chinasi svolge un ruolo principalmente pro-aterogeno essendo coinvolta nella proliferazione e nella crescita delle cellule muscolari lisce, nella migrazione dei monociti (Sasaoka T *et al.*, 1996) e nell'espressione dell'inibitore dell'attivatore del plasminogeno con conseguente effetto pro-trombotico (Takeda K. *et al.*, 2001). Nella condizione di IR si determina un difetto selettivo a carico della sola via della PI3-chinasi. Ciò determina uno sbilanciamento nella segnalazione post-recettoriale a favore della via della MAP-chinasi, che potrebbe essere responsabile delle complicanze endoteliali e vascolari che si verificano in tale condizione clinica.

Le conseguenze dell'IR sono riscontrabili principalmente a livello di fegato, tessuto muscolare e TA, con effetti sfavorevoli a carico di tutto l'organismo. I meccanismi patogenetici qui descritti sono illustrati dettagliatamente nella **Figura 2**.

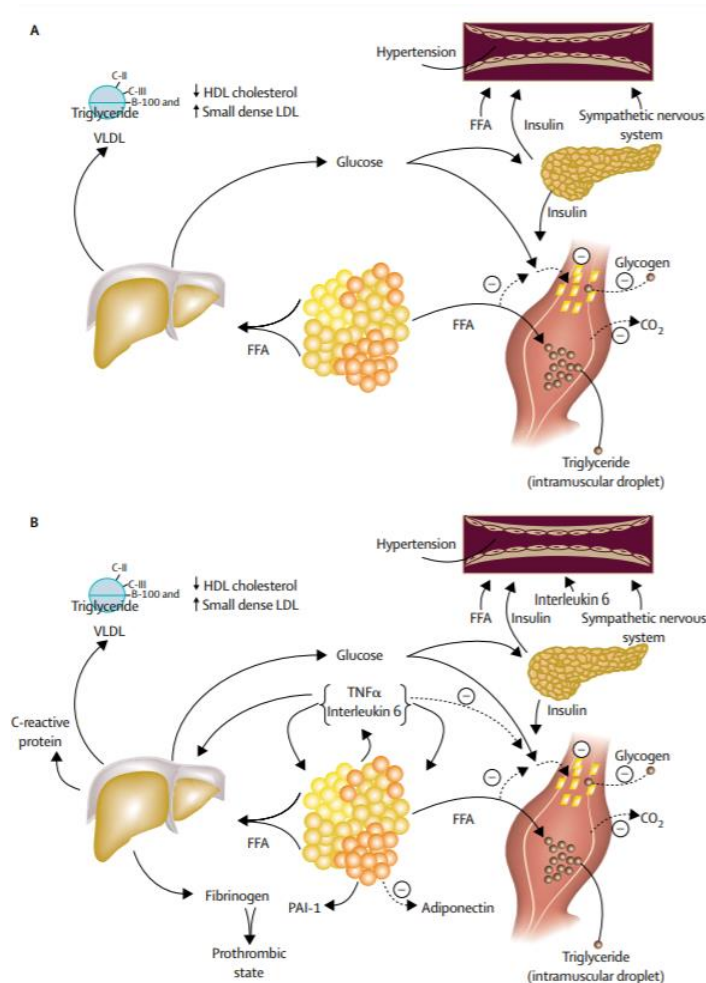


Figura 2 - Patogenesi dell'insulino-resistenza.

Modificata da Eckel et al., Lancet 365, 1415–1428 (2005)

A livello epatico, la ridotta sensibilità insulinica degli epatociti si traduce nella perdita dell'inibizione insulino-dipendente della glicogenolisi e della gluconeogenesi e nella contestuale inibizione della glicogeno-sintesi; ne consegue un aumentato rilascio epatico di glucosio.

A livello muscolare, l'IR determina la riduzione della traslocazione insulino-mediata del trasportatore del glucosio "GLUT4" dal citoplasma alla membrana plasmatica, diminuendo la captazione muscolare del glucosio e determinando scarsa capacità del miocita di utilizzare e immagazzinare il glucosio sotto forma di glicogeno (De Fronzo RA *et al.*, 2009). Questo meccanismo è alla base dell'iperglicemia postprandiale nei soggetti affetti da DT2.

A livello del TA, l'IR determina un aumento della lipolisi cui consegue un incremento del flusso di FFA in circolo. Inoltre, in condizioni di IR, l'attività enzimatica della lipoprotein-lipasi (LPL) è rallentata. Questo enzima ha la funzione di idrolizzare i trigliceridi provenienti dalle lipoproteine VLDL e di produrre acidi grassi e glicerolo, che potranno successivamente entrare nelle cellule

cardiache e muscolari scheletriche per essere ossidati tramite beta ossidazione, oppure raggiungere il TA per essere risintetizzati in trigliceridi ed essere accumulati. L'inibizione della LPL che si verifica nella condizione di IR contribuisce ulteriormente alla mobilitazione di FFA.

Disfunzione del tessuto adiposo e IR

In condizioni di eccesso calorico cronico, il TA va incontro ad alterazioni istopatologiche tipiche costituite da ipertrofia e iperplasia degli adipociti, infiltrazione macrofagica e linfocitaria, alterata vascolarizzazione del tessuto con conseguente ipossia tissutale e necrosi adipocitaria (Pasarica M *et al.*, 2009; Pellegrinelli V *et al.*, 2016), cui segue l'instaurarsi di uno stato di infiammazione cronica locale e sistemica in grado di influenzare l'insorgenza dell'IR (Wilcox G, 2005). Il TA disfunzionale è infatti responsabile di un'aberrante lipolisi sia a digiuno che nel periodo post-prandiale con conseguente aumento dell'immissione in circolo di FFA e produzione di numerose citochine pro-infiammatorie in grado di interferire con il *pathway* di segnalazione insulinica, diminuendo la sensibilità periferica all'ormone (Xu H *et al.*, 2003); le più importanti e maggiormente studiate sono TNF- α , IL-6, IL-8 e WISP-1.

In particolare, il TNF- α , prodotto dai macrofagi, agisce mediante due meccanismi (Hacker H *et al.*, 2006). In primo luogo, attraverso il legame con recettori specifici (TNFRs) presenti sugli adipociti attiva il *pathway* mediato da NF- κ B; tale via di segnale intracellulare controlla l'espressione di molteplici geni coinvolti nell'infiammazione e nell'apoptosi. In secondo luogo, TNF- α stimola la lipolisi (Porter MH *et al.*, 2002). Gli FFA rilasciati dagli adipociti apoptotici e necrotici sono in grado di agire in modo autocrino sugli adipociti vicini legando il recettore TLR4 ed attivando il *pathway* NF- κ B (Oeckinghaus A *et al.*, 2011). A livello molecolare, il TNF α aumenta la fosforilazione dei residui di serina di IRS-1 e riduce l'espressione di GLUT4, contribuendo così all'IR (Saltiel *et al.*, 2001; Kahn *et al.*, 2000). È da sottolineare, tuttavia, che tentativi di inibizione del TNF- α nell'uomo, attraverso l'utilizzo di anticorpi anti-TNF- α non hanno apportato significativi aumenti della sensibilità insulinica (Blüher M, 2014).

L'IL-6 sembra avere una duplice funzione, dipendente dal tessuto e dallo stato metabolico. Nel muscolo scheletrico, durante l'esercizio fisico, agisce per aumentare l'*uptake* di glucosio, determinando ipertrofia muscolare e miogenesi con conseguente aumento dell'ossidazione degli acidi grassi AMPK-mediata; possiede inoltre attività antinfiammatoria (Starkie R *et al.*, 2003; Kelly M *et al.*, 2004). Nel TA e nel tessuto epatico, IL-6 è invece indicata come un adipochina pro-infiammatoria. A tal proposito, IL-6 aumenta la resistenza all'insulina promuovendo l'attivazione di

SOCS3, proteina intracellulare in grado di compromettere la cascata di fosforilazioni che media il segnale insulinico inibendo la fosforilazione di IRS1 (Senn JJ *et al.*, 2002; Senn JJ *et al.*, 2003; Rotter V *et al.*, 2003). Inoltre, IL-6 correla positivamente con l'aumento del peso corporeo e con la quota di FFA circolanti (Fried SK *et al.*, 1998) mentre, la perdita di peso determina una riduzione dei livelli sierici di IL-6 (Bastard JP *et al.* 2000; Ziccardi P *et al.* 2002).

IL-8 è una citochina pro-infiammatoria secreta da diversi tipi cellulari quali adipociti, macrofagi, linfociti T, cellule endoteliali ed epiteliali (Remick DG, 2008; Baggiolini M *et al.*, 1992) ed identificata più recentemente come vera e propria adipochina (Cimini FA *et al.*, 2017). IL-8 promuove l'espressione del suo stesso mRNA all'interno degli adipociti e sembra agire su di essi mediante un meccanismo autocrino (Kobashi C *et al.*, 2009). Studi in vitro hanno dimostrato un effetto inibitorio dell'IL-8 sulla via di segnale intracellulare attivata dall'insulina; questa inibizione è mediata dalla capacità dell'IL-8 di impedire la fosforilazione di Akt. IL-8, quindi, sarebbe non solo coinvolta nel mantenimento dell'infiammazione, ma contribuirebbe direttamente a determinare l'IR, osservabile nelle malattie metaboliche (Kobashi C *et al.*, 2009). Il nostro gruppo di ricerca ha inoltre dimostrato che la presenza di elevati livelli circolanti di IL-8, che si riscontra in pazienti affetti da DT2, è associata ad un pattern infiammatorio sistemico sfavorevole, caratterizzato da aumentati livelli sierici di TNF α ed IL-6 e diminuiti livelli sierici di adiponectina e vitamina D, responsabile di un profilo glicemico e lipidico peggiore (Cimini FA *et al.*, 2017).

Recenti studi hanno dimostrato che WISP-1 (*WNT1 inducible signaling pathway protein 1*) è un'adipochina rilasciata in circolo da adipociti differenziati e positivamente associata a marcatori di infiammazione del TA quali IL-6 e TNF- α (Murahovschi V *et al.*, 2015). WISP-1 è una proteina associata alla matrice extracellulare, anche conosciuta come CCN4, e un bersaglio della cascata di segnalazione di *WNT1*. È stata identificata per la prima volta in linee cellulari tumorali, dove interviene sulla proliferazione e sullo sviluppo cellulare (Pennica D *et al.*, 1995) e la sua iper-espressione è inoltre associata a malattie infiammatorie e fibrosi (Zhang Q *et al.*, 2016; Berschneider B *et al.*, 2014; Tao H *et al.*, 2016). Inoltre, Murahovschi e collaboratori hanno dimostrato che la sua espressione è significativamente aumentata nei soggetti con IR del TA e diminuisce in seguito alla riduzione del peso (Murahovschi V *et al.*, 2015). Infine, livelli circolanti di WISP-1 risultano aumentati anche in altre condizioni associate ad IR, come il diabete gestazionale e la sindrome dell'ovaio policistico (Sahin Ersoy G *et al.*, 2017; Sahin Ersoy G *et al.*, 2017).

Diabete di tipo 2

Il diabete di tipo 2 (DT2) è una malattia metabolica cronica caratterizzata dall'associazione, in misura variabile, di IR e deficit relativo della secrezione insulinica (American Diabetes Association, Diabetes Care 2017). Rappresenta il 90-95% dei casi di diabete ed interessa più di 400 milioni di individui in tutto il mondo, numero che sembra essere destinato a raddoppiare nel 2035 (Guariguata L *et al.*, 2014); in Italia la prevalenza del diabete ha superato il 5,3% (ISTAT, Annuario Statistico Italiano 2016).

Il DT2 è una patologia eterogenea a patogenesi multifattoriale, che riconosce quindi una base genetica sulla quale agiscono fattori acquisiti e/o ambientali. L'importanza della componente genetica è dimostrata dalla maggiore concordanza di sviluppo della malattia nei gemelli monozigoti (concordanza pari al 90%) rispetto a quelli dizigoti (concordanza pari al 30-50%). Inoltre, familiari di primo grado di pazienti diabetici hanno un aumento di 2-4 volte del rischio di sviluppare la malattia. Il DT2 deve essere considerato una malattia poligenica (Prasad RB *et al.*, 2015); a tal proposito, diversi geni, quali quelli codificanti per i trasportatori del glucosio (GLUT 1, 2 e 4), per il recettore insulinico e per l'insulina stessa, sono stati chiamati in causa per spiegare il determinismo della malattia in maniera differente nei differenti individui (Gaulton KJ *et al.*, 2015; Basile KJ *et al.*, 2014; Morris AP *et al.*, 2012)

Lo stile di vita occidentale, caratterizzato da eccessivo introito calorico e sedentarietà, e l'urbanizzazione dei Paesi in via di sviluppo, che ha portato cambiamenti drammatici nelle abitudini alimentari anche in queste zone un tempo a minor prevalenza di DT2, ha aumentato notevolmente i fattori di rischio per lo sviluppo di malattie metaboliche. L'eccesso ponderale, la localizzazione prevalentemente centrale dell'adipe, la dieta iperlipidica, la scarsa attività fisica, il fumo di sigaretta e l'assunzione di farmaci quali glucocorticoidi, diuretici tiazidici e beta-bloccanti, sono infatti tutte condizioni in grado di ridurre la sensibilità insulinica (Guariguata L *et al.*, 2014).

Infine, la presenza di uno stato infiammatorio cronico di basso grado sembra essere un fattore di rischio indipendente per lo sviluppo di DT2. Alcuni studi hanno dimostrato che aumentati livelli basali di citochine pro-infiammatorie (Spranger J *et al.*, 2003), di chemochine (Herder C *et al.*, 2005) e di altri marcatori indiretti di infiammazione come fibrinogeno, acido sialico e attivatore tissutale del plasminogeno-1 (Duncan BB *et al.*, 2003; Festa A *et al.*, 2002) correlano con l'incidenza di DT2, indipendentemente dal grado iniziale di IR e obesità. In particolare, la diagnosi di DT2 si associa ad aumentati livelli circolanti di interleuchina-1 β (IL-1 β), IL-6, TNF- α e proteina C reattiva (PCR), che

rappresenta il principale predittore di malattia cardiovascolare nei soggetti affetti da DT2 (Donath MY *et al.*, 2011; Makki K *et al.*, 2013).

L'IR e la disfunzione β cellulare sono i principali fattori fisiopatologici alla base del DT2 (Taylor *et al.*, 2013), sebbene queste alterazioni contribuiscano in tempi diversi allo sviluppo della malattia conclamata. Nella storia naturale del DT2, l'IR è presente anni prima che le alterazioni a carico del metabolismo glucidico siano visibili. In questa fase, una normale omeostasi glicemica è mantenuta grazie ad un aumento della secrezione di insulina da parte delle cellule β pancreatiche; tuttavia, con il passare del tempo, la funzione β cellulare viene progressivamente meno. Quando le cellule β divengono incapaci di soddisfare le elevate richieste imposte dall'IR, compare una prima fase di ridotta tolleranza ai carboidrati, seguita dallo sviluppo della malattia conclamata (**Figura 3**).

I meccanismi patogenetici alla base dell'IR e i suoi effetti a livello dei principali organi insulino-sensibili sono stati descritti in dettaglio nel primo paragrafo.

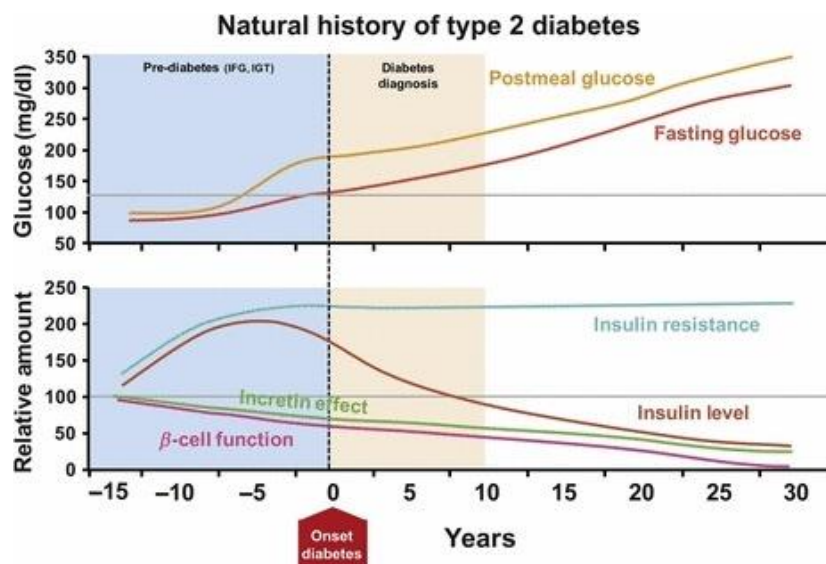


Figura 3 – Storia naturale del DT2.

Modificata da Tobin et al., Int J Clin Pract, 66, 1147–1157 (2012)

La steatosi epatica associata a malattia metabolica: da NAFLD a MAFLD

La steatosi epatica non-alcol correlata (*Non-Alcolic Fatty Liver Disease*, NAFLD) fa riferimento ad un ampio spettro di condizioni clinico-istologiche caratterizzate da accumulo intra-epatocitario di trigliceridi, con possibile evoluzione dalla steatosi semplice alla steatoepatite (Non-Alcolic SteatoHepatitis, NASH) con una componente fibrosa più o meno rilevante fino alla cirrosi e all'epatocarcinoma (McCullough AJ *et al.*, 2004; Farrell GC *et al.*, 2006; Bhala N *et al.*, 2011; Angulo P *et al.*, 2002). Gli studi condotti negli ultimi 20 anni hanno mostrato chiaramente che la NAFLD è la manifestazione epatica di un disordine metabolico sistemico e ultimamente un gruppo di esperti internazionali ha proposto di modificarne il nome in MAFLD (*Metabolic Associated Fatty Liver Disease*) (Eslam M *et al.*, 2020). La diagnosi di MAFLD richiede la presenza di steatosi epatica accompagnata da almeno una tra le seguenti anomalie metaboliche: sovrappeso/obesità, diabete di tipo 2 (DT2) o evidenza di disfunzione metabolica (Eslam M *et al.*, 2020).

La MAFLD è la più frequente patologia epatica cronica nel mondo e rappresenta oggi un problema di salute pubblica (Loomba R *et al.*, 2013); la sua incidenza è notevolmente aumentata negli ultimi decenni, parallelamente alla crescente prevalenza di obesità e DT2. Nei Paesi Occidentali è presente nel 20-30% della popolazione generale (Chalasani N *et al.*, 2012) e aumenta drammaticamente nei soggetti dismetabolici, fino a raggiungere il 69% nei soggetti affetti da DT2 e oltre il 90% nei soggetti con obesità severa (Chalasani N *et al.*, 2012).

La biopsia epatica rappresenta il metodo diagnostico più accurato per differenziare la steatosi semplice dalla NASH e per stabilire la severità del danno epatico e la presenza di fibrosi, sebbene l'elevata invasività di tale metodica, accompagnata da un aumento del rischio di morbilità e mortalità e dagli elevati costi, non ne renda possibile l'utilizzo come metodo di *screening* nella popolazione generale (Chalasani N *et al.*, 2012; Wieckowska A *et al.*, 2008). Per ovviare a questo problema, nella pratica clinica è quindi utilizzato il dosaggio delle transaminasi epatiche (AST, aspartato-transferasi e ALT, alanina-transferasi) (Wieckowska A *et al.*, 2007), sebbene così facendo si rischi di sottostimare la reale presenza di danno epatico, poiché in circa il 50% dei pazienti con MAFLD i livelli ematici di ALT e AST risultano nella norma (Bellentani S *et al.*, 2010). Inoltre, uno studio condotto da Mofrad e collaboratori ha dimostrato che il quadro istologico epatico caratteristico della MAFLD è visibile in pazienti con normali livelli plasmatici di ALT (Mofrad P *et al.*, 2003); generalmente un rapporto AST/ALT >1 è in grado di predire la severità dell'accumulo intra-epatico di grasso e la presenza di fibrosi in stadio avanzato (Angulo P *et al.*, 1999). La tecnica d'*imaging* non

invasiva più comunemente utilizzata è l'ultrasonografia; il riscontro di iperecogenicità del parenchima epatico è indice della presenza di steatosi. Tuttavia, la sensibilità di questo strumento diagnostico è fortemente influenzata dall'infiltrazione intra-epatica di grasso e diminuisce drasticamente quando questa è minore o uguale al 30%. Inoltre, in presenza di obesità severa la sensibilità di tale metodica è inferiore al 40%, probabilmente a causa di difficoltà tecniche nella sua esecuzione (Wieckowska A *et al.*, 2007).

Il meccanismo patogenetico principale implicato nello sviluppo di MAFLD è rappresentato dall'IR (Bhala N *et al.*, 2011; Brunt EM *et al.*, 1999). La MAFLD è infatti considerata l'epifenomeno epatico della sindrome metabolica, attribuibile all'aberrante lipolisi a livello del TA insulino-resistente con conseguente incremento del flusso di FFA al fegato. Gli FFA in eccesso saturano i sistemi biologici ossidativi intraepatici (Bugianesi E *et al.*, 2005) e si accumulano come grasso ectopico a livello di organi parenchimosi, principalmente a livello del fegato stesso, portando allo sviluppo di steatosi (Machado MV *et al.*, 2012). A livello epatico, inoltre, l'IR determina accumulo dei trigliceridi promuovendone la sintesi *de novo* (Browning JD *et al.*, 2004). L'iperinsulinemia determina d'altro canto un ridotto efflusso dei trigliceridi e un contestuale aumento della sintesi degli acidi grassi, sopprime la produzione epatica di glucosio e ne incrementa l'*uptake* (Evans RM *et al.*, 2004). Tutte queste alterazioni interferiscono con la fosforilazione del recettore insulinico (Schattenberg JM *et al.*, 2005), contribuendo quindi all'IR.

La teoria patogenetica più accreditata per spiegare l'insorgenza della MAFLD è stata proposta da Tilg e Moschen (Tilg H *et al.*, 2010) ed è rappresentata dall'ipotesi dei "multiple parallel hits". Secondo questa teoria, la deposizione intra-epatocitaria dei trigliceridi rappresenta il "first hit" e determina alterazioni metaboliche e molecolari che rendono il fegato sensibile all'insulto di ulteriori fattori, che agiscono sinergicamente e parallelamente nel determinare la progressione del danno epatico dalla steatosi semplice allo sviluppo di infiammazione, fino ad arrivare alla fibrosi e al quadro istopatologico della NASH (Day CP *et al.*, 1998; Farrell GC *et al.*, 2006). L'accumulo dei lipidi e l'esposizione prolungata agli FFA sono infatti in grado di promuovere la produzione di radicali liberi dell'ossigeno (ROS), la risposta cellulare allo stress ossidativo e il rilascio di numerose citochine pro-infiammatorie. Inoltre, la perossidazione degli FFA indotta dalla presenza di ROS determina un danno diretto a carico degli epatociti, perpetuando il processo infiammatorio.

BILIVERDINA REDUTTASI A

La biliverdina reduttasi (BVR) è un enzima ubiquitario del corpo umano, localizzato prevalentemente nei macrofagi, nel fegato e nella milza. Questo enzima è tradizionalmente conosciuto per il suo ruolo nel *pathway* di degradazione dell'EME, dove converte la biliverdina in bilirubina. Se ne conoscono due isoforme, biliverdina reduttasi A (BVR-A) e B (BVR-B), entrambe codificate dallo stesso gene. BVR-B è l'isoforma espressa principalmente durante la vita embrionale mentre la BVR-A rappresenta la forma espressa dopo lo sviluppo fetale (O' Brien L *et al.*, 2015). BVR riduce il doppio legame dell'anello pirrolico della biliverdina permettendone l'apertura; questa reazione consuma una molecola di NADPH e produce una molecola di bilirubina e una molecola di NADP⁺. Il sito catalitico dell'enzima si trova nella sua porzione C-terminale (Kutty RK *et al.*, 1981).

I siti di legame presenti negli isoenzimi BVR consentono una vasta gamma di interazioni con diversi mediatori appartenenti a vie di segnale metabolicamente importanti, come protein-chinasi, molecole dell'infiammazione e la chinasi associata al recettore insulinico.

BVR è stata inoltre studiata in virtù della sua capacità di traslocare nel nucleo cellulare e fungere da fattore di trascrizione per diversi geni coinvolti nella risposta allo stress ossidativo (Ahmad Z *et al.*, 2002; Tudor C *et al.*, 2008). La sua porzione C-terminale comprende infatti il dominio *basic-leucine-zipper* (bZip), la sequenza di localizzazione nucleare (NLS) e le sequenze di esportazione nucleare (NES) che sono necessarie per la traslocazione nel nucleo e il legame alle regioni regolatorie del DNA (Tudor C *et al.*, 2008; Ahmad Z *et al.*, 2002).

Ruolo di BVR-A nel segnale insulinico

L'analisi della struttura primaria e secondaria di BVR-A ha permesso di identificarne l'attività di proteina regolata da tirosin-chinasi (Kikuchi A *et al.*, 2001).

La struttura amminoacidica di BVR include la sequenza Y198MKM che nelle proteine substrato del recettore insulinico (IRS) funge da sito di legame per altre proteine che fanno parte del messaggio insulinico, come PI3K (Songyang Z *et al.*, 1994).

Uno studio condotto da Lerner-Marmarosh e collaboratori ha dimostrato che la BVR-A è substrato della chinasi associata al recettore insulinico (IRK) (Lerner-Marmarosh N *et al.*, 2005). A tal proposito, studi in vitro hanno dimostrato che in presenza di IRK, l'attivazione di BVR-A è rintracciabile dopo circa 1h di osservazione e aumenta gradualmente fino a 4 ore; il periodo di latenza necessario all'attivazione di BVR-A riflette il tempo necessario all'attivazione di IRK (Lerner-

Marmarosh N *et al.*, 2005). Inoltre, tramite l'utilizzo di anticorpi anti-residui di fosfotirosina, lo stesso studio ha dimostrato che la BVR-A viene fosforilata su specifici residui di tirosina; il trattamento delle colture cellulari con IRK aumentava il legame di BVR-A agli anticorpi mentre l'utilizzo di un inibitore delle chinasi come EDTA lo diminuiva (Lerner-Marmarosh N *et al.*, 2005).

L'analisi *western-blot* ha identificato il residuo di tirosina in posizione 198 (Y198) come principale target della fosforilazione di BVR-A ad opera di IRK; tuttavia mutazioni puntiformi a carico di questo sito, sebbene riducevano l'attivazione di BVR-A di circa il 70 % rispetto alle cellule *wild-type*, non impedivano completamente la fosforilazione di BVR-A da parte di IRK, in virtù della presenza di altri residui di fosforilazione, successivamente identificati in Y228 e Y291. La BVR-A presenta inoltre siti di autofosforilazione diversi dai siti che vengono fosforilati da IRK; i siti principalmente coinvolti nell'autofosforilazione sono infatti Y72 e Y83 (Lerner-Marmarosh N *et al.*, 2004).

Nello stesso studio condotto da Marmarosh e collaboratori è stato valutato inoltre il ruolo di BVR-A come mediatore del segnale insulinico. È stato dimostrato che IRS-1 è substrato dell'attività chinasi di BVR-A. A seguito delle evidenze ottenute, il possibile ruolo di BVR-A nel *pathway* intracellulare insulinico è stato indagato valutando l'attività di BVR-A in cellule trattate con insulina e il conseguente *uptake* di glucosio nella cellula. È stato osservato che l'attività di BVR-A aumentava di circa due volte entro 1h dal trattamento con insulina per tornare a livelli basali entro 6h; l'aumento dell'attività enzimatica di BVR-A era conseguente ad un aumento della sua fosforilazione da parte di IRK, e la presenza di residui tirosinici fosforilati era rintracciabile nelle stesse cellule già dopo 8 minuti dal trattamento con insulina (Lerner-Marmarosh N *et al.*, 2004).

Si pensa che l'attivazione di BVR-A possa in qualche modo influenzare il messaggio insulinico, regolandolo. A tal proposito, in colture cellulari in cui era stato indotto un deficit di BVR-A, mediante *knockout* del gene o mediante l'utilizzo di RNA interferenti l'attività di BVR-A, il segnale insulinico era trasmesso in maniera migliore rispetto alle colture cellulari di controllo (Lerner-Marmarosh N *et al.*, 2004).

Alcuni importanti chiarimenti sul ruolo di BVR-A nella trasmissione del segnale insulinico sono giunti da studi eseguiti nell'ambito delle patologie neurodegenerative.

Studi volti ad indagare gli effetti dell'insulina sulle cellule cerebrali hanno mostrato che il segnale insulinico porta ad un *uptake* di glucosio cerebrale inferiore rispetto a quello periferico (Wolf A *et al.*, 2012), sebbene sembri regolare funzioni altrettanto importanti. In particolare, l'attivazione del *pathway* di PI3K è coinvolta nella plasticità sinaptica e nel consolidamento della memoria (Horwood JM *et al.*, 2006) e l'attivazione della via delle MAPK è responsabile della crescita sinaptica, dei processi di riparazione e della plasticità sinaptica a livello ippocampale, svolgendo quindi un ruolo importante nei processi di memoria e apprendimento (Akter K *et al.*, 2011). Inoltre, studi post-mortem

su soggetti affetti da malattia di Alzheimer (AD) hanno mostrato una disregolazione del segnale insulinico nelle cellule cerebrali (Steen E *et al.*, 2005; Rivera EJ *et al.* 2005; Talbot K *et al.*, 2012). In particolare, il cervello dei pazienti con AD è caratterizzato da un processo noto come insulino-resistenza cerebrale, definito come un' inadeguata risposta all'insulina (Born J *et al.*, 2002) in seguito ad una riduzione dell'attivazione del recettore insulinico (IR) e un aumento dei meccanismi di fosforilazione inibitoria a carico di IRS-1 su specifici residui di serina.

Alcuni studi hanno ipotizzato che un deficit dell'attività di BVR-A possa essere alla base dei meccanismi cellulari responsabili di insulino-resistenza cerebrale (Barone E *et al.*, 2011). BVR-A è un substrato diretto di IR che ne attiva la funzione tramite fosforilazione su residui di tirosina. Una volta attivata, BVR-A fosforila su residui di serina il substrato IRS-1, inattivandolo. Inoltre, BVR-A sembra essere coinvolta anche nello stress ossidativo tipico delle cellule cerebrali dei pazienti con AD. In particolare, lo stress nitrosativo è in grado di diminuire la fosforilazione dei residui di tirosina di BVR-A aumentando invece i residui di 3-nitrotirosina, in grado di alterare la normale attività della BVR-A (Barone E *et al.*, 2011)

Uno studio condotto da Barone e collaboratori nel 2015 su modelli murini di Alzheimer ha indagato le fasi e i meccanismi di insorgenza di insulino-resistenza cerebrale. I topi sono stati osservati in tempi diversi e continui (3, 6, 12 e 18 mesi) e sono stati valutati i livelli di attivazione e inattivazione dei mediatori intracellulari del segnale insulinico, in particolare IRK, IRS-1, BVR-A e mTOR (Barone E *et al.*, 2015).

Nelle fasi iniziali di AD, le cellule ippocampali murine presentavano una diminuzione della concentrazione di IR esposto sulla membrana plasmatica, compensata da una sua maggiore attivazione, tale da non comportare alterazioni a carico dell'attivazione di IRS1. Più tardivamente, a 6 e 12 mesi, era possibile osservare l'insorgenza di uno stato non costante di insulino-resistenza cerebrale, caratterizzato da una riduzione dei livelli di IR e IRS1 attivati. Infine, a 18 mesi era possibile riscontrare uno stato consolidato di insulino-resistenza cerebrale, caratterizzato da elevati livelli di IRS1 fosforilato su specifici residui di serina e quindi inattivato. Queste osservazioni sono state affiancate dallo studio contestuale dei livelli di BVR-A nelle stesse cellule. Inizialmente, a 6 mesi, l'aumento dei livelli di IRS1 attivato corrispondeva ad una riduzione dei livelli di BVR-A attivata, mentre successivamente, a 12 mesi, la continua inattivazione di BVR-A si associava ad una riduzione dei livelli di IRS-1. In base a queste osservazioni, è possibile ipotizzare che un ridotto controllo di IRS-1 da parte di BVR-A è inizialmente associato ad un'iperattivazione di IRS-1 mentre successivamente determina l'instaurarsi di un meccanismo di *feedback* negativo che spegne l'attività di IRS-1 e conduce ad uno stato di insulino-resistenza cerebrale (Barone E *et al.*, 2015).

Questo studio ha inoltre dimostrato come un deficit di BVR-A sia inevitabile col procedere dell'età. A tal proposito, in topi di 18 mesi, i livelli di BVR-A coniugata a molecole di stress nitrosativo con conseguente deficit, erano significativamente aumentati rispetto a topi più giovani. Lo studio ha permesso anche di far luce, almeno in parte, sul meccanismo di *feedback* negativo alla base dell'inattivazione di IRS-1. È noto infatti che una stimolazione persistente a carico di mTOR è in grado di determinare la fosforilazione di IRS1 sui residui di serina inibitori (Copps KD *et al.*, 2012) e che un'attivazione di mTOR è spesso presente nelle cellule di soggetti affetti da AD (Caccamo A *et al.*, 2010). Barone e collaboratori hanno dimostrato che diminuiti livelli di BVR-A attivata si associavano ad aumentati livelli di mTOR e di IRS-1 fosforilato in senso inibitorio. Questo è stato osservato sia in cellule *knock-out* per BVR-A sia in cellule in cui era stata indotta l'inattivazione di BVR-A mediante stress ossidativo (Barone E *et al.*, 2015).

Infine, un elegante studio condotto da Gibbs e collaboratori ha dimostrato che l'utilizzo di un peptide contenente la sequenza amminoacidica presente nella porzione C-terminale di BVR-A era in grado di stimolare il messaggio insulinico intracellulare (Gibbs PE *et al.*, 2014). In particolare, esperimenti condotti su colture cellulari umane hanno dimostrato che questa molecola è in grado di legare la proteina IRK e di aumentare l'attivazione di IRK e di altri fattori inclusi nel *signalling* insulinico come PI3K e Akt con conseguente aumento dell'*uptake* di glucosio (Gibbs PE *et al.*, 2014; Gibbs PE *et al.*, 2016).

Il meccanismo di azione di BVR-A nel segnale insulinico è mostrato in **Figura 4**.

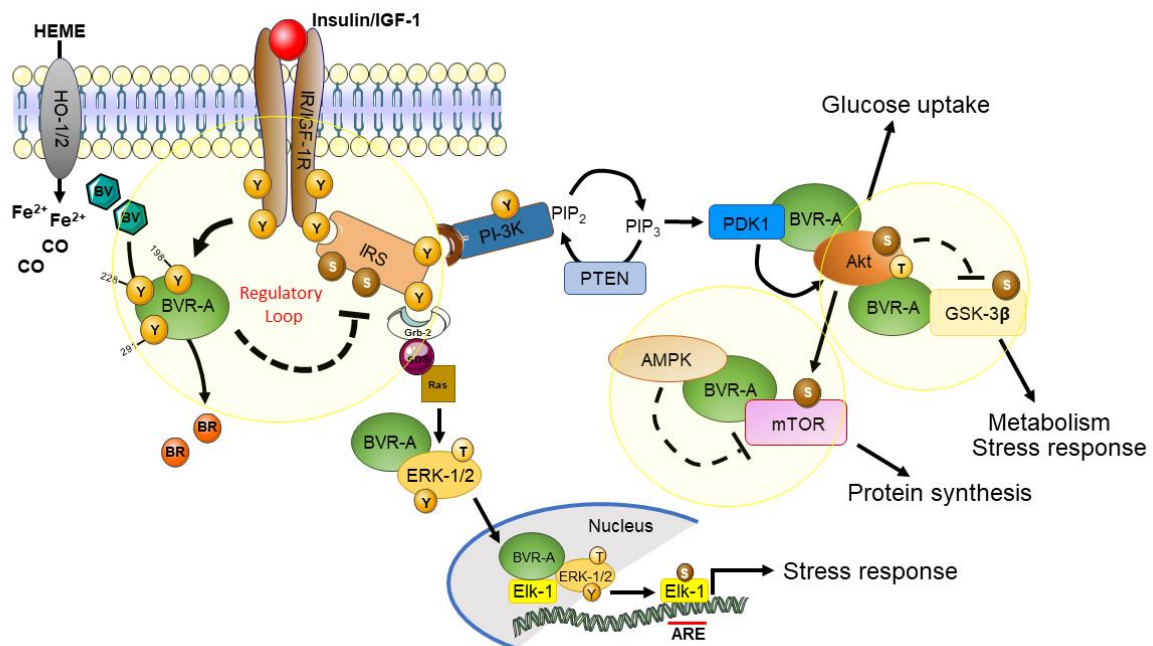


Figura 4 – Meccanismo di azione di BVR-A nella cascata del segnale insulinico.

STUDI SPERIMENTALI

L'obesità è associata ad uno stato di infiammazione cronica di basso grado che origina verosimilmente nel tessuto adiposo (TA). In condizioni di eccesso calorico ed espansione della massa grassa, il TA infiltrato da macrofagi e altri leucociti, rilascia in circolo elevate quantità di acidi grassi liberi (FFA) (Guilherme A *et al.*, 2008) e citochine pro-infiammatorie, in grado di indurre un'alterazione del segnale insulinico (Trayhurn P *et al.*, 2004; Yudkin JS *et al.*, 2003).

Il segnale insulinico è complesso e non ancora completamente caratterizzato. Il legame dell'insulina al suo recettore (IRK) determina l'attivazione del substrato del recettore insulinico (IRS-1), da cui dipendono due principali cascate chinasiche: la via delle MAP-chinasi implicata nella regolazione della trascrizione genica di fattori di crescita cellulare (White MF *et al.*, 2003) e la via della fosfatidilinositolo-3-chinasi (PI3K)/AKT che consente la traslocazione dei trasportatori di glucosio (GLUT4) sulla membrana plasmatica (Okada T *et al.*, 1994).

Studi condotti in modelli murini (Yamauchi T *et al.* 1996) e nell'uomo (Whitehead JP *et al.*, 1998) hanno dimostrato che la patogenesi dell'insulino-resistenza (IR) è strettamente associata ad alterazioni a livello di IRS-1. In particolare, lo stress ossidativo, il rilascio in circolo di citochine pro-infiammatorie (TNF- α , IL-6) e l'aberrante efflusso di FFA promuovono la fosforilazione di IRS-1 su residui inibitori di serina, spegnendo il segnale insulinico (Whitehead JP *et al.*, 1998; Saltiel AR *et al.*, 2001; Kahn BB *et al.*, 2000).

In questo contesto, recentemente, studi condotti in vitro hanno dimostrato che la biliverdina reduttasi-A (BVR-A) è un bersaglio diretto di IRK e agisce come fattore di regolazione a più livelli della cascata insulinica (Lerner Marmarosh N *et al.*, 2005; Kapitulnik J *et al.*, 2009; Gibbs PE *et al.*, 2014). Inoltre, Barone e collaboratori hanno dimostrato che la BVR-A è implicata nell'insorgenza di IR cerebrale. A tal proposito, in modelli murini di Alzheimer, alterazioni nella funzione di BVR-A si associano dapprima ad iperattivazione di IRS-1, cui segue una riduzione della forma attivata di IRS-1, probabilmente a seguito dell'attivazione di meccanismi di *feedback negativo* sul segnale insulinico (Barone E *et al.*, 2015).

L'insieme di questi dati suggerisce un ruolo cruciale di BVR-A nella regolazione della cascata insulinica, pertanto questo studio ha avuto lo scopo di valutare i livelli di espressione e di attivazione di BVR-A e di tutte le proteine del segnale insulinico nelle cellule periferiche di soggetti obesi con sindrome metabolica, e studiarne i correlati clinici, biochimici e molecolari.

Inoltre, considerando la stretta associazione esistente tra disfunzione del TA, alterazioni del segnale insulinico e dismetabolismo, questo studio ha poi voluto valutare l'espressione di BVR-A nel TA di

soggetti obesi e indagarne la possibile associazione con marcatori di compromissione metabolica e infiammazione del TA.

ABSTRACT

Razionale. La biliverdina reduttasi-A (BVR-A), enzima tradizionalmente conosciuto per il suo ruolo nella degradazione dell'EME, è stata recentemente studiata nell'ambito dei meccanismi di regolazione della sensibilità insulinica. Ad oggi non esistono studi relativi al ruolo di BVR-A nel contesto dell'obesità nell'uomo; pertanto, questo studio ha avuto lo scopo di valutare l'espressione e l'attivazione di BVR-A e delle altre componenti della cascata insulinica in soggetti obesi e studiarne i correlati clinici, biochimici e molecolari. Inoltre, questo studio ha voluto valutare l'espressione di BVR-A nel tessuto adiposo (TA) di soggetti obesi e indagarne la possibile associazione con marcatori di compromissione metabolica e infiammazione del TA.

Metodi. Per questo studio sono state reclutate due popolazioni:

I. Per lo studio del segnale insulinico sono stati selezionati 20 soggetti obesi candidati alla chirurgia bariatrica e 20 controlli.

II. Per la valutazione dell'espressione di BVR-A nel TA sono stati reclutati 38 soggetti obesi che si sottoponevano a valutazioni cliniche preliminari all'intervento di chirurgia bariatrica.

Entrambe le popolazioni sono state sottoposte a *work-up* clinico e prelievo venoso a digiuno per esami ematochimici di routine. Nella popolazione I, la valutazione dei livelli di espressione e attivazione di BVR-A e delle proteine del segnale insulinico IR, IRS1, AKT, GSK3b e mTOR è stata eseguita mediante *western-blot* nelle cellule polimorfonucleate (PBMC) dei soggetti obesi e dei controlli. Nella popolazione II l'espressione di BVR-A è stata valutata su biopsie di TA viscerale mediante *real-time* PCR. In tutti i soggetti obesi, l'infiammazione del TA e epatico è stata valutata mediante immunostochimica e valutazione dell'espressione genica di specifici marcatori di infiammazione, ipossia, apoptosi e fibrosi tissutale.

Risultati.

Popolazione I. I soggetti obesi presentavano ridotti livelli di espressione e attivazione di BVR-A e aumentata attivazione del segnale insulinico a livello di IRS1 e dell'asse AKT/GSK3 β rispetto ai controlli. A valle di tutto questo, i soggetti obesi presentavano aumentati livelli di espressione e di esposizione di GLUT4. Nei soggetti obesi, ridotti livelli di BVR-A correlavano con aumentati trigliceridi, BMI, circonferenza vita e con la diagnosi di sindrome metabolica (SM) e il numero di componenti della SM. Inoltre, ridotti livelli di BVR-A si associavano alla diagnosi e alla gravità della steato-epatite non alcool correlata (NASH) e a caratteristiche di infiammazione del TA, quali una maggiore espressione adipocitaria di UNC5B e di WISP-1. Dopo chirurgia bariatrica i pazienti mostravano livelli di BVR-A comparabile ai controlli e ripristino del segnale insulinico a livello di IRS1 e dell'asse AKT/GSK3 β .

Popolazione II. La popolazione in studio è stata stratificata in due sottogruppi, sotto e sopra il valore mediano dell'espressione di mRNA di BVR-A (*low* e *high* BVR-A, rispettivamente). I soggetti appartenenti al gruppo *low* BVR-A presentavano livelli di GGT e prevalenza di NAFLD significativamente più alti rispetto a quelli appartenenti al gruppo *high* BVR-A. Gli individui appartenenti al gruppo *low* BVR-A presentavano un *odds ratio* per NAFLD di 1.38; ridotti livelli di espressione di BVR-A nel TA erano in grado di predire la presenza di NAFLD con AUROC = 0.89. I pazienti appartenenti al gruppo *low* BVR-A presentavano un aumento significativo dell'espressione di IL-8 e Caspase 3 nel TA rispetto agli individui appartenenti al gruppo *high* BVR-A.

Conclusioni. Questo studio dimostra che ridotti livelli di BVR-A si associano ad obesità, alterazioni precoci del segnale insulinico e indicatori clinici di insulino-resistenza. Inoltre, ridotti livelli di espressione di BVR-A nel TA si associano a NAFLD, dismetabolismo e infiammazione del TA. Questi dati suggeriscono un possibile coinvolgimento della BVR-A non solo nella regolazione del segnale insulinico ma anche nella regolazione dell'omeostasi del TA e dei processi infiammatori in presenza di obesità.

I. Studio del segnale insulinico

Studi in vitro e su modelli murini di obesità hanno dimostrato che la biliverdina reduttasi-A (BVR-A) è un substrato del recettore dell'insulina (IR) che ne promuove la funzione Ser/Thr/Tyr chinasi attraverso la quale BVR-A regola l'attivazione di IRS1, favorendo la corretta trasduzione del segnale insulinico. Nella prima parte di questa tesi sono state indagate le alterazioni molecolari del segnale insulinico, valutando l'espressione e l'attivazione periferica di BVR-A e delle proteine coinvolte nella cascata insulinica in soggetti obesi con sindrome metabolica (SM) rispetto a controlli non obesi, comparabili per sesso ed età.

Materiali e Metodi

Popolazione

Per questo studio sono stati selezionati 20 soggetti obesi, senza diagnosi di DT2, 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. Sono stati inoltre arruolati 20 soggetti non obesi, metabolicamente sani, comparabili per sesso ed età, come gruppo di controllo.

Studio del segnale insulinico

La valutazione dei livelli di espressione di BVR-A, e delle proteine IR, IRS1, AKT, GSK3b, mTOR, GLUT-4 è stata eseguita in cellule periferiche mononucleate (PBMC) estratte da sangue venoso, prelevato a digiuno.

L'isolamento delle PBMC è stato eseguito mediante centrifugazione di sangue intero a $800 \times g$ per 30 minuti; lo strato superiore contenente plasma è stato rimosso. Il sangue rimanente è stato diluito con uguale volume di soluzione salina tamponata con fosfato pH 7,4 (PBS), contenente 0,05 M di acido etilendiamminotetraacetico (EDTA, Invitrogen). 12,5 ml di sangue diluito sono stati prelevati e stratificati su 25 ml di Ficoll-Paque PLUS (GE Healthcare). Il campione così ottenuto è stato centrifugato a $400 \times g$ per 30 minuti a temperatura ambiente. Le PBMC sono state accuratamente rimosse pipettando e lavando con PBS-EDTA per centrifugazione a $250 \times g$ per 10 minuti. Le PBMC sono state poi sospese in tampone di lisi ammoniacale-cloruro-potassio (ACK) (Invitrogen) e la lisi dei globuli rossi contaminanti (RBC) è stata ottenuta incubando le PBMC per 10 minuti a temperatura

ambiente con una miscelazione delicata; al termine della reazione, il campione è stato lavato con PBS-EDTA. Il numero di cellule e la vitalità sono state determinate usando un contatore di cellule automatizzate Contessa (Invitrogen). Le PBMC sono state risospese in siero fetale di vitello (FCS; Invitrogen) contenente il 10% di dimetilsolfossido (DMSO; Thermo Fisher Scientific) e crioconservate in azoto liquido fino al momento dell'analisi.

Estratti proteici totali sono stati preparati in tampone RIPA (pH 7,4) contenente Tris-HCl (50 mM, pH 7,4), NaCl (150 mM), 1% NP-40, 0,25% di sodio desossilolato, EDTA (1 mM), 0,1% SDS, addizionato con inibitori delle proteasi [fenilmetilsolfonil fluoruro (PMSF, 1mM), fluoruro di sodio (NaF, 1mM) e sodio ortovanadato (Na₃VO₄, 1mM)]. Le PBMC sono state omogeneizzate con 20 passaggi con omogeneizzatore di tessuto Wheaton e poi chiarificate mediante centrifugazione per 1 ora a 16.000 × g a 4°C. Il sopranatante è stato quindi estratto per determinare la concentrazione proteica totale mediante il saggio Bradford (Pierce, Rockford, IL).

L'estrazione di RNA dalle PBMC è stata eseguita utilizzando il kit di estrazione per RNA totale del tessuto secondo le istruzioni del produttore (Fisher Molecular biology, Roma, Italia). L'RNA è stato quantificato utilizzando lo spettrofotometro Biospec Nano (Shimadzu, Columbia, MD, USA) e successivamente retro-trascritto utilizzando il kit cDNA ad alta capacità (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) secondo le istruzioni del produttore. Il cDNA è stato prodotto attraverso una serie di cicli del termociclatore OPTIMAX MultiGene a 96 pozzetti (LabNet International, Edison, NJ, USA). I *primers* usati per la valutazione dell'espressione genica di BVR-A sono: Fw 5'-CGAAGGAACAGACAGGAGA-3' e Rv 5'-GGAAAGAGCATCCTCCAAAGA-3'. Per le reazioni di PCR effettuate in una macchina PCR Real Time PC CFX (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA) è stato utilizzato un volume di reazione di 20 µl. Successivamente sono state calcolate le concentrazioni relative di mRNA dal punto di partenza delle reazioni (ciclo soglia, Ct) utilizzando il metodo di quantificazione comparativa eseguito dal software Bio-Rad e basato sul metodo $-\Delta\Delta Ct$. I valori Ct per l'espressione GAPDH (Fw 5'-GACAGTCAGCCGCATCTTCT-3' e Rv 5'-TTAAAAGCAGCCCTGGTGAC-3') sono serviti come segnale normalizzante (REF Livak KJ, Schmittgen TD).

Per l'analisi *immunoblot*, i gel sono stati trasferiti su membrane di nitrocellulosa (Bio-Rad, Hercules, CA, USA) successivamente fissate con albumina di siero bovino al 3% in soluzione salina tamponata allo 0,5% Tween-20 / Tris (TTBS) e incubate durante la notte a 4 ° C con i seguenti anticorpi: anti-BVR-A (1: 1000, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA, # B8437), anti-phospho Tyr198 -BVR-A (1: 500, Biomateck, Wilmington, DL, USA, # SA170103), anti-IRβ (1: 1000, Cell signaling, Bioconcept,

Allschwill, Switzerland, # 3020), anti-phospho (Tyr1158 / 1162/1163) -IR β (1: 1000, Genetex, Irvine, CA, USA, n. GTX25681), anti-IRS1 (1: 1000, Cell signaling, Bioconcept, Allschwill, Switzerland, n. 3407), antiphospho (Ser307) -IRS1 (1: 500, Cell Signing, Bioconcept, Allschwill, Svizzera, n. 2381), antiphospho (Tyr632) -IRS1 (1: 500, Santa Cruz, Santa Cruz, CA, USA, # sc-17196), anti-Akt (1: 1000, Cell Signing, Bioconcept, Allschwill, Svizzera, n. 11E7), antiphospho (Ser473) -Akt (1: 1000, Cell signaling, Bioconcept, Allschwill, Svizzera, # 193H12), anti-GSK-3 (1: 1000, Santa Cruz, Santa Cruz, CA, USA, # sc-377213), anti-fosfo (Ser9) -GSK-3 (1: 500, Santa Cruz, Santa Cruz, CA, USA, # sc-373800), antiphospho (Tyr216) -GSK-3 (1: 500, Santa Cruz, Santa Cruz, CA, USA, # sc-135653), anti-mTOR (1: 1000, Cell signaling, Bioconcept, Allschwill, Switzerland, # 2983), anti-phospho (Ser2448) -mTOR (1: 500, Cell signaling, Bioconcept, Allschwill, Switzerland, # 5536), anti-GLUT4 (1: 1000, Santa Cruz, Santa Cruz, CA, USA, # sc-53566), anti-AS160 (1: 1000, Thermo Fischer, Waltham, MA, USA), anti-phospho (Thr642) -AS160 (1: 1000, GeneTex, Irvine, CA, Stati Uniti D'America). Dopo 3 lavaggi con TTBS le membrane sono state incubate per 60 minuti a temperatura ambiente con anticorpi secondari IgG anti-coniglio / topo / capra coniugati con perossidasi di rafano (1: 5000; Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA). Le membrane sono state sviluppate con il substrato chemiluminescente Super Signal West Pico (Thermo Scientific, Waltham, MA, USA); il segnale è stato acquisito con Chemi-Doc MP (Bio-Rad, Hercules, CA, USA) e analizzato utilizzando il software Image Lab (Bio-Rad, Hercules, CA, USA) che consente di normalizzare il segnale specifico della proteina relativamente alle proteine totali caricate sul gel.

Analisi statistica

Tutte le analisi sono state eseguite impiegando il software statistico SPSS versione 23 (IBM, Armonk, NY). 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 utilizzando test t di Student per campioni indipendenti e i test di Pearson χ^2 e Fisher per variabili categoriche. Le variabili che non seguono una distribuzione normale sono state sottoposte a trasformazione logaritmica naturale. Le analisi di correlazione bivariata sono state eseguite mediante correlazioni di rango di Pearson e Spearman. Il valore predittivo dei livelli di BVR-A per l'obesità è stato stimato calcolando l'area sotto la curva (AUROC), con un intervallo di confidenza al 95% (C.I.). Un valore $p < 0.05$ è stato considerato statisticamente significativo.

Il protocollo è stato approvato dal Comitato Etico del Policlinico Umberto I, Sapienza Università di Roma e lo studio è stato condotto in conformità con i principi della Dichiarazione di Helsinki. Il consenso informato è stato ottenuto da tutti i pazienti prima dello studio.

Risultati

Riduzione dei livelli di BVR-A nei soggetti obesi

Per valutare se eventuali alterazioni nei livelli di espressione e attivazione di BVR-A siano associate alla presenza di obesità e SM, abbiamo indagato le differenze (i) nei livelli di espressione di BVR-A, (ii) nella fosforilazione di Tyr198 e (iii) nel rapporto pTyr198BVR-A/BVR-A considerato indice di attivazione della proteina, in PBMC di soggetti obesi rispetto ad una popolazione di controllo. Le caratteristiche cliniche e biochimiche della popolazione in studio sono mostrate in **Tabella 1**.

I soggetti obesi presentavano una riduzione dei livelli di mRNA BVR-A di circa il 50% ($p = 0.045$, Figura 1C) e una riduzione dei livelli di proteina BVR-A del 60% ($p < 0.0001$, Figura 1D). Inoltre, abbiamo osservato una riduzione del 35% di pTyr198BVR-A ($p = 0.032$, Figura 1E), che è uno dei siti della fosforilazione di BVR-A mediata da IR. Quando è stata valutata l'attivazione relativa della proteina, andando a valutare la forma attiva (pTyr198BVR-A) rispetto ai livelli di proteina totale in ciascun gruppo, abbiamo evidenziato che il rapporto pTyr198BVR-A/BVR-A era significativamente più alto nei pazienti obesi rispetto ai controlli ($\sim 400\%$, $p = 0,018$, Figura 1F).

Iper-attivazione del segnale insulinico nei soggetti obesi

Per comprendere nel dettaglio quale fosse l'impatto di una riduzione dei livelli di BVR-A sull'attivazione del *pathway* insulinico, abbiamo valutato le variazioni dei livelli di proteina e dello stato di attivazione di alcuni dei principali componenti del segnale dell'insulina nei PBMC isolati da soggetti obesi e in quelli isolati dai soggetti di controllo. Non sono state osservate variazioni significative dei livelli e dell'attivazione di IR nei due gruppi di soggetti analizzati. A valle di IR, i soggetti obesi presentavano una riduzione significativa dei livelli totali di IRS1 ($\sim 30\%$, $p=0.017$, Figura 2E) e della sua isoforma inattiva fosforilata a livello della Ser307 ($p^{\text{Ser307}}\text{IRS1}$, $\sim 40\%$, $p=0.003$, Figura 2G), mentre non abbiamo osservato variazioni significative dell'isoforma attiva fosforilata a livello della Tyr632 ($p^{\text{Tyr632}}\text{IRS1}$). L'analisi della quantità relativa di ciascuna isoforma rispetto ai livelli totali di proteina IRS1 non ha mostrato variazioni significative per quanto riguarda il rapporto $p^{\text{Tyr632}}\text{IRS1}/\text{IRS1}$ (Figura 2H); al contrario, una riduzione significativa è stata osservata per il rapporto $p^{\text{Ser307}}\text{IRS1}/\text{IRS1}$ ($\sim 40\%$, $p=0.05$, Figura 2I). Al netto di queste variazioni, nei soggetti obesi, il rapporto tra i livelli normalizzati di isoforma attiva rispetto a quelli di isoforma inattiva [$(p^{\text{Tyr632}}\text{IRS1}/\text{IRS1})/(p^{\text{Ser307}}\text{IRS1}/\text{IRS1})$, Tyr632/Ser307] risultava significativamente aumentato ($\sim 200\%$, $p=0.019$, Figura 2L). Poiché le fosforilazioni della BVR-A a livello della Tyr198 e di IRS1 a livello della Tyr632 sono mediate da IR abbiamo normalizzato i livelli della isoforma attiva della BVR-A e di IRS1 rispetto ai livelli dell'isoforma attiva di IR, $p^{\text{Tyr198}}\text{BVR-A}/\text{pIR}$ e $p^{\text{Tyr632}}\text{IRS1}/\text{pIR}$,

rispettivamente. I nostri dati mostrano un aumento significativo sia del rapporto $p^{\text{Tyr}198}\text{BVR-A/pIR}$, ($p=0.02$, Figura 2M) che del rapporto $p^{\text{Tyr}632}\text{IRS1/pIR}$ ($p=0.02$, Figura 2N). Inoltre, è stata osservata una riduzione di circa il 70% dei livelli totali della proteina Akt ($p<0.001$, Figura 3B) e di circa il 60% della sua isoforma attiva ($p^{\text{Ser}473}\text{Akt}$, $p<0.001$, Figura 3C). Al netto di queste variazioni, abbiamo osservato un aumento statisticamente significativo del rapporto tra isoforma attiva di Akt e livelli di proteina totale ($p^{\text{Ser}473}\text{Akt}/\text{Akt}$, ($\sim 70\%$, $p=0.03$, Figura 3D). Al fine di valutare quale fosse l'impatto delle variazioni di Akt sulle proteine a valle del segnale insulinico, abbiamo analizzato lo stato di attivazione delle proteine GSK3- β e mTOR, entrambi target molecolari di Akt. I nostri dati mostrano che soggetti obesi presentano livelli totali di GSK-3 β significativamente ridotti rispetto a controlli ($\sim 60\%$, $p<0.001$, Figura 3E). Inoltre, in accordo con l'aumentata attivazione di Akt, è stata osservata una riduzione significativa dei livelli dell'isoforma attiva di GSK-3 β ($p^{\text{Tyr}216}\text{GSK-3}\beta$) accompagnata da un aumento significativo dei livelli della sua isoforma inattiva ($p^{\text{Ser}9}\text{GSK-3}\beta$). Anche in questo caso, le variazioni relative di ciascuna isoforma rispetto ai livelli totali di proteina mostrano un aumento significativo di entrambi i rapporti ($p^{\text{Tyr}216}\text{GSK-3}\beta/\text{GSK-3}\beta$, $p=0.01$ e $p^{\text{Ser}9}\text{GSK-3}\beta/\text{GSK-3}\beta$, $p=0.01$). Al netto di queste differenze, nei soggetti obesi, il rapporto tra i livelli normalizzati di isoforma attiva e di isoforma inattiva [$(p^{\text{Tyr}216}\text{GSK-3}\beta/\text{GSK-3}\beta)/(p^{\text{Ser}9}\text{GSK-3}\beta/\text{GSK-3}\beta)$] mostra una riduzione significativa rispetto ai controlli. Al contrario non sono state osservate alterazioni significative a carico della proteina mTOR.

Aumento dei livelli di GLUT4 e della sua traslocazione nei soggetti obesi

Per valutare se l'iper-attivazione del segnale insulinico osservata nei soggetti obesi abbia comportato variazioni dei livelli e della traslocazione sulla membrana plasmatica del trasportatore di glucosio insulino-sensibile GLUT4, abbiamo successivamente valutato sia i livelli e l'attivazione di AS160, in grado di mediare la traslocazione di GLUT4, sia i livelli totali di GLUT4. I soggetti obesi mostravano una riduzione del 50% dei livelli di proteina AS160 ($p < 0,01$, Figura 4B) insieme ad un aumento significativo ($\sim 80\%$, $p < 0,05$, Figura 4C) della forma attiva AS160 ($p^{\text{Thr}642}\text{AS160}$). Queste variazioni risultavano in un aumento statisticamente significativo dell'attivazione relativa di AS160 valutata come rapporto $p^{\text{Thr}642}\text{AS160} / \text{AS160}$ ($\sim 300\%$, $p < 0,001$, Figura 4D). Infine, nei soggetti obesi, è stato evidenziato un parallelo aumento dei livelli di proteina GLUT4 rispetto alla popolazione di controllo ($\sim 25\%$, $p = 0,02$, Figura 4E).

Associazione tra ridotti livelli di BVR-A e iper-attivazione del segnale insulinico nei soggetti obesi

Per supportare l'ipotesi che una riduzione dei livelli di BVR-A favorisca l'iper-attivazione del *signalling* insulinico osservata nei pazienti obesi, abbiamo valutato l'esistenza di una possibile associazione diretta tra i livelli di BVR-A e l'attivazione della cascata insulinica. In particolare, abbiamo indagato sia l'attivazione di BVR-A e IRS1 mediata da IR a monte del segnale insulinico, sia l'espressione di GLUT4 e l'attivazione di AS160 a valle. I nostri dati confermano che i livelli di proteina BVR-A erano negativamente correlati sia con l'attivazione di BVR-A mediata da IR ($r = -0,61$, $p = 0,0001$, Figura 4F) sia con (ii) l'attivazione di IRS1 ($r = -0,35$, $p = 0,037$, Figura 4G). Questi dati sono in accordo con l'esistenza di una correlazione positiva evidenziata tra i livelli BVR-A e pSer307IRS1 ($r = 0,45$, $p = 0,005$, Figura 4H). Inoltre, i livelli di BVR-A correlavano negativamente con l'attivazione di AS160 ($r = -0,42$, $p = 0,01$, Figura 4I) e con i livelli di GLUT4 ($r = -0,33$, $p = 0,04$, Figura 4L). Infine, l'attivazione prolungata di BVR-A e IRS1 si associava positivamente ai livelli di GLUT4 (per pTyrBVR-A/pIR: $r = 0,56$, $p = 0,0008$ Figura 4M; per pTyrIRS1/pIR: $r = 0,3$, $p = 0,07$, Figura 4N) e all'attivazione di AS160 (per pTyrIRS1/pIR: $r = 0,38$, $p = 0,04$, Figura 4O). I nostri dati suggeriscono che una riduzione dei livelli di BVR-A corrisponde ad un'iperattivazione del segnale insulinico, caratterizzata da un aumento dell'attivazione di IRS1, che a sua volta si traduce in una maggiore traslocazione di GLUT4 sulla membrana plasmatica. Parallelamente, l'aumentata attivazione di BVR-A mediata da IR suggerisce che le cellule compensino la consistente perdita di BVR-A promuovendo la fosforilazione di BVR-A.

Ripristino dei livelli di BVR-A e del segnale insulinico dopo chirurgia bariatrica

In un sottogruppo di sette pazienti obesi, 6 mesi dopo l'intervento di chirurgia bariatrica, sono stati valutati i cambiamenti nei livelli di BVR-A e delle proteine della cascata insulinica già valutate al *baseline*. Dopo l'intervento chirurgico, i livelli di BVR-A sono risultati raddoppiati ($p < 0,001$, Figura 5B) ed è stato osservato un aumento statisticamente significativo anche dei livelli di IRS1 (~ 110%, $p = 0,02$, Figura 5C), della fosforilazione attivatoria di IRS1 (~ 350%, $p = 0,007$, Figura 5D) e dell'attivazione relativa di IRS1 (~ 115%, $p = 0,01$, Figura 5H). Questi cambiamenti si associavano inoltre ad una migliore attivazione del segnale a valle. A tal proposito, è stato osservato un aumento significativo dei livelli di Akt (~ 60%, $p = 0,04$, Figura 6B) e della fosforilazione attivatoria di Akt (~ 40%, $p = 0,05$, Figura 6C), insieme ad una riduzione dell'attivazione relativa di Akt, che è tornata paragonabile a quella misurata nei controlli (Figura 6D). A valle di Akt, abbiamo riscontrato un recupero della fosforilazione attivatoria di GSK-3 (~ 80%, $p = 0,0002$, Figura 6E), senza modifiche nei livelli della proteina, accompagnato da un miglioramento del rapporto GSK-3 Tyr216/Ser9 (~ 80

%, $p = 0.02$, Fig. 6L). Infine, abbiamo osservato una riduzione dei livelli di proteina AS160 (~ 50%, $p = 0.04$, Figura 6M) e della sua forma attiva (~ 110%, $p = 0.02$, Figura 6N), senza significativi cambiamenti nell'attivazione relativa di AS160 (Figura 6O). Non sono stati osservati cambiamenti nei livelli totali di GLUT4 (Figura 6P).

Ad integrazione dei dati riportati sono in corso di valutazione i livelli di espressione e di attivazione di BVR-A e delle altre proteine coinvolte nel segnale insulinico in risposta a carico di glucosio nei PBMC di soggetti obesi con SM, in funzione dei livelli di insulinemia, del grado di tolleranza glucidica e di insulino-resistenza (IR) del paziente. Per questo scopo è in corso il reclutamento di 10 soggetti obesi insulino-resistenti e di 10 soggetti di controllo comparabili per sesso ed età.

I partecipanti allo studio sono stati/saranno sottoposti a curva da carico orale di glucosio a sei punti (nei tempi 0', +30', +60', +90', +120', +180') e i livelli di espressione e di attività della proteina BVR-A e delle altre proteine coinvolte nel segnale insulinico saranno valutati ai vari punti della curva glicemica, in relazione ai livelli di insulinemia ed agli indici dinamici di IR e secrezione β cellulare. I dati preliminari ottenuti sui primi soggetti valutati mostrano una variazione dei livelli di BVR-A ai vari punti della curva glicemica corroborando l'ipotesi che la modulazione della BVR-A possa giocare un ruolo cruciale nell'omeostasi del glucosio (Figura 7A). Inoltre, nei soggetti sani, la riduzione dei livelli di BVR-A è significativamente associata ad un aumento dei livelli di insulinemia ai vari punti della curva da carico orale di glucosio ($r = -0.79$, $p = 0.05$), mentre questa associazione sembra essere totalmente persa nel soggetto obeso insulino-resistente (Figura 7B). Infine, nessuna correlazione è stata riscontrata tra livelli di BVR-A e glicemia ai vari punti della curva. Sebbene il reclutamento dei soggetti sia ancora in corso e sia necessaria l'analisi di un maggiore numero di campioni, questi dati preliminari supportano un ruolo fondamentale della BVR-A nella regolazione del segnale insulinico e suggeriscono che la BVR-A possa rappresentare un nuovo bersaglio molecolare da indagare per comprendere meglio le alterazioni del segnale insulinico che si verificano in corso di obesità e dismetabolismo.

	Obesi (n=20)	Controlli (n=20)	P-value
Età (anni)	40.7 ± 9.1	46.5 ± 12.6	0.06
Sesso (M%)	7/13	5/15	0.33
BMI (Kg/m ²)	42.8±4.8	23.3±2.7	<0.001
Peso (kg)	114.7±15.4	65.3±12	<0.001
Circonferenza vita (cm)	128.9±10.9	83.2±11	<0.001
PAS (mmHg)	127.3±20.4	116±15.6	0.06
PAD (mmHg)	80.6±5.8	75±10.9	0.07
Colesterolo totale (mg/dl)	195.4±28.1	184±54.3	0.43
HDL-C (mg/dl)	46.4±11.5	64.9±16.2	<0.001
LDL-C (mg/dl)	121.2±22-6	101.4±44.3	0.10
Trigliceridi (mg/dl)	138.9±35	134±43.1	<0.001
FBG (mg/dl)	94.1±12.4	87.9±8.25	0.09
AST (IU/l)	25.3±11.4	21±6.4	0.20
ALT (IU/l)	30.6±16.1	21.5±9.3	0.06
SM (yes/no)	95%	0%	<0.001
SM (# componenti)	0= 0% 1= 0% 2= 5% 3= 5% 4= 74% 5= 16%	0= 90% 1= 0% 2= 10% 3= 0% 4= 0% 5= 0%	<0.001
BVR-A	38.7±29.3	100±36.7	<0.001

Tabella 1 - Parametri clinici e biochimici della popolazione in studio.

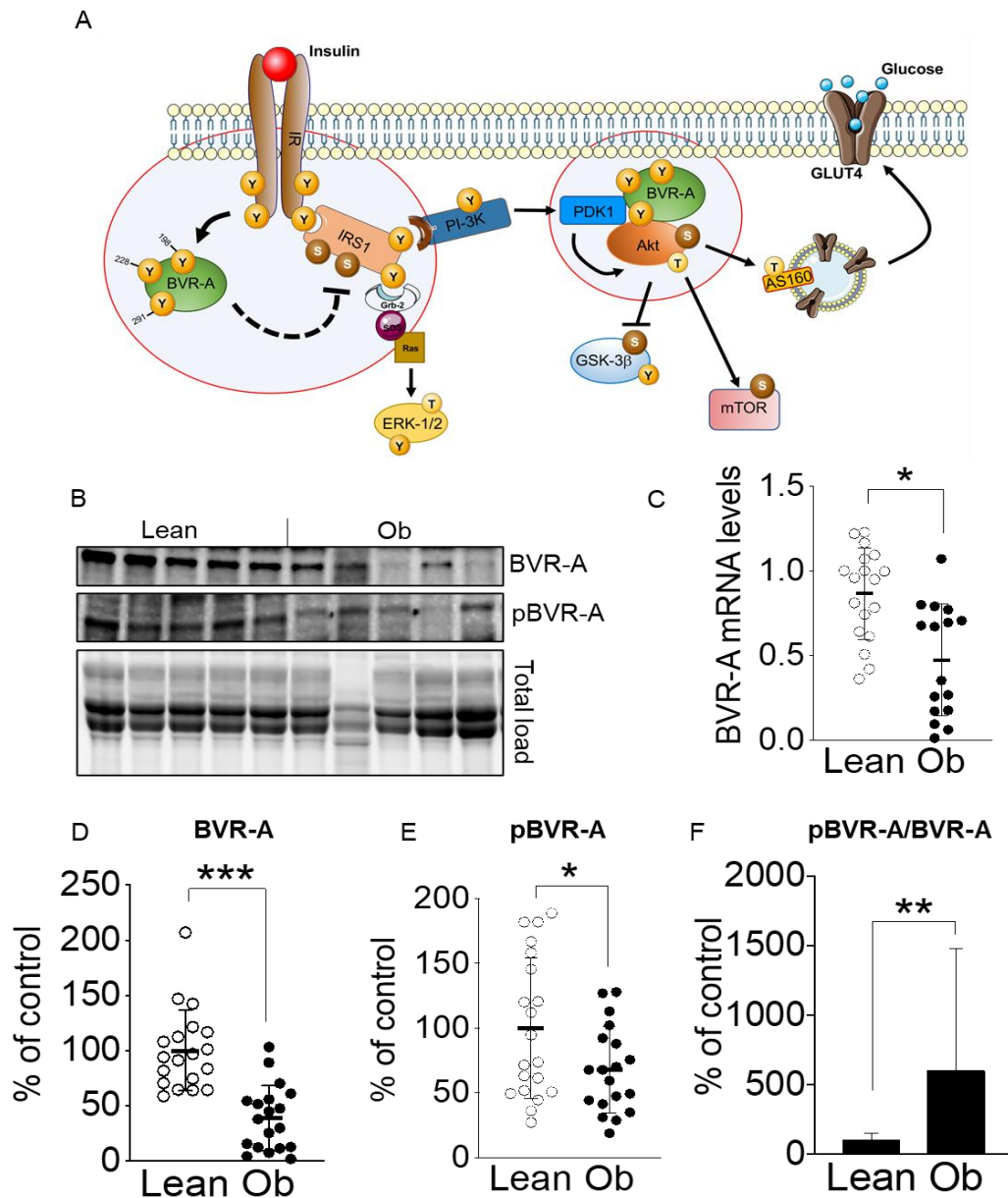


Figura 1 - Livelli ridotti di BVR-A in PBMC di individui obesi. (A) Rappresentazione schematica della cascata del segnale insulinico; sono riportati in evidenza i nodi critici regolati da BVR-A. Freccie: attivazione; linee tratteggiate: inibizione; Y: residui di tirosina; S: residui di serina. (B) Western blot da individui magri (Lean) e obesi (Ob). (C) Livelli di mRNA di BVR-A. (D ed E) Valutazione densitometrica dei livelli di proteina BVR-A e fosforilazione di BVR-A Tyr198. (F) Attivazione relativa di BVR-A espressa come rapporto pTyr198BVR-A / BVR-A. Sia i livelli di proteine totali che la rispettiva forma fosforilata sono stati normalizzati per carico proteico totale. I valori densitometrici sono indicati come percentuale dei controlli di inclinazione impostati al 100%. I dati sono presentati come medie \pm SD ($n = 20$ / gruppo). *t*-test, * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$.

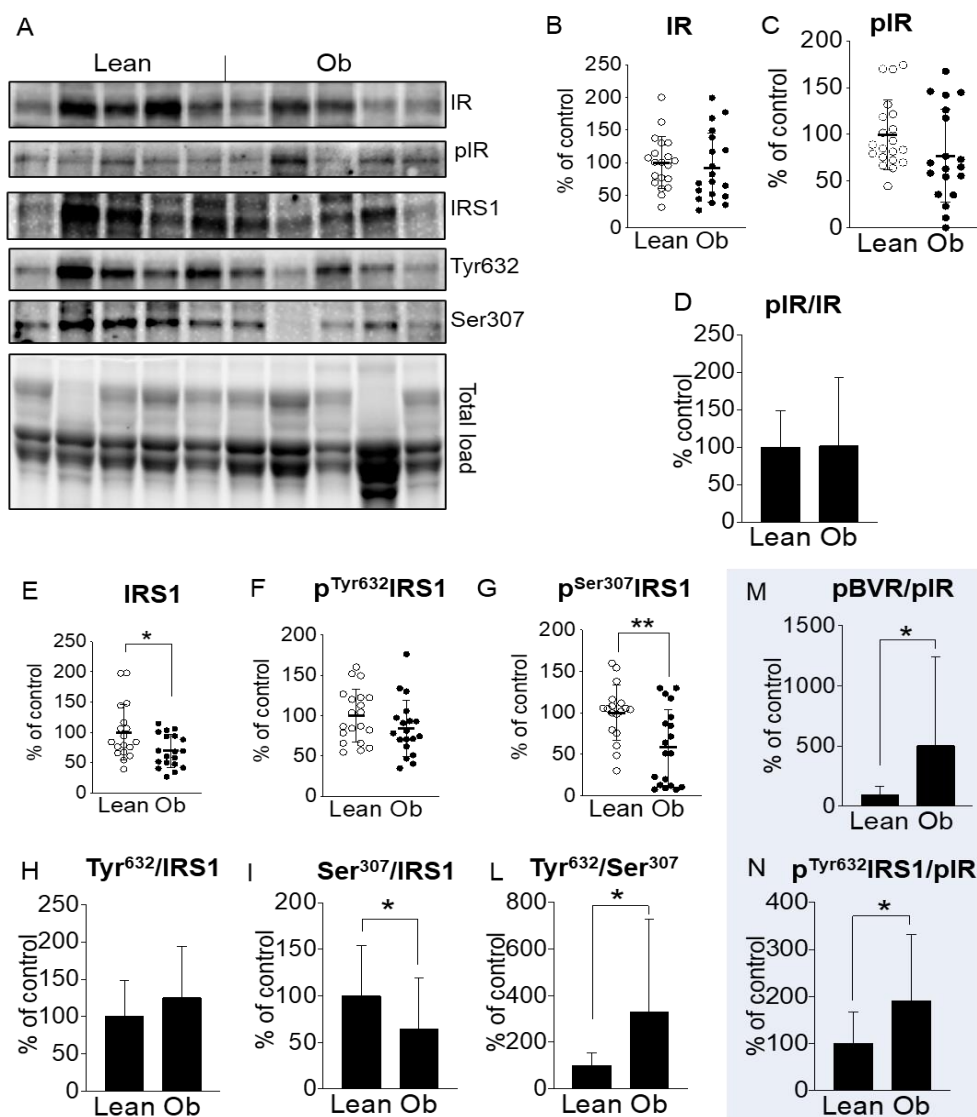


Figura 2 - Iperattivazione di IRS1 in PBMC di individui obesi. (A) Western blot da individui magri (Lean) e obesi (Ob). (B) Valutazione densitometrica dei livelli di proteina IR. (C) Valutazione densitometrica dei livelli di pTyr1158 / 1162 / 1163IR. (D) Attivazione relativa di IR espressa come rapporto pTyr1158 / 1162 / 1163IR / IR. (E) Valutazione densitometrica dei livelli di proteina IRS1. (F) Valutazione densitometrica dei livelli di pTyr632IRS1. (G) Valutazione densitometrica dei livelli di pSer307IRS1. (H) Attivazione relativa di IRS1 valutata come rapporto pTyr632IRS1 / IRS1. (I) Inattivazione relativa di IRS1 valutata come pSer307IRS1 / IRS1. (L) Rapporto di attivazione/inattivazione IRS1 valutato come (pTyr632IRS1 / IRS1) / (pSer307IRS1 / IRS1). (M) Attivazione di BVR-A normalizzata rispetto all'attivazione IR espressa come rapporto pTyr198BVR-A / BVR-A) / (pTyr1158 / 1162 / 1163IR / IR). (N) Attivazione IRS1 normalizzata rispetto all'attivazione IR espressa come (pTyr632IRS1 / IRS1) / (pTyr1158 / 1162 / 1163IR / IR). Sia i livelli di proteine totali che le rispettive forme fosforilate sono stati normalizzati per carico proteico totale. I valori densitometrici sono indicati come percentuale dei controlli di inclinazione impostati al 100%. I dati sono presentati come medie \pm SD (n = 20 / gruppo). t-test, * p < 0,05, ** p < 0,01.

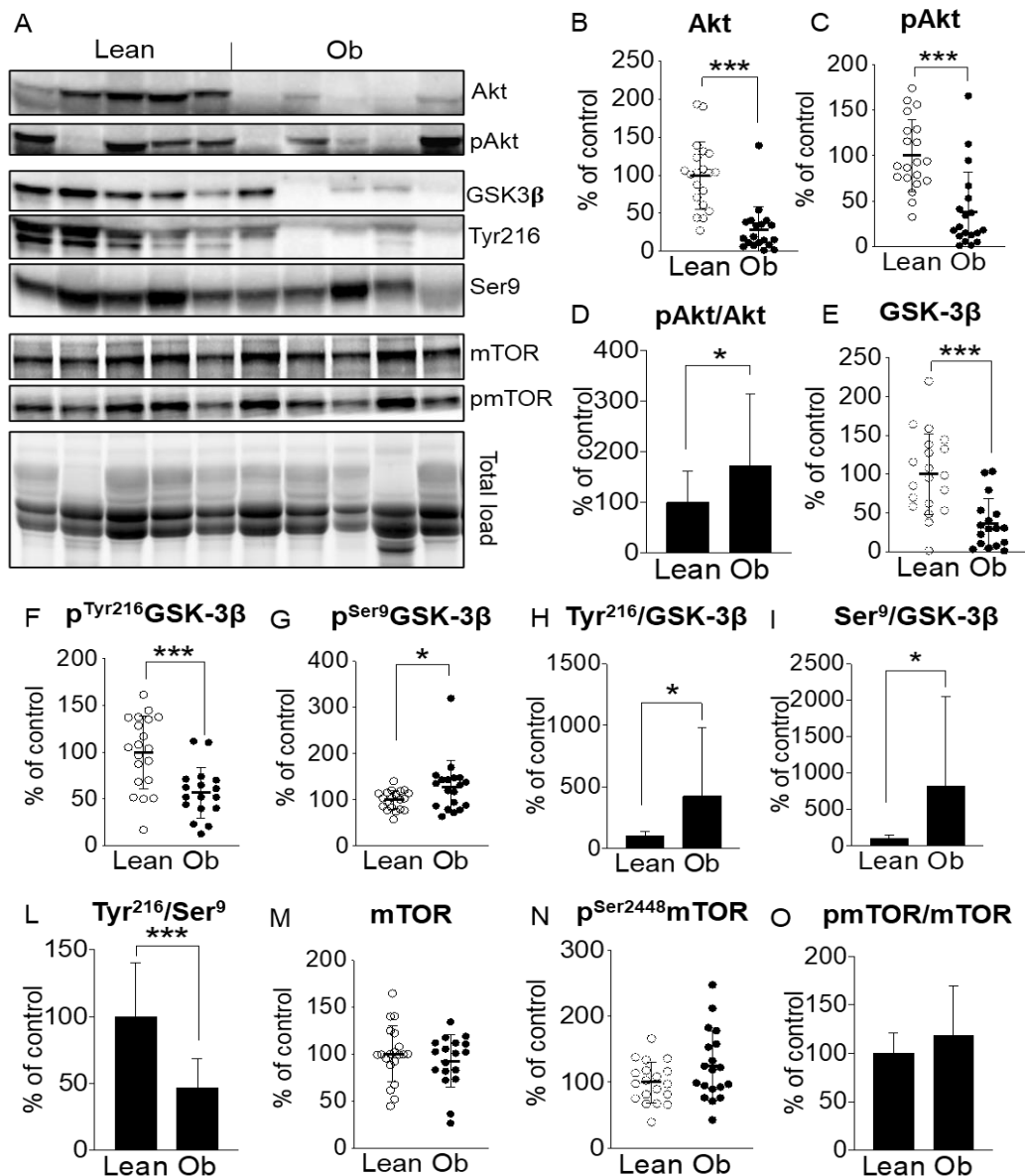


Figura 3 - Iperattivazione dell'asse Akt / GSK-3 in PBMC di individui obesi. (A) Western blot da individui magri (Lean) e obesi (Ob). (B) Valutazione densitometrica dei livelli di proteina Akt. (C) Valutazione densitometrica dei livelli di pSer473Akt. (D) Attivazione relativa Akt espressa come rapporto pSer473Akt / Akt. (E) Valutazione densitometrica dei livelli di proteina GSK-3. (F) Valutazione densitometrica dei livelli di pTyr216GSK-3. (G) Valutazione densitometrica dei livelli di pSer9 GSK-3. (H) Attivazione relativa GSK-3 valutata come rapporto pTyr216GSK-3 / GSK-3. (I) Inattivazione relativa GSK-3 valutata come pSer9GSK-3 / GSK-3. (L) Rapporto di attivazione/inattivazione GSK-3 valutato come (pTyr216GSK-3 / GSK-3) / (pSer9GSK-3 / GSK-3). (M) Valutazione densitometrica dei livelli di proteina mTOR. (N) Valutazione densitometrica dei livelli di pSer2448mTOR. (O) Attivazione relativa mTOR espressa come rapporto pSer2448mTOR / mTOR. Sia i livelli di proteine totali che le rispettive forme fosforilate sono stati normalizzati per carico proteico totale. I valori densitometrici sono indicati come percentuale dei controlli di inclinazione impostati al 100%. I dati sono presentati come medie \pm SD (n = 20 / gruppo). t-test, * p < 0,05, *** p < 0,001.

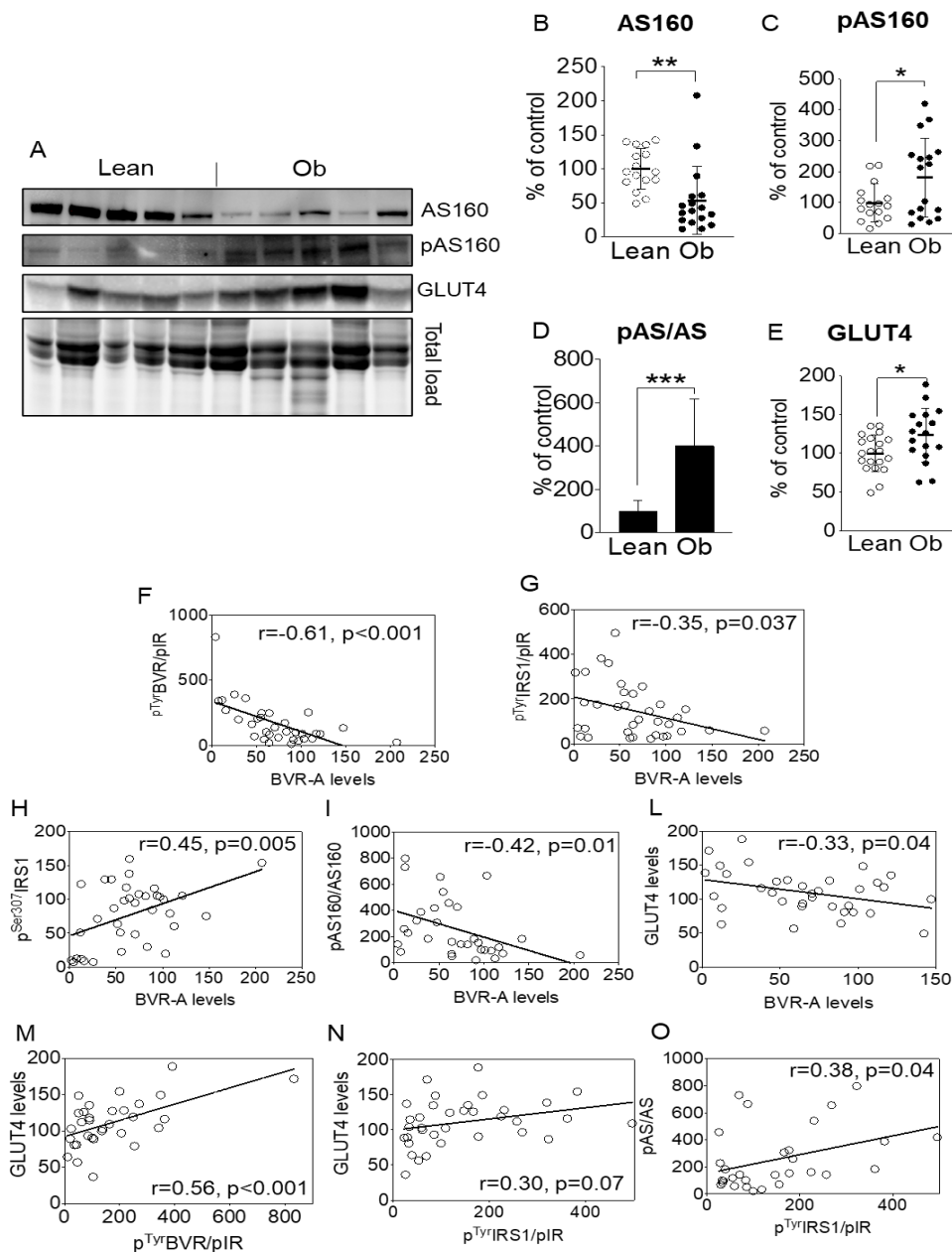


Figura 4 - Aumentata traslocazione di GLUT4 in PBMC di individui obesi. (A) Western blot da individui magri (Lean) e obesi (Ob). (B) valutazione densitometrica dei livelli di proteina AS160. (C) valutazione densitometrica dei livelli di pThr642AS160. (D) attivazione relativa AS160 espressa come rapporto pThr642AS160 / AS160. (E) valutazione densitometrica dei livelli di proteina GLUT4. Sia i livelli di proteine totali che le rispettive forme fosforilate sono stati normalizzati per carico proteico totale. I valori densitometrici sono indicati come percentuale dei controlli di inclinazione impostati al 100%. I dati sono presentati come medie \pm SD ($n = 20$ / gruppo). *t*-test, * $p < 0,05$, *** $p < 0,001$. I livelli di proteina BVR-A correlano con l'attivazione di BVR-A mediata da IR (F), l'attivazione di IRS1 (G) mediata da IR, i livelli di pSer307IRS1 (H), l'attivazione relativa AS160, i livelli di proteina (L) GLUT4. (M) attivazione BVR-A mediata da IR correlata con i livelli di proteina GLUT4. (N) L'attivazione IRS1 mediata da IR è correlata ai livelli di proteina GLUT4. (M) L'attivazione di IRS1 mediata da IR è correlata all'attivazione relativa dell'AS160.

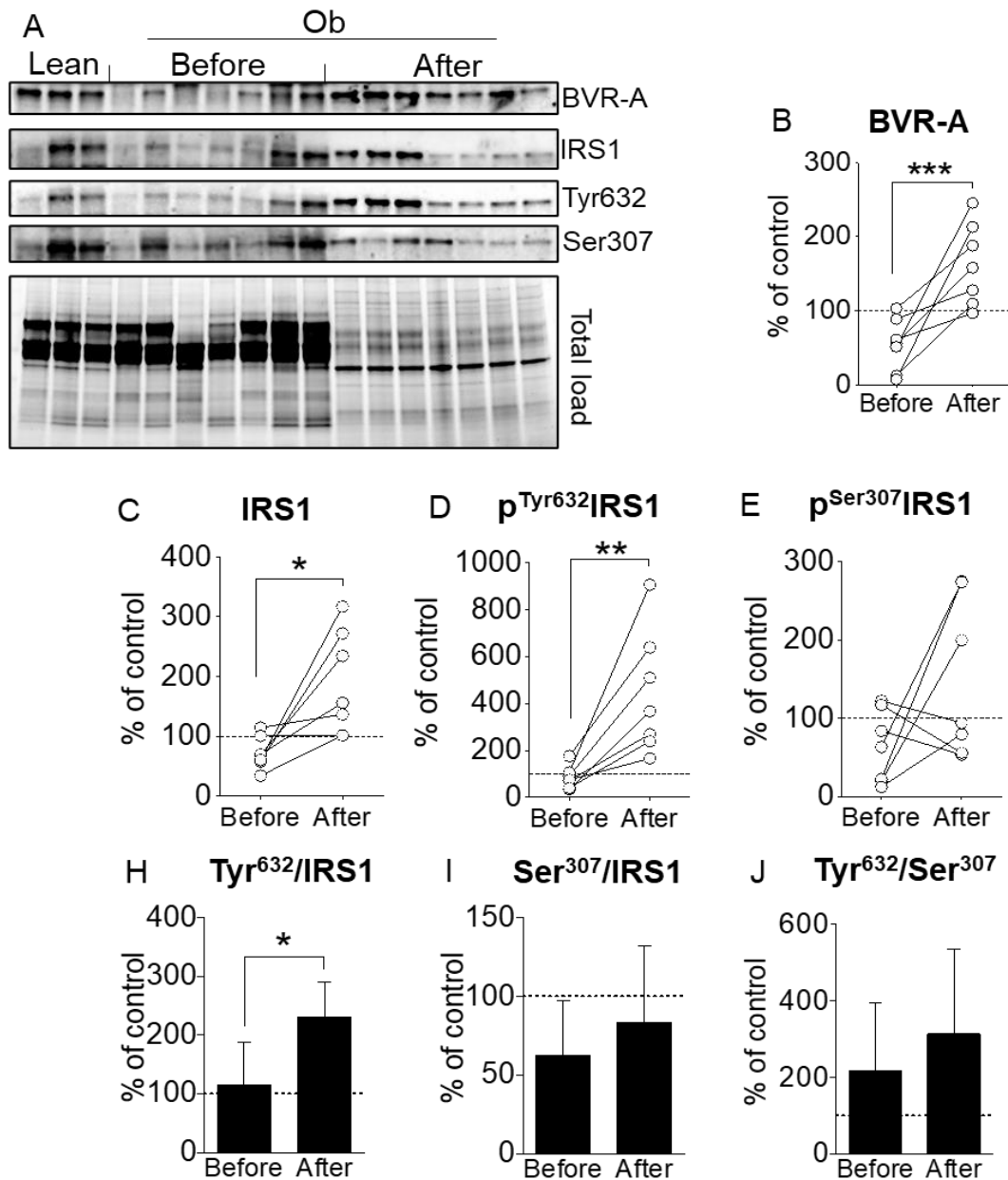


Figura 5 - Aumento dei livelli di BVR-A e maggiore attivazione di IRS1 in PBMC di individui obesi dopo chirurgia bariatrica. (A) Western blot da individui magri (Lean) e obesi (Ob). (B) valutazione densitometrica dei livelli di proteina BVR-A. (C) valutazione densitometrica dei livelli di proteina IRS1. (D) valutazione densitometrica dei livelli di pTyr632IRS1. (E) valutazione densitometrica dei livelli di pSer307IRS1. (F) attivazione relativa IRS1 valutata come rapporto pTyr632IRS1 / IRS1. (G) inattivazione relativa IRS1 valutata come pSer307IRS1 / IRS1. (H) Rapporto di attivazione / inattivazione IRS1 valutato come (pTyr632IRS1 / IRS1) / (pSer307IRS1 / IRS1). Sia i livelli di proteine totali che le rispettive forme fosforilate sono stati normalizzati per carico proteico totale. I valori densitometrici sono indicati come percentuale dei controlli di inclinazione impostati al 100%. I dati sono presentati come medie \pm SD ($n = 7$ / gruppo). t -test, * $p < 0,05$, *** $p < 0,001$.

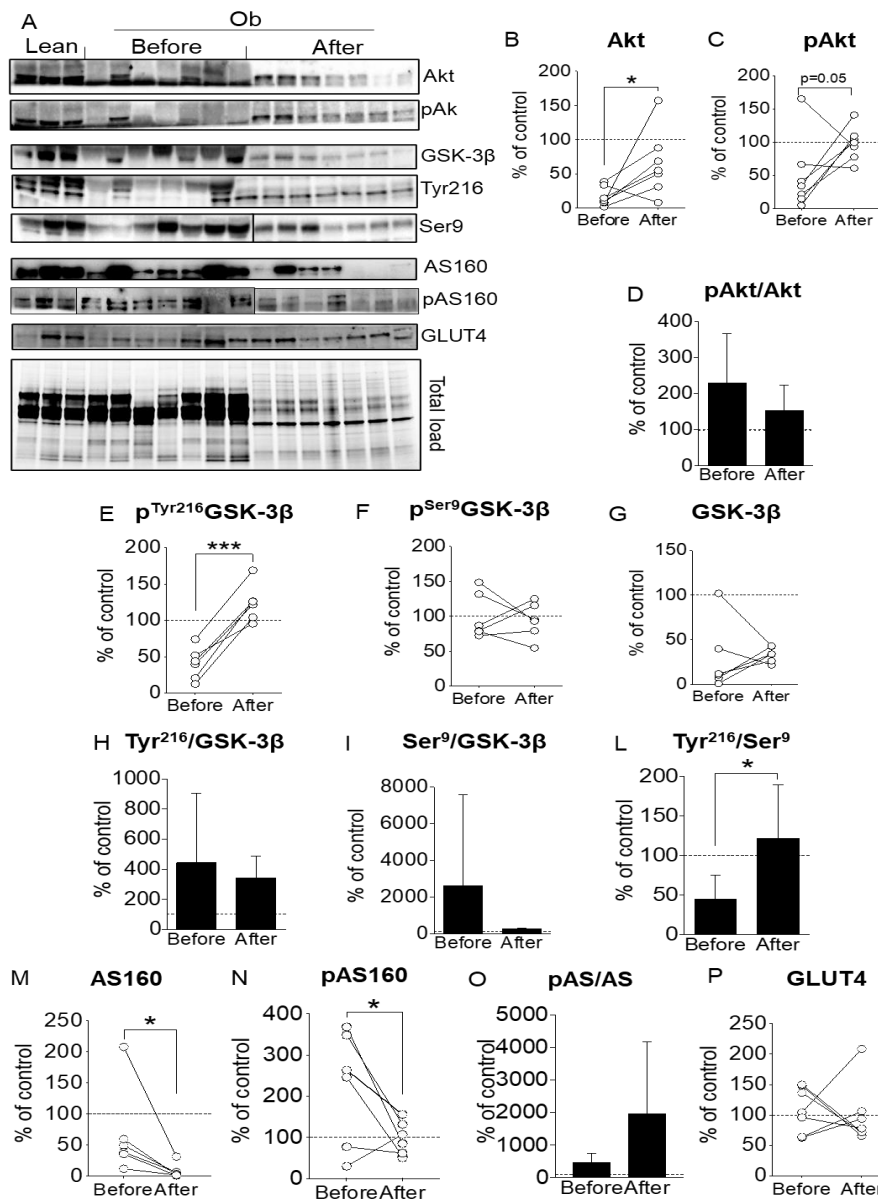


Figura 6 - Miglioramento attivazione Akt e suoi target in PBMC di individui obesi dopo chirurgia bariatrica. (A) Western blot da individui magri (Lean) e obesi (Ob). (B) valutazione densitometrica dei livelli di proteina Akt. (C) valutazione densitometrica dei livelli di pSer473Akt. (D) attivazione relativa Akt espressa come rapporto pSer473Akt / Akt. (E) valutazione densitometrica dei livelli di proteina GSK-3 β . (F) valutazione densitometrica dei livelli di pTyr216GSK-3 β . (G) valutazione densitometrica dei livelli di pSer9 GSK-3 β . (H) attivazione relativa GSK-3 β valutata come rapporto pTyr216GSK-3 β / GSK-3 β . (I) inattivazione relativa GSK-3 β valutata come pSer9GSK-3 β / GSK-3 β . (L) rapporto di attivazione / disattivazione GSK-3 β valutato come (pTyr216GSK-3 β / GSK-3 β) / (pSer9GSK-3 β / GSK-3 β). (M) valutazione densitometrica dei livelli di proteina AS160. (N) valutazione densitometrica dei livelli di pThr642AS160. (O) attivazione relativa AS160 espressa come rapporto pThr642AS160 / AS160. (P) valutazione densitometrica dei livelli di proteina GLUT4.

Sia i livelli di proteine totali che le rispettive forme fosforilate sono stati normalizzati per carico proteico totale. I valori densitometrici sono indicati come percentuale dei controlli di inclinazione impostati al 100%. I dati sono presentati come medie \pm SD ($n = 7$ / gruppo). *t*-test, * $p < 0,05$, *** $p < 0,001$.

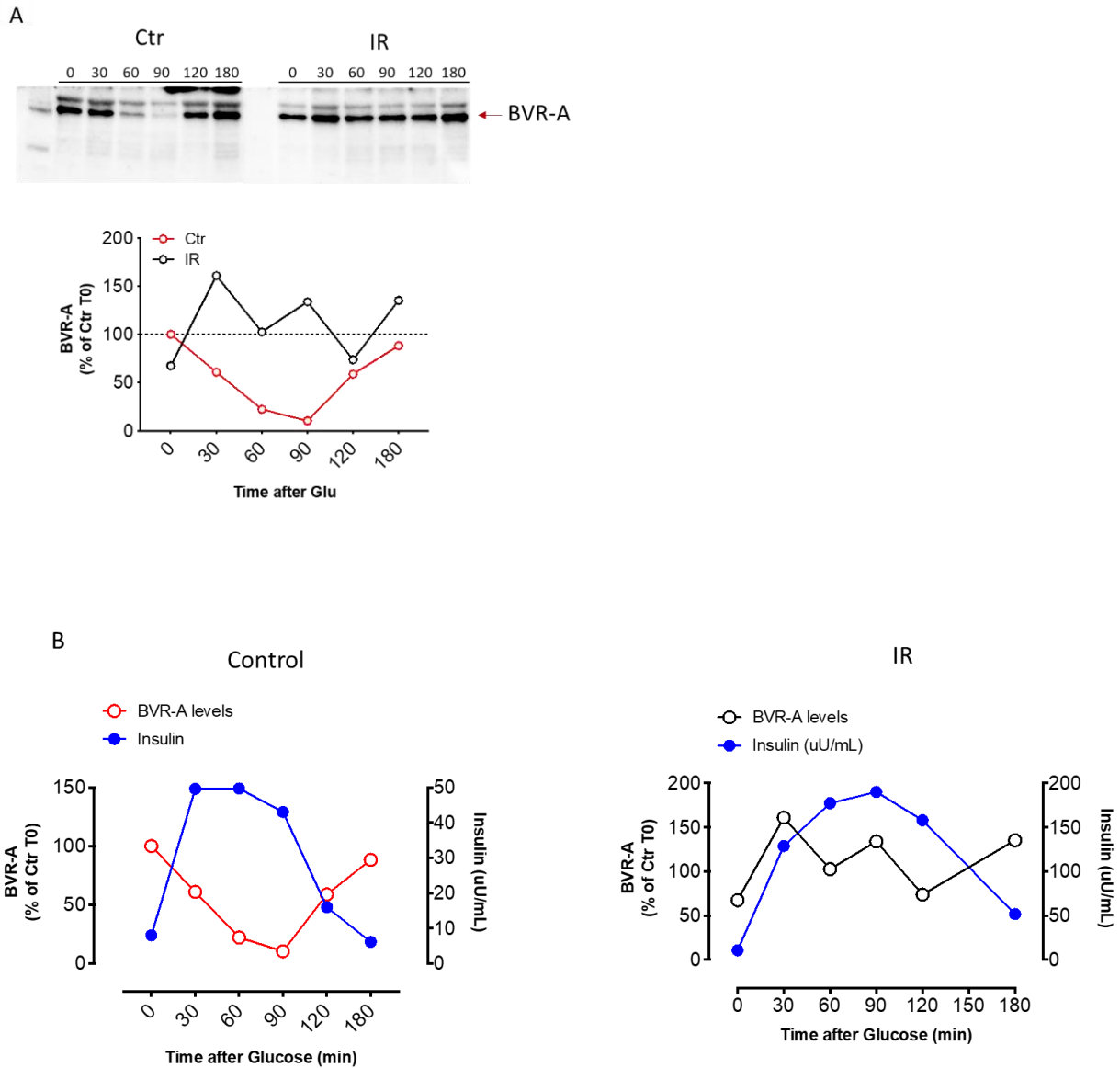


Figura 7 – (A) Livelli di BVR-A ai vari tempi della curva da carico orale di glucosio, nei PBMC di un soggetto sano e di un soggetto obeso insulino-resistente (IR). (B) Livelli di BVR-A e insulinemia misurati ai vari tempi della curva da carico orale di glucosio in un soggetto sano e in un soggetto obeso insulino-resistente (IR).

II. BVR-A e malattie metaboliche

Nella seconda parte di questa tesi è stata valutata l'associazione tra i livelli periferici di BVR-A e i parametri molecolari, clinici e biochimici della popolazione in studio.

Materiali e Metodi

Popolazione

La popolazione arruolata per la valutazione dell'espressione e dell'attivazione periferica di BVR-A e delle proteine coinvolte nella cascata insulinica è stata ulteriormente studiata per valutare l'associazione tra livelli di BVR-A e i parametri molecolari, clinici e biochimici. Pertanto si rimanda al Paragrafo I (pag. 26) e alla **Tabella 1** per i dettagli.

Valutazioni cliniche

Tutti i partecipanti sono stati sottoposti a valutazione clinica approfondita, comprensiva 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 kilogrammi diviso il quadrato dell'altezza espressa in metri (kg/m^2). La circonferenza vita, espressa in cm, è stata misurata nel punto di mezzo tra la dodicesima costa e la cresta iliaca. La pressione arteriosa sistemica (sistolica, SBP; diastolica, DBP; 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 tre misurazioni consecutive; ai fini delle analisi statistiche è stata riportata la media della seconda e terza misurazione.

Valutazioni di laboratorio

In tutti i partecipanti allo studio è stato eseguito un prelievo venoso a digiuno per gli esami biochimici di routine. I valori sierici di glucosio (FBG, mg/dl), emoglobina glicosilata (HbA1c, %, mmol/l), colesterolo totale (mg/dl), colesterolo HDL (HDL, mg/dl), trigliceridi (mg/dl), aspartato aminotransferasi (AST, IU/l), alanina aminotransferasi (ALT, IU/l), gamma-glutamyl transpeptidasi (γ -GT, IU/l) e proteina C reattiva (PCR, mg/dl) sono stati misurati attraverso metodiche di laboratorio standardizzate. I livelli di colesterolo LDL (LDL, mg/dl) sono stati calcolati applicando la formula di Friedwald.

I soggetti obesi 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 la misurazione della glicemia e dell'insulinemia ai tempi 0', 30', 60', 90', 120' dall'ingestione del glucosio.

Il grado di insulino-resistenza e quello di secrezione insulinica sono stati stimati attraverso il calcolo degli indici statici e dinamici HOMA-IR (Homeostasis Model Assessment of Insulin Resistance, Matsuda M, 1999), HOMA-β% (Matsuda M *et al.*, 1999), QUICKI (Matsuda M *et al.*, 1999), ISI (Matsuda sensitivity index, Matsuda M *et al.*, 1999), CIR (Corrected Insulin Response, Herzberg-Schafer SA, 2010) e DI (Disposition Index, Herzberg-Schäfer SA, 2010; Matsuda M *et al.*, 1999).

La presenza di SM è stata definita in base ai criteri NCEP ATP-III (Grundy SM *et al.*, 2005).

Biopsia e istologia del tessuto epatico e adiposo

I soggetti obesi sono stati sottoposti a 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 prelevati sono stati fissati in formalina durante la notte, inclusi in paraffina ed infine sezionati. Un unico patologo esperto, *blinded* per l'identità, la storia clinica e i parametri biochimici dei pazienti, ha effettuato la lettura delle *slide*.

Per il tessuto epatico, i campioni bioptici presentavano una lunghezza minima di 15 mm o almeno la presenza di 10 spazi portalici completi. L'istologia del fegato è stata valutata su sezioni di 3-4 μm dopo colorazione con Ematossilina/Eosina e tricromica di Masson. La NASH è stata diagnosticata in base ai criteri di Brunt (Kleiner DE *et al.* 2012) ed è stato calcolato il *NAFLD activity score* (NAS).

Le biopsie di TA sono state studiate e classificate in base alla presenza e severità di danno infiammatorio, valutato come infiltrazione e attivazione macrofagica, apoptosi adipocitaria e fibrosi così da ottenere uno *score* totale di adiposite ai fini statistici. La presenza di fibre collagene nel TA è stata rilevata con *fast green FCF/Sirius*; l'infiltrazione macrofagica è stata quantificata attraverso valutazione immunostochimica dell'espressione nucleare del CD68 in relazione al numero totale dei nuclei (1:100, M0876; Dako). Un doppio *immunostaining* ha consentito di identificare contemporaneamente la presenza di adipociti apoptotici (TUNEL assay) sul totale delle cellule adipocitarie (Perilipin, ab3526; Abcam). Le cellule apoptotiche sono state identificate con kit *Apoptag plus peroxidase In Situ Apoptosis Detection* (Millipore, Merck KGaA, Darmstadt, Germany). Infine, per approfondire lo studio dell'infiammazione nel TA sono state eseguite specifiche colorazioni immunostochimiche con anticorpi vs netrin-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 TIMP-1 (1:100, aa157-188IHC-plus, LS-B10535, LS Bio).

Biologia molecolare

Lo studio dell'inflammatione del TA è stato ulteriormente approfondito valutando l'espressione mRNA di un ampio pattern di molecole immuno-inflammatorie (WISP1, GrB, Neutrin1, UNC5B, Caveolin1, IL8, MIP1a, MIP2, TIMP1, Caspase3, Caspase7, PARP1, HIF1 α).

Risultati

BVR-A e valutazioni cliniche

I parametri clinici e biochimici della popolazione in studio sono mostrati nella **Tabella 1**. Lo studio dei correlati clinici di BVR-A ha evidenziato che ridotti livelli di BVR-A si associavano alla presenza di obesità ($r = -0.65$, $p = 0.001$) e ad aumentati BMI ($r = -0.62$, $p < 0.001$), peso corporeo ($r = -0.50$, $p < 0.001$) e circonferenza vita ($r = -0.57$, $p < 0.001$); inoltre più bassi livelli di BVR-A correlavano con la presenza e con il numero di componenti della SM ($r = -0.68$, $p < 0.001$ e $r = -0.70$, $p < 0.001$, rispettivamente). I nostri dati dimostrano una correlazione lineare tra peso corporeo e livelli di BVR-A nei soggetti obesi ($p = 0.0003$) mentre non è stata trovata una correlazione lineare tra peso corporeo e forma fosforilata di BVR-A ($p = 0.09$) (Figura 8).

Ridotti livelli di BVR-A sono in grado di discriminare la presenza di obesità con AUROC = 0.93 (IC 95%: 0.85-1.00, $p < 0.001$), sensibilità = 0.84 e specificità = 0.84 per livelli di BVR-A ≤ 64.4 . Inoltre, nei soggetti obesi, i livelli di BVR-A correlavano negativamente con l'AUC OGTT ($r = -0.57$, $p = 0.015$) mentre è stata dimostrata un'associazione positiva con CIR30 ($r = 0.64$, $p = 0.006$) e con DI ($r = 0.62$, $p = 0.01$). Nessuna correlazione è stata invece trovata con HOMA-IR e ISI.

Associazione tra livelli di BVR-A e presenza di NAFLD/NASH e/o inflammatione del TA nei soggetti obesi

Lo studio istologico ha dimostrato che nei soggetti obesi, ridotti livelli di BVR-A erano associati alla diagnosi di NASH ($r = -0.41$, $p = 0.03$) e correlavano linearmente con la sua gravità, espressa mediante Nas Score ($r = -0.38$, $p = 0.02$). Inoltre, ridotti livelli di BVR-A si associavano a caratteristiche di inflammatione e disfunzione del TA, come la maggiore espressione adipocitaria di UNC5B ($r = -0.60$, $p = 0.015$) e di WISP-1 ($r = -0.60$, $p = 0.02$).

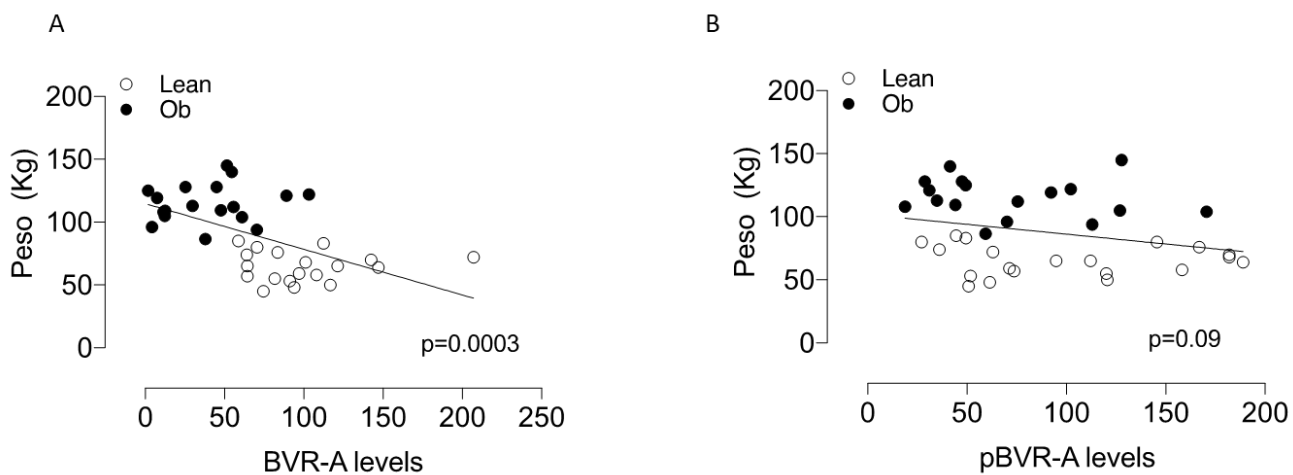


Figura 8 – (A) Correlazione lineare tra peso corporeo e livelli di BVR-A nei soggetti obesi. (B) Correlazione lineare tra peso corporeo e forma fosforilata di BVR-A nei soggetti obesi.

III. BVR-A in presenza di infiammazione del VAT e NAFLD

Considerando la stretta associazione tra disfunzione del TA, alterazioni del segnale insulinico e dismetabolismo, lo studio condotto per questa tesi ha inoltre valutato i livelli di espressione di BVR-A nel tessuto adiposo viscerale (VAT) di soggetti obesi in relazione alla presenza di marcatori di compromissione metabolica, infiammazione locale e di NAFLD.

Materiali e Metodi

Popolazione

Per questo studio, sono stati reclutati 38 soggetti obesi afferenti presso il Day Hospital di Endocrinologia, Dipartimento di Medicina Sperimentale, Sapienza Università di Roma, per eseguire le valutazioni cliniche e metaboliche precedenti all'intervento di chirurgia bariatrica.

Valutazioni cliniche

Tutti i partecipanti sono stati sottoposti a *work-up* clinico come riportato a pag. 41.

Valutazioni di laboratorio

In tutti i partecipanti allo studio è stato eseguito un prelievo di sangue venoso a digiuno per la misurazione dei valori sierici di glucosio (FBG, mg/dl), emoglobina glicosilata (HbA1c, %, mmol/l), colesterolo totale (mg/dl), colesterolo HDL (HDL, mg/dl), trigliceridi (mg/dl), aspartato aminotransferasi (AST, IU/l), alanina aminotransferasi (ALT, IU/l), gamma-glutamyl transpeptidasi (γ -GT, IU/l), bilirubina totale (mg/dL) e coniugata (mg/dL), acido urico (mg/dL) e creatinina (mg/dL) attraverso metodiche di laboratorio standardizzate. I valori di colesterolo LDL (LDL, mg/dl) sono stati calcolati applicando la formula di Friedwald.

La presenza di SM è stata definita in base ai criteri NCEP ATP-III (Grundy SM *et al.*, 2005).

La presenza di DT2 è stata valutata secondo i criteri dell'American Diabetes Association 2009 (American Diabetes Association. Standard of Medical Care. 2009).

Biopsia e istologia del tessuto epatico e adiposo

Nei soggetti obesi sottoposti a chirurgia bariatrica, durante la seduta operatoria, sono state eseguite biopsia epatica e di TA viscerale per valutare la presenza di NAFLD/NASH e infiammazione del TA come riportato a pag. 42.

Analisi di espressione genica - RealTime PCR

L'estrazione di RNA totale dai campioni di FFPE è stata eseguita utilizzando il kit di isolamento dell'acido nucleico totale RecoverAll™ per FFPE (ThermoFisher Scientific, Waltham, MA, USA), secondo le istruzioni del produttore. La purezza e la quantità di RNA estratto sono state confermate allo spettrofotometro NanoDrop ND-1000 (ThermoFisher Scientific, Waltham, MA, USA). L'RNA estratto è stato successivamente retro-trascritto utilizzando il kit cDNA ad alta capacità (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA), secondo le istruzioni del produttore. I prodotti PCR di BVR-A, IL8 e CASP3 sono stati rilevati utilizzando primer e sonde specifici marcati con il fluoroforo reporter FAM. GAPDH è stato usato come standard interno. Le reazioni di PCR real-time quantitativa sono state effettuate in un volume di reazione di 10 µl utilizzando 1 × TaqMan Master Mix in una macchina PCI Fast Real-Time ABI PRISM 7500 (Applied Biosystem, Foster City, CA, USA). Le reazioni PCR sono state eseguite in triplicato su piastre da 96 pozzetti e i risultati sono stati valutati utilizzando il software ABI PRISM 7500 (Applied Biosystem, Foster City, CA, USA).

Analisi statistica

Tutte le analisi statistiche sono state eseguite attraverso il software statistico SPSS, versione 23 (IBM, Armonk, NY). I valori sono riportati nel testo come media ± deviazione standard (SD) o come valore mediano per le variabili continue e come percentuali per le variabili categoriche. Il confronto tra due gruppi è stato eseguito attraverso il test T di Student per variabili continue normalmente distribuite e test χ^2 per le variabili categoriche. Per le variabili continue non distribuite normalmente il confronto tra due gruppi è stato eseguito attraverso il test di Mann-Whitney. Le analisi di correlazione bivariata sono state eseguite mediante correlazioni di rango di Pearson e Spearman. Il valore predittivo dei livelli di espressione di BVR-A per la diagnosi di NAFLD (sì/no) è stato stimato calcolando l'AUROC aggiustata per età, sesso e BMI con un C.I. del 95%. Un valore $p < 0.05$ è stato considerato statisticamente significativo.

Il protocollo di studio è stato rivisto e approvato dal Comitato Etico del Policlinico Umberto I e condotto in conformità con la Dichiarazione di Helsinki. Tutti i partecipanti allo studio hanno firmato un consenso informato scritto prima di sottoporsi a tutte le procedure di studio

Risultati

Ridotti livelli di espressione di BVR-A si associano alla presenza di NAFLD nei soggetti obesi

Le caratteristiche dei partecipanti allo studio in relazione all'espressione di BVR-A nel TA sono descritte nella **Tabella 2**. Abbiamo calcolato il valore mediano dell'espressione di mRNA di BVR-A e lo studio della popolazione è stato stratificato in due sottogruppi, sotto e sopra il valore mediano (*low* BVR-A e *high* BVR-A, rispettivamente) (Figura 9). Gli individui appartenenti al gruppo *low* BVR-A presentavano livelli significativamente più alti di GGT ($p = 0.05$) e di prevalenza di NAFLD (95% contro il 68%, $p = 0.036$) rispetto a quelli appartenenti al gruppo *high* BVR-A. Gli individui appartenenti al gruppo *low* BVR-A presentavano un *odds ratio* per NAFLD di 1,38 (C.I. 95%: 1.02-1.9; test χ^2). Inoltre, ridotti livelli di espressione di BVR-A nel TA erano in grado di predire la presenza di NAFLD con AUROC = 0.89 ($p = 0.002$, C.I. 95% = 0.76-1.0; Figura 10).

Ridotti livelli di espressione di BVR-A si associano alla presenza infiammazione del TA nei soggetti obesi

I soggetti obesi appartenenti al gruppo *low* BVR-A mostravano livelli di espressione di IL-8 e CASP3 nel TA significativamente aumentati rispetto ai soggetti appartenenti al gruppo *high* BVR-A ($p = 0.014$ e $p = 0.011$, rispettivamente; Figura 11).

Parallelamente allo studio di espressione di BVR-A nel TA, il nostro gruppo di ricerca sta valutando i livelli di espressione di BVR-A anche nelle biopsie di tessuto epatico dei soggetti obesi. I nostri dati preliminari mostrano che l'espressione epatica di BVR-A correla direttamente con la presenza di danno epatico, espresso mediante Brunt Score ($r = 0.40$, $p = 0.04$.) e Nas Score ($r = 0.43$, $p = 0.03$), corroborando l'ipotesi di una stretta associazione tra BVR-A e alterazioni morfo-funzionali dei tessuti insulino-sensibili in corso di obesità.

	Low BVR-A (n=19)	High BVR-A (n=19)	P-value
Età (anni)	45.4±10	42.4±9.3	0.42
Genere (F%)	73%	73%	0.94
BMI (kg/m ²)	43±6.4	42.5±3.96	0.92
Circonferenza vita (cm)	130.4±9	126.9±11.4	0.44
PAS (mmHg)	127.5±9.76	125±12.7	0.37
PAD (mmHg)	88.2±29.1	83.2±9.1	0.68
Glicemia (mg/dL)	103.9±16.7	96.6±14.5	0.16
HbA1c (%—mmol/mol)	5.5±0.3	5.4±0.5	0.35
Insulinemia (μU/L)	12.7±7.2	14.1±7.6	0.67
HOMA-IR	3.3±2	3.2±1.8	1.0
HOMA-β %	122.2±67.1	182.1±141.5	0.22
Colesterolo Tot (mg/dL)	206.5±34.5	196.3±25.6	0.52
HDL-C (mg/dL)	51.9±11.8	45.6±7.4	0.18
LDL-C (mg/dL)	128±28	124.3±24.6	0.52
Trigliceridi (mg/dL)	131.2±40.4	120.7±47.3	0.50
AST(IU/L)	23.9±10.2	21.7±9	0.59
ALT (IU/L)	30.2±17.2	27.1±13.6	0.88
GGT (IU/L)	36±43.2	19.5±7.7	0.05
Bilirubina totale (mg/dl)	0.79±0.5	0.9±0.5	0.24
Bilirubina coniugata (mg/dl)	0.34±0.2	0.33±0.2	0.80
Creatininemia (mg/dL)	0.79±0.2	0.79±0.1	0.91
Acido Urico (mg/dL)	5.8±1.7	5.5±1.2	0.84
DT2 (%)	8%	13%	0.63
SM (%)	82%	88%	0.58
NAFLD (%)	95%	68%	0.036

Tabella 2 - Caratteristiche della popolazione in studio in relazione ai livelli di espressione dell'mRNA di BVR-A nel TA (low BVR-A: sottogruppo con espressione di BVR-A nel TA al di sotto dei livelli mediani di BVR-A; high BVR-A: sottogruppo con espressione di BVR-A nel TA al di sopra dei livelli mediani di BVR-A). I valori sono espressi come media ± DS o percentuale. Test di Mann-Whitney, test * χ^2 applicato.

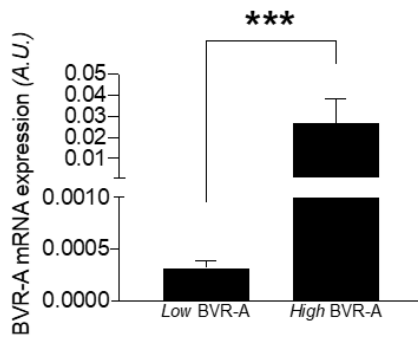
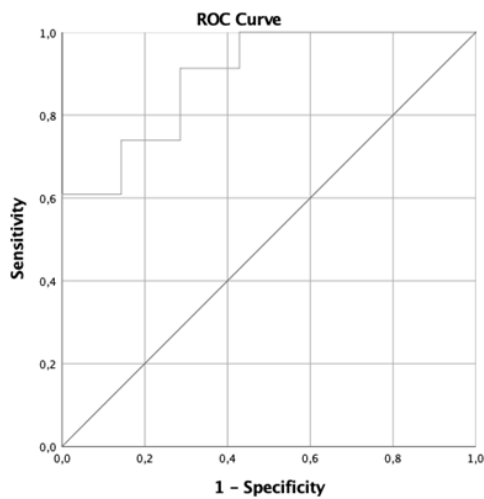


Figura 9 – Livelli di espressione dell'mRNA di BVR-A nel TA. I soggetti sono stati divisi in due gruppi in base ai livelli di espressione dell'mRNA di BVR-A al di sotto o al di sopra del valore mediano (BVR-A low e high, rispettivamente). I dati sono espressi come media \pm SEM, *** $p < 0,0001$ (Mann-Withney). A.U., unità arbitrarie.



Area under the curve

Area	Standard error ^a	Asymptotic significance ^b	Asymptotic 95% Confidence Interval	
			Lower Bound	Upper Bound
0.894	0.066	0.002	0.0765	1.000

a. Based on non-parametric assumption

b. Null hypothesis: real area = 0.5

Figura 10 - Espressione di BVR-A nel TA – AUROC per NAFLD.

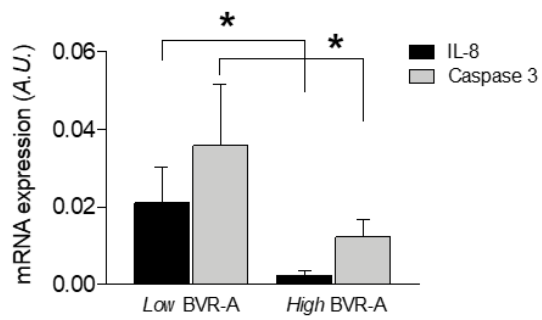


Figura 11 - Livelli di espressione dell'mRNA di IL-8 e Caspase 3 nel TA relativamente ai livelli di espressione dell'mRNA BVR-A. I soggetti sono stati divisi in due gruppi in base ai livelli di espressione dell'mRNA di BVR-A al di sotto o al di sopra del valore mediano (low BVR-A e high BVR-A rispettivamente). I dati sono espressi come media \pm SEM, * $p < 0,05$ (Mann-Withney). A.U., unità arbitrarie.

DISCUSSIONE

Questi studi dimostrano, per la prima volta nell'uomo, che i soggetti obesi presentano una riduzione dei livelli di espressione cellulare di BVR-A rispetto a individui normopeso e che quest'alterazione si associa ad iper-attivazione di tutto il segnale insulinico. Inoltre, nei soggetti obesi, ridotti livelli di BVR-A correlano con la presenza di sindrome metabolica, NAFLD e infiammazione del TA viscerale.

I nostri dati consentono di ipotizzare che la riduzione dei livelli di proteina BVR-A rappresenti una precoce alterazione della cascata insulinica cui consegue la riduzione dei livelli e dell'attivazione della proteina IR e l'inibizione di IRS1, due caratteristiche molecolari già note di insulino-resistenza (Coppa KD *et al.*, 2012; Haeusler RA *et al.*, 2018; Guo S *et al.*, 2014)

Recentemente, un elegante studio condotto su modelli murini di Alzheimer, ha indagato il possibile ruolo di BVR-A nell'insulino-resistenza cerebrale, dimostrando che ridotti livelli di BVR-A sono inizialmente associati ad un'iperattivazione dell'asse IR/IRS1 e del segnale insulinico (Barone E *et al.*, 2015); tardivamente, a 12 e 18 mesi, la persistente alterazione di BVR-A si associa invece all'inibizione di IRS1 e all'insorgenza di insulino-resistenza cerebrale (Barone E *et al.*, 2015). Alla luce di questi dati, e considerando che un'eccessiva e prolungata iperattivazione di IRS-1 comportava l'attivazione di meccanismi di *feedback* negativo sul segnale insulinico, gli autori hanno ipotizzato che la BVR-A agisca da regolatore della cascata insulinica, garantendo le fisiologiche quantità intracellulari di IRS-1 attivato.

I nostri dati dimostrano che ridotti livelli di proteina BVR-A si associano ad iper-attivazione di IRS1 cui consegue l'aumentata attivazione di Akt a valle, in grado di promuovere l'inibizione di GSK-3 e l'aumento della traslocazione di GLUT4 mediata da AS160 sulla membrana plasmatica.

Nella nostra popolazione i livelli plasmatici di glucosio e insulina risultano normali prima e dopo OGTT e non è stata rilevata nessuna alterazione degli indici di IR e secrezione. Inoltre, nel nostro studio, la riduzione dei livelli di BVR-A correla con un aumento della glicemia nel corso dell'OGTT, sebbene entro intervalli fisiologici, ed è positivamente associata a DI, che stima la capacità secretoria dell'insulina aggiustata per l'IR, e con CIR30, che stima la secrezione delle cellule beta. Sulla base di questi dati è possibile ipotizzare che l'iper-attivazione del segnale insulinico, accompagnata da una maggiore espressione e traslocazione di GLUT4, possono preservare lo stato euglicemico senza aumentare la secrezione insulinica. L'alterazione della BVR-A può determinare inizialmente l'iper-attivazione del segnale, favorendo il mantenimento di una normale regolazione del metabolismo glicemico, mentre successivamente può portare allo sviluppo di IR. A tal proposito, nei soggetti obesi la riduzione dei livelli di BVR-A si associa a caratteristiche cliniche strettamente correlate all'IR quali

la presenza di sindrome metabolica, NAFLD e infiammazione del TA. I nostri dati sono in linea con le precedenti osservazioni di Marmarosh e collaboratori che hanno dimostrato come, in cellule embrionali renali umane, la perdita di BVR-A aumenta nel breve termine l'assorbimento di glucosio mediato dall'insulina, mentre a lungo termine si associa allo sviluppo di IR (Lerner-Marmarosh N *et al.* 2005). Inoltre, topi *knock out* per BVR-A epatica, sottoposti a dieta ad alto contenuto di grassi, mostrano elevati livelli plasmatici di glucosio e di insulina, aumentato accumulo intra-epatico di lipidi e alterazioni del segnale insulinico a livello di GSK-3 β e Akt, indicativi di una condizione di IR (Hinds TD *et al.*, 2016).

È interessante notare che in un sottogruppo di sette soggetti obesi sottoposti a chirurgia bariatrica e rivalutati 6 mesi dopo l'intervento, i nostri dati mostrano un recupero dei livelli di BVR-A accompagnato da un ripristino del segnale insulinico. Questi risultati confermano l'associazione tra alterazione di BVR-A, obesità e IR, sebbene derivino da un piccolo campione e andrebbero ulteriormente validati su un più ampio numero di soggetti.

Il nostro studio ha inoltre dimostrato, per la prima volta nell'uomo, che in soggetti obesi, ridotti livelli di espressione di BVR-A nel TA si associano a marcata infiammazione locale e sofferenza adipocitaria alla biopsia omentale, indicata da una maggiore espressione di IL-8 e Caspase 3. È interessante notare che un recente studio condotto su modelli murini di obesità ha dimostrato che il *knock out* di BVR-A a livello adipocitario si associa ad aumentato accumulo di grasso viscerale, ad una maggiore dimensione degli adipociti e alla presenza di infiammazione locale più pronunciata (Stec DE *et al.*, 2020). Allo stesso modo, nel nostro studio abbiamo dimostrato che una minore espressione di BVR-A nel TA correla con la presenza, a livello locale, di marcatori di disfunzione del TA. I nostri risultati sono in accordo anche con precedenti osservazioni che dimostrano un aumento significativo della caspasi 3 in diversi tipi di cellule in cui è stato indotto il silenziamento di BVR-A (Zhang M *et al.*, 2017). Inoltre, è interessante notare che in topi *knock out* per BVR-A nelle cellule tubulari renali, il trattamento con acido palmitico determina un aumento dell'accumulo intracellulare di lipidi e della caspasi 3 attivata, rispetto ai *wild-type* (Adeosun SO *et al.*, 2018).

Nel nostro studio, una ridotta espressione di BVR-A nel TA si associa alla diagnosi istologica di NAFLD e alla sua gravità. Inoltre, i nostri dati preliminari, ottenuti su biopsie di tessuto epatico, dimostrano che i livelli di espressione epatica di BVR-A correlano direttamente con caratteristiche di alterazione e infiammazione del tessuto epatico, espresse mediante Brunt e Nas Score. I nostri dati, insieme alle evidenze scientifiche sovra-citate riguardo lo sviluppo di steatosi epatica severa riscontrato da Hinds e collaboratori in modelli murini *knock out* per BVR-A epatica (Hinds TD *et al.*, 2016) suggeriscono una stretta associazione tra BVR-A e alterazioni morfo-funzionali dei tessuti insulino-sensibili in corso di obesità. Inoltre, diversi studi hanno dimostrato che la bilirubina, il

prodotto finale dell'attività enzimatica di BVR-A (Kapitulnik J *et al.*, 2009), è in grado di proteggere dallo sviluppo di patologie epatiche, probabilmente attivando il PPAR- α , responsabile del trasporto e della β -ossidazione degli acidi grassi a livello perossisomiale e mitocondriale (Kapitulnik J *et al.*, 2009; Hinds TD *et al.*, 2016; Hinds TD *et al.*, 2016; Stec DE *et al.*, 2016).

Nell'insieme i nostri dati permettono di identificare la BVR-A come un possibile fattore di regolazione del messaggio insulinico, la cui alterazione, strettamente associata alla presenza di sindrome metabolica, NAFLD e infiammazione del TA, potrebbe rappresentare un nuovo meccanismo alla base dell'insorgenza di IR. Inoltre, sulla base dei nostri risultati e dei dati presenti in letteratura, e considerando il ruolo antinfiammatorio della BVR-A, possiamo ipotizzare che la BVR-A sia impegnata nella regolazione dell'omeostasi del TA e che la sua compromissione potrebbe essere coinvolta nei processi infiammatori che si verificano nel TA in corso di obesità.

CONCLUSIONI

Gli studi sperimentali condotti per questa tesi hanno indagato le alterazioni del segnale insulinico in relazione alla presenza di obesità e sindrome metabolica, dimostrando che i soggetti obesi presentano iper-attivazione di tutto il segnale insulinico associata ad alterazioni dei livelli periferici di BVR-A, che agisce come fattore di regolazione a monte della cascata insulinica stessa. La compromissione di BVR-A è inoltre associata alla presenza di un fenotipo peculiare, caratterizzato da sindrome metabolica, NAFLD e infiammazione del TA. In questo contesto, è stato interessante notare che dopo chirurgia bariatrica si ha un ripristino dell'espressione e dell'attività di BVR-A insieme ad un recupero di tutto il segnale insulinico. Sulla base di questi dati è possibile ipotizzare che l'alterazione di BVR-A possa rappresentare un nuovo meccanismo precoce alla base dell'IR nei soggetti obesi. Inoltre, questo studio ha indagato l'espressione della BVR-A nel TA, dimostrando che la riduzione locale dell'espressione di BVR-A si associa alla presenza di infiammazione del TA e confermando pertanto le evidenze scientifiche precedentemente ottenute in modelli animali.

In conclusione, i nostri dati forniscono un importante contributo per la comprensione di nuovi potenziali meccanismi fisiopatologici alla base della compromissione metabolica e dell'infiammazione del TA che si verificano nei soggetti obesi, suggerendo un possibile coinvolgimento della BVR-A non solo nella regolazione del segnale insulinico ma anche nella regolazione dell'omeostasi del TA e dei processi infiammatori in presenza di obesità.

BIBLIOGRAFIA

Adeosun SO, Gordon DM, Weeks MF, Moore KH, Hall JE, Hinds TD Jr, Stec DE. Loss of biliverdin reductase-A promotes lipid accumulation and lipotoxicity in mouse proximal tubule cells. *Am J Physiol Renal Physiol*. 2018 Aug 1;315(2): F323-F331.

Ahmad Z, Salim M, Maines MD. Human biliverdin reductase is a leucine zipper like DNA-binding protein and functions in transcriptional activation of heme oxygenase-1 by oxidative stress. *J Biol Chem*. 2002 Mar 15;277(11):9226-32.

Air EL, Kissela BM. Diabetes, the metabolic syndrome, and ischemic stroke: epidemiology and possible mechanism. *Diabetes Care* 2007 Dec; 30(12):3131-40.

Akter K, E.A. Lanza, S.A. Martin, N. Myronyuk, M. Rua, R.B. Raffa, Diabetes mellitus and Alzheimer's disease: shared pathology and treatment? *Br.J.Clin. Pharmacol*. 71(2011)365–376.

Alpert MA, Omran J, Bostick BP. Effects of Obesity on Cardiovascular Hemodynamics, Cardiac Morphology, and Ventricular Function. *Curr Obes Rep*. 2016 Dec;5(4):424-434.

American Diabetes Association. Classification and Diagnosis of Diabetes. *Diabetes Care*. 2017 Jan;40 (Suppl 1): S11-S24.

American Diabetes Association: Standards of medical care in diabetes-2009. *Diabetes Care* 2009; 32: S13-S61.

Angulo P, Keach JC, Batts KP, Lindor KD. Independent predictors of liver fibrosis in patients with nonalcoholic steatohepatitis. *Hepatology*. 1999 Dec;30(6):1356-62.

Angulo P, Lindor KD. Non-alcoholic fatty liver disease. *J Gastroenterol Hepatol* 2002; 17 Suppl: S186-90.

Anjom-Shoae J, Keshteli AH, Sadeghi O, Pouraram H, Afshar H, Esmailzadeh A, Adibi P. Association between dietary insulin index and load with obesity in adults. *Eur J Nutr.* 2020 Jun;59(4):1563-1575.

Artunc F, Schleicher E, Weigert C, Fritsche A, Stefan N, Häring HU. The impact of insulin resistance on the kidney and vasculature. *Nat Rev Nephrol.* 2016 Dec;12(12):721-737.

B.C. Lee, J. Lee, Cellular and molecular players in adipose tissue inflammation in the development of obesity-induced insulin resistance, *Biochim. Biophys. Acta* 1842 (2014) 446-462.

Baggiolini M, Clark-Lewis I. Interleukin-8, a chemotactic and inflammatory cytokine. *FEBS Lett.* 1992 Jul 27;307(1):97-101.

Barchetta I, Cimini FA, Capoccia D, Bertocchini L, **Ceccarelli V**, Chiappetta C, Leonetti F, Di Cristofano C, Silecchia G, Orho-Melander M, Melander O, Cavallo MG. Neurotensin Is a Lipid-Induced Gastrointestinal Peptide Associated with Visceral Adipose Tissue Inflammation in Obesity. *Nutrients.* 2018 Apr 23;10(4). pii: E526. doi: 10.3390/nu10040526.

Barone E, Di Domenico F, Cassano T, Arena A, Tramutola A, Lavecchia MA, Coccia R, Butterfield DA, Perluigi M. Impairment of biliverdin reductase-A promotes brain insulin resistance in Alzheimer disease: A new paradigm. *Free Radic Biol Med.* 2016 Feb;91:127-42.

Barone E, Di Domenico F, Cenini G, Sultana R, Cini C, Preziosi P, Perluigi M, Mancuso C, Butterfield DA, Biliverdin reductase—a protein levels and activity in the brains of subjects with Alzheimer disease and mild cognitive impairment, *Biochim. Et. Biophys. Acta* 1812(2011)480–487.

Barone E, Di Domenico F, Cenini G, Sultana R, Coccia R, Preziosi P, Perluigi M, Mancuso C, Butterfield DA, Oxidative and nitrosative modifications of biliverdin reductase-A in the brain of subjects with Alzheimer's disease and amnesic mild cognitive impairment, *J.Alzheimer's Dis.:*Jad.25(2011)623–633.

Basile KJ, Guy VC, Schwartz S, Grant SF. Overlap of genetic susceptibility to type 1 diabetes, type 2 diabetes, and latent autoimmune diabetes in adults. *Curr Diab Rep.* 2014;14(11):550.

Bastard JP, Jardel C, Bruckert E, Blondy P, Capeau J, Laville M, Vidal H, Hainque B. Elevated levels of interleukin 6 are reduced in serum and subcutaneous adipose tissue of obese women after weight loss. *J Clin Endocrinol Metab.* 2000 Sep;85(9):3338-42.

Bastard JP, Maachi M, Lagathu C, Kim MJ, Caron M, Vidal H, Capeau J, Feve B. Recent advances in the relationship between obesity, inflammation, and insulin resistance. *Eur Cytokine Netw.* 2006 Mar;17(1):4-12.

Bellentani S, Scaglioni F, Marino M, Bedogni G. Epidemiology of non-alcoholic fatty liver disease. *Dig Dis.* 2010;28(1):155-61.

Berschneider B, Ellwanger DC, Baarsma HA, Thiel C, Shimbori C, White ES, Kolb M, Neth P, Königshoff M. miR-92a regulates TGF- β 1-induced WISP1 expression in pulmonary fibrosis. *Int J Biochem Cell Biol* 2014, 53, 432–441.

Bhala N, Angulo P, van der Poorten D, Lee E, Hui JM, Saracco G, Adams LA, Charatcharoenwitthaya P, Topping JH, Bugianesi E, Day CP, George J. The natural history of nonalcoholic fatty liver disease with advanced fibrosis or cirrhosis: an international collaborative study. *Hepatology* 2011; 54(4):1208-16.

Biddinger SB, Kahn CR. From mice to men: insights into the insulin resistance syndromes. *Annu Rev Physiol.* 2006; 68:123-58.

Born J, Lange T, Kern W, McGregor GP, Bickel U, Fehm HL. Sniffing neuropeptides: a transnasal approach to the human brain. *Nat Neurosci.* 2002 Jun;5(6):514-6.

Browning JD, Szczepaniak LS, Dobbins R, Nuremberg P, Horton JD, Cohen JC et al. Prevalence of hepatic steatosis in an urban population in the United States: impact of ethnicity. *Hepatology.* 2004 Dec;40(6):1387-95.

Brunt EM, Janney CG, Di Bisceglie AM, Neuschwander-Tetri BA, Bacon BR. Nonalcoholic steatohepatitis: a proposal for grading and staging the histological lesions. *Am J Gastroenterol* 1999; 94:2467-2474.

Bugianesi E, Gastaldelli A, Vanni E, Gambino R, Cassader M, Baldi S, Ponti V, Pagano G, Ferrannini E, Rizzetto M. Insulin resistance in non-diabetic patients with non-alcoholic fatty liver disease: sites and mechanisms. *Diabetologia*. 2005 Apr;48(4):634-42.

Caccamo A, S. Majumder, A. Richardson, R. Strong, S. Oddo, Molecularinter- play between mammalian target of rapamycin (mTOR), amyloid-beta, and Tau: effects on cognitive impairments, *J.Biol.Chem.*285(2010)13107–13120.

Chalasani N, Younossi Z, Lavine JE, Diehl AM, Brunt EM, Cusi K, Charlton M, Sanyal AJ. The diagnosis and management of non-alcoholic fatty liver disease: practice Guideline by the American Association for the Study of Liver Diseases, American College of Gastroenterology, and the American Gastroenterological Association. *Hepatology*. 2012 Jun;55(6):2005-23.

Chambers JC, Elliott P, Zabaneh D, Zhang W, Li Y, Froguel P, Balding D, Scott J, Kooner JS. Common genetic variation near MC4R is associated with waist circumference and insulin resistance. *Nat Genet*. 2008 Jun;40(6):716-8.

Chobot A, Górowska-Kowolik K, Sokołowska M, Jarosz-Chobot P. Obesity and diabetes-Not only a simple link between two epidemics. *Diabetes Metab Res Rev*. 2018 Oct;34(7): e3042.

Cimini FA, Barchetta I, Porzia A, Mainiero F, Costantino C, Bertocchini L, **Ceccarelli V**, Morini S, Baroni MG, Lenzi A, Cavallo MG. Circulating IL-8 levels are increased in patients with type 2 diabetes and associated with worse inflammatory and cardiometabolic profile. *Acta Diabetol*. 2017 Oct;54(10):961-967.

Cimini FA, Barchetta I, Ciccarelli G, Leonetti F, Silecchia G, Chiappetta C, Di Cristofano C, Capoccia D, Bertocchini L, **Ceccarelli V**, Carletti R, Fraioli A, Baroni MG, Morini S, Cavallo MG. Adipose tissue remodelling in obese subjects is a determinant of presence and severity of fatty liver disease. *Diabetes Metab Res Rev*. 2020 May 29: e3358. doi: 10.1002/dmrr.3358. Epub ahead of print. PMID: 32469428.

Cinti S, Mitchell G, Barbatelli G, Murano I, Ceresi E, Faloia E, Wang S, Fortier M, Greenberg AS, Obin MS. Adipocyte death defines macrophage localization and function in adipose tissue of obese mice and humans. *J Lipid Res*. 2005 Nov;46(11):2347-55.

Copps KD, White MF. Regulation of insulin sensitivity by serine/threonine phosphorylation of insulin receptor substrate proteins IRS1 and IRS2. *Diabetologia*. 2012 Oct;55(10):2565-2582.

Day CP, James OF. Steatohepatitis: a tale of two "hits"? *Gastroenterology*. 1998 Apr;114(4):842-5. doi: 10.1016/s0016-5085(98)70599-2.

De Fronzo RA, tripathy D. Skeletal muscle insulin resistance is the primary defect in type 2 diabetes. *Diabetes Care* 2009;32(Suppl 2): S157-S163.

D'Ignazio L, Bandarra D, Rocha S. NF- κ B and HIF crosstalk in immune responses. *FEBS J*. 2016 Feb;283(3):413-24.

Donath MY, Shoelson SE. Type 2 diabetes as an inflammatory disease. *Nat Rev Immunol*. 2011 Feb;11(2):98-107.

Dresner A, Laurent D, Marcucci M, Griffin ME, Dufour S, Cline GW, Slezak LA, Andersen DK, Hundal RS, Rothman DL, Petersen KF, Shulman GI. Effects of free fatty acids on glucose transport and IRS-1-associated phosphatidylinositol 3-kinase activity. *J Clin Invest*. 1999 Jan;103(2):253-9.

Duncan BB, Schmidt MI, Pankow JS, Ballantyne CM, Couper D, Vigo A, Hoogeveen R, Folsom AR, Heiss G; Atherosclerosis Risk in Communities Study. Low-grade systemic inflammation and the development of type 2 diabetes: the atherosclerosis risk in communities study. *Diabetes*. 2003 Jul;52(7):1799-805.

Eckel RH, Grundy SM, Zimmet PZ. The metabolic syndrome. *Lancet*. 2005 Apr 16-22;365(9468):1415-28.

Eslam M, Sanyal AJ, George J; International Consensus Panel. MAFLD: A Consensus-Driven Proposed Nomenclature for Metabolic Associated Fatty Liver Disease. *Gastroenterology*. 2020 May;158(7):1999-2014.e1.

Evans RM, Barish GD, Wang YX. PPARs and the complex journey to obesity. *Nat Med*. 2004 Apr;10(4):355-61.

Fairbrother U, Kidd E, Malagamuwa T, Walley A. Genetics of Severe Obesity. *Curr Diab Rep.* 2018 Aug 18;18(10):85.

Farrell GC, Larter CZ. Nonalcoholic fatty liver disease: from steatosis to cirrhosis. *Hepatology* 2006;43(2 Suppl 1): S99-S112.

Festa A, D'Agostino R Jr, Tracy RP, Haffner SM; Insulin Resistance Atherosclerosis Study. Elevated levels of acute-phase proteins and plasminogen activator inhibitor-1 predict the development of type 2 diabetes: the insulin resistance atherosclerosis study. *Diabetes.* 2002 Apr;51(4):1131-7.

Ford ES, Giles WH, Dietz WH. Prevalence of the metabolic syndrome among US adults: findings from the third National Health and Nutrition Examination Survey. *JAMA.* 2002 Jan 16;287(3):356-9.

Frayling TM, Timpson NJ, Weedon MN, Zeggini E, Freathy RM, Lindgren CM, Perry JR, Elliott KS, Lango H, Rayner NW, Shields B, Harries LW, Barrett JC, Ellard S, Groves CJ, Knight B, Patch AM, Ness AR, Ebrahim S, Lawlor DA, Ring SM, Ben-Shlomo Y, Jarvelin MR, Sovio U, Bennett AJ, Melzer D, Ferrucci L, Loos RJ, Barroso I, Wareham NJ, Karpe F, Owen KR, Cardon LR, Walker M, Hitman GA, Palmer CN, Doney AS, Morris AD, Smith GD, Hattersley AT, McCarthy MI. A common variant in the FTO gene is associated with body mass index and predisposes to childhood and adult obesity. *Science.* 2007 May 11;316(5826):889-94.

Fried SK, Bunkin DA, Greenberg AS. Omental and subcutaneous adipose tissues of obese subjects release interleukin-6: depot difference and regulation by glucocorticoid. *J Clin Endocrinol Metab.* 1998 Mar;83(3):847-50.

Frühbeck G. The healthy weight debate: does it apply to weight loss in obesity? *Endocrinol Nutr.* 2013;60 Suppl 1:29-32.

Gami AS, Witt BJ, Howard DE, et al. Metabolic syndrome and risk of incident cardiovascular events and death: a systematic review and meta-analysis of longitudinal studies. *J Am Coll Cardiol.* 2007 Jan 30, 49(4):403-14.

Gaulton KJ, Ferreira T, Lee Y, et al.; Diabetes Genetics Replication And Meta-analysis (DIAGRAM) Consortium. Genetic fine mapping and genomic annotation defines causal mechanisms at type 2 diabetes susceptibility loci. *Nat Genet.* 2015 Dec;47(12):1415-25.

Gibbs PE, Lerner-Marmarosh N, Poulin A, Farah E, Maines MD. Human biliverdin reductase-based peptides activate and inhibit glucose uptake through direct interaction with the kinase domain of insulin receptor. *FASEB J.* 2014 Jun;28(6):2478-91.

Gibbs PE, Miralem T, Lerner-Marmarosh N, Maines MD. Nanoparticle Delivered Human Biliverdin Reductase-Based Peptide Increases Glucose Uptake by Activating IRK/Akt/GSK3 Axis: The Peptide Is Effective in the Cell and Wild-Type and Diabetic Ob/Ob Mice. *J Diabetes Res.* 2016;2016: 4712053.

Giovannucci E, Metabolic syndrome, hyperinsulinemia, and colon cancer: a review. *Am J Clin Nutr* 2007 Sep. 86(3): s836-42.

Goodarzi MO. Genetics of obesity: what genetic association studies have taught us about the biology of obesity and its complications. *Lancet Diabetes Endocrinol.* 2018 Mar;6(3):223-236.

Grundy SM, Cleeman JI, Daniels SR, Donato KA, Eckel RH, Franklin BA. Diagnosis and management of the metabolic syndrome. An American Heart Association/National Heart, Lung, and Blood Institute Scientific Statement. Executive Summary. *Circulation* 2005.

Guariguata L, Whiting DR, Hambleton I, Beagley J, Linnenkamp U, Shaw JE. Global estimates of diabetes prevalence for 2013 and projections for 2035. *Diabetes Res Clin Pract.* 2014 Feb;103(2):137-49.

Guilherme A, Virbasius JV, Puri V, Czech MP. Adipocyte dysfunctions linking obesity to insulin resistance and type 2 diabetes. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2008 May;9(5):367-77.

Guo S. Insulin signaling, resistance, and the metabolic syndrome: insights from mouse models into disease mechanisms. *J Endocrinol.* 2014 Jan 8;220(2): T1-T23.

Häcker H, Karin M. Regulation and function of IKK and IKK-related kinases. *Sci STKE*. 2006 Oct 17;2006(357): re13.

Haeusler RA, TE McGraw and D. Accili, Biochemical and cellular properties of insulin receptor signalling. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2018. 19(1): p. 31-44.

Herder C, Illig T, Rathmann W, Martin S, Haastert B, Müller-Scholze S, Holle R, Thorand B, Koenig W, Wichmann HE, Kolb H; KORA Study Group. Inflammation and type 2 diabetes: results from KORA Augsburg. *Gesundheitswesen*. 2005 Aug;67 Suppl 1: S115-21.

Herzberg-Schafer SA. Evaluation of fasting state-/oral glucose tolerance test-derived measures of insulin release for the detection of genetically impaired beta-cell function. *PLoS One*, 2010. 5(12): p. e14194.

Hinds TD Jr, Adeosun SO, Alamodi AA, Stec DE. Does bilirubin prevent hepatic steatosis through activation of the PPAR α nuclear receptor? *Med Hypotheses*. 2016 Oct; 95: 54-57.

Hinds TD Jr, Burns KA, Hosick PA, McBeth L, Nestor-Kalinoski A, Drummond HA, AlAmodi AA, Hankins MW, Vanden Heuvel JP, Stec DE. Biliverdin Reductase A Attenuates Hepatic Steatosis by Inhibition of Glycogen Synthase Kinase (GSK) 3 β Phosphorylation of Serine 73 of Peroxisome Proliferator-activated Receptor (PPAR) α . *J Biol Chem*. 2016 Nov 25;291(48):25179-25191.

Horwood JM, Dufour F, Laroche S, Davis S. Signalling mechanisms mediated by the phosphoinositide 3-kinase/Akt cascade in synaptic plasticity and memory in the rat. *Eur J Neurosci*. 2006 Jun;23(12):3375-84.

Kahn BB, Flier JS. Obesity and insulin resistance. *J Clin Invest* 2000;106: 473-81.

Kapitulnik J, Maines MD. Pleiotropic functions of biliverdin reductase: cellular signaling and generation of cytoprotective and cytotoxic bilirubin. *Trends Pharmacol Sci*, 2009. 30(3): p. 129-37.

Kelly M, Keller C, Avilucea PR, Keller P, Luo Z, Xiang X, Giralt M, Hidalgo J, Saha AK, Pedersen BK, Ruderman NB. AMPK activity is diminished in tissues of IL-6 knockout mice: the effect of exercise. *Biochem Biophys Res Commun*. 2004 Jul 23;320(2):449-54.

Kershaw EE, Flier JS. Adipose tissue as an endocrine organ. *J Clin Endocrinol Metab.* 2004 Jun;89(6):2548-56.

Kikuchi A, Park SY, Miyatake H, Sun D, Sato M, Yoshida T, Shiro Y. Crystal structure of rat biliverdin reductase. *Nat Struct Biol.* 2001 Mar;8(3):221-5.

Kim JK, Fillmore JJ, Chen Y, Yu C, Moore IK, Pypaert M, Lutz EP, Kako Y, Velez-Carrasco W, Goldberg IJ, Breslow JL, Shulman GI. Tissue-specific overexpression of lipoprotein lipase causes tissue-specific insulin resistance. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2001 Jun 19;98(13):7522-7.

Kleiner DE, Brunt EM. Nonalcoholic fatty liver disease: pathologic patterns and biopsy evaluation in clinical research. *Semin Liver Dis,* 2012. 32(1): p. 3-13.

Kobashi C, Asamizu S, Ishiki M, Iwata M, Usui I, Yamazaki K, Tobe K, Kobayashi M, Urakaze M. Inhibitory effect of IL-8 on insulin action in human adipocytes via MAP kinase pathway. *J Inflamm (Lond).* 2009 Aug 27; 6:25.

Kumar S, Kelly AS. Review of Childhood Obesity: From Epidemiology, Etiology, and Comorbidities to Clinical Assessment and Treatment. *Mayo Clin Proc* 2017; 92:251-65.

Kutty RK, Maines MD. Purification and characterization of biliverdin reductase from rat liver. *J Biol Chem.* 1981 Apr 25;256(8):3956-62.

Lee YS, Poh LK, Loke KY. A novel melanocortin 3 receptor gene (MC3R) mutation associated with severe obesity. *J Clin Endocrinol Metab.* 2002 Mar;87(3):1423-6.

Lerner-Marmarosh N, Shen J, Torno MD, Kravets A, Hu Z, Maines MD. Human biliverdin reductase: a member of the insulin receptor substrate family with serine/threonine/tyrosine kinase activity. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2005 May 17;102(20):7109-14.

Lidofsky SD. Nonalcoholic fatty liver disease: diagnosis and relation to metabolic syndrome and approach to treatment. *Curr Diab Rep.* 2008 Feb; 8(1):25-30.

Loomba R, Sanyal AJ. The global NAFLD epidemic. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol* 2013; 10(11):686-90.

Louie SM, Roberts LS, Nomura DK. Mechanisms linking obesity and cancer. *Biochim Biophys Acta*. 2013 Oct;1831(10):1499-508.

Machado MV, Ferreira DM, Castro RE, Silvestre AR, Evangelista T, Coutinho J, Carepa F, Costa A, Rodrigues CM, Cortez-Pinto H. Liver and muscle in morbid obesity: the interplay of fatty liver and insulin resistance. *PLoS One*. 2012;7(2): e31738.

Makki K, Froguel P, Wolowczuk I. Adipose tissue in obesity-related inflammation and insulin resistance: cells, cytokines, and chemokines. *ISRN Inflamm*. 2013 Dec 22;2013: 139239.

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.

McCullough AJ. The clinical features, diagnosis and natural history of nonalcoholic fatty liver disease. *Clin Liver Dis* 2004 Aug;8(3):521-33.

Misiak B, Leszek J, Kiejna A. Metabolic syndrome, mild cognitive impairment and Alzheimer's disease--the emerging role of systemic low-grade inflammation and adiposity. *Brain Res Bull*. 2012 Nov 1;89(3-4):144-9.

Mofrad P, Contos MJ, Haque M, Sargeant C, Fisher RA, Luketic VA, Sterling RK, Shiffman ML, Stravitz RT, Sanyal AJ. Clinical and histologic spectrum of nonalcoholic fatty liver disease associated with normal ALT values. *Hepatology*. 2003 Jun;37(6):1286-92.

Mokhlesi B. Obesity hypoventilation syndrome: a state-of-the-art review. *Respir Care*. 2010 Oct;55(10):1347-62; discussion 1363-5.

Morris AP, Voight BF et al., Wellcome Trust Case Control Consortium; Meta-Analyses of Glucose and Insulin-related traits Consortium (MAGIC) Investigators; Genetic Investigation of ANthropometric Traits (GIANT) Consortium; Asian Genetic Epidemiology Network–Type 2 Diabetes (AGEN-T2D) Consortium; South Asian Type 2 Diabetes (SAT2D) Consortium, DIAbetes

Genetics Replication And Meta-analysis (DIAGRAM) Consortium. Large-scale association analysis provides insights into the genetic architecture and pathophysiology of type 2 diabetes. *Nat Genet.* 2012 Sep;44(9):981-90.

Murahovschi V, Pivovarova O, Ilkavets I, Dmitrieva RM, Döcke S, Keyhani-Nejad F, Gögebakan Ö, Osterhoff M, Kemper M, Hornemann S, Markova M, Klöting N, Stockmann M, Weickert MO, Lamounier-Zepter V, Neuhaus P, Konradi A, Dooley S, von Loeffelholz C, Blüher M, Pfeiffer AF, Rudovich N. WISP1 is a novel adipokine linked to inflammation in obesity. *Diabetes* 2015, 64, 856-66.

Niederauer CM, Binkley TL, Specker BL. Effect of truncal adiposity on plasma lipid and lipoprotein concentrations. *J Nutr Health Aging.* 2006 Mar- Apr;10(2):154-60.

O'Brien L, Hosick PA, John K, Stec DE, Hinds TD Jr. Biliverdin reductase isozymes in metabolism. *Trends Endocrinol Metab.* 2015 Apr;26(4):212-20.

Oeckinghaus A, Hayden MS, Ghosh S. Crosstalk in NF- κ B signaling pathways. *Nat Immunol.* 2011 Jul 19;12(8):695-708.

Okada T, Kawano Y, Sakakibara T, Hazeki O, Ui M. Essential role of phosphatidylinositol 3-kinase in insulin-induced glucose transport and anti-lipolysis in rat adipocytes. Studies with a selective inhibitor wortmannin. *J Biol Chem* 1994; 269: 3568–3573.

Ouchi N, Parker JL, Lugus JJ, Walsh K. Adipokines in inflammation and metabolic disease. *Nat Rev Immunol.* 2011 Feb;11(2):85-97.

Oyeyemi BF, Ologunde CA, Olaoye AB, Alamukii NA. FTO Gene Associates and Interacts with Obesity Risk, Physical Activity, Energy Intake, and Time Spent Sitting: Pilot Study in a Nigerian Population. *J Obes.* 2017; 2017:3245270.

Park BJ, Kim YJ, Kim DH, Kim W, Jung YJ, Yoon JH. Visceral adipose tissue area is an independent risk factor for hepatic steatosis. *J Gastroenterol Hepatol* 2008; 23:900-7.

Park YW, Zhu S, Palaniappan L, Heshka S, Carnethon MR, Heymsfield SB. The metabolic syndrome: prevalence and associated risk factor findings in the US population from the Third National Health and Nutrition Examination Survey, 1988-1994. *Arch Intern Med.* 2003 Feb 24;163(4):427-36.

Pasarica M, Sereda OR, Redman LM, Albarado DC, Hymel DT, Roan LE, Rood JC, Burk DH, Smith SR. Reduced adipose tissue oxygenation in human obesity: evidence for rarefaction, macrophage chemotaxis, and inflammation without an angiogenic response. *Diabetes.* 2009 Mar;58(3):718-25.

Pellegrinelli V, Carobbio S, Vidal-Puig A. Adipose tissue plasticity: how fat depots respond differently to pathophysiological cues. *Diabetologia.* 2016; 59(6):1075-88.

Pennica D, Swanson TA, Welsh JW, Roy MA, Lawrence DA, Lee J, Brush J, Rasmussen MH, Jensen LT, Andersen T, Breum L, Hilsted J. Collagen metabolism in obesity: the effect of weight loss. *Int J Obes Relat Metab Disord* 1995, 19, 659-663.

Porter MH, Cutchins A, Fine JB, Bai Y, DiGirolamo M. Effects of TNF-alpha on glucose metabolism and lipolysis in adipose tissue and isolated fat-cell preparations. *J Lab Clin Med.* 2002 Mar;139(3):140-6.

Prasad RB, Groop L. Genetics of type 2 diabetes-pitfalls and possibilities. *Genes (Basel).* 2015 Mar 12;6(1):87-123.

Remick DG. Interleukin-8. *Crit Care Med.* 2005 Dec;33(12 Suppl): S466-7.

Rivera EJ, A. Goldin, N. Fulmer, R. Tavares, J.R. Wands, S.M. delaMonte, Insulin and insulin-like growth factor expression and function deteriorate with Progression of Alzheimer's disease: link to brain reductions in acetylcholine, *J. Alzheimer's Dis.: Jad.*8(2005)247–268.

Roden M, Krssak M, Stingl H, Gruber S, Hofer A, Fürnsinn C, Moser E, Waldhäusl W. Rapid impairment of skeletal muscle glucose transport/phosphorylation by free fatty acids in humans. *Diabetes.* 1999 Feb;48(2):358-64.

Roden M, Price TB, Perseghin G, Petersen KF, Rothman DL, Cline GW, Shulman GI. Mechanism of free fatty acid-induced insulin resistance in humans. *J Clin Invest.* 1996 Jun 15;97(12):2859-65.

Rotter V, Nagaev I, Smith U. Interleukin-6 (IL-6) induces insulin resistance in 3T3-L1 adipocytes and is, like IL-8 and tumor necrosis factor-alpha, overexpressed in human fat cells from insulin-resistant subjects. *J Biol Chem.* 2003 Nov 14;278(46):45777-84.

Sahin Ersoy G, Altun Ensari T, Subas S, Giray B, Simsek EE, Cevik O. WISP1 is a novel adipokine linked to metabolic parameters in gestational diabetes mellitus. *J Matern Fetal Neonatal Med.* 2017 Apr;30(8):942-946.

Sahin Ersoy G, Altun Ensari T, Vatansever D, Emirdar V, Cevik O. Novel adipokines WISP1 and betatrophin in PCOS: relationship to AMH levels, atherogenic and metabolic profile. *Gynecol Endocrinol.* 2017 Feb;33(2):119-123.

Saltiel AR, Kahn CR. Insulin signalling and the regulation of glucose and lipid metabolism. *Nature.* 2001 Dec 13;414(6865):799-806.

Sasaoka T, Ishiki M, Sawa T, Ishihara H, Takata Y, Imamura T, Usui I, Olefsky JM, Kobayashi M. Comparison of the insulin and insulin-like growth factor 1 mitogenic intracellular signaling pathways. *Endocrinology.* 1996 Oct;137(10):4427-34.

Schattenberg JM, Wang Y, Singh R, Rigoli RM, Czaja MJ. Hepatocyte CYP2E1 overexpression and steatohepatitis lead to impaired hepatic insulin signaling. *J Biol Chem.* 2005 Mar 18;280(11):9887-94.

Scuteri A, Sanna S, Chen WM, Uda M, Albai G, Strait J, Najjar S, Nagaraja R, Orrú M, Usala G, Dei M, Lai S, Maschio A, Busonero F, Mulas A, Ehret GB, Fink AA, Weder AB, Cooper RS, Galan P, Chakravarti A, Schlessinger D, Cao A, Lakatta E, Abecasis GR. Genome-wide association scan shows genetic variants in the FTO gene are associated with obesity-related traits. *PLoS Genet.* 2007 Jul;3(7): e115.

Senn JJ, Klover PJ, Nowak IA, Mooney RA. Interleukin-6 induces cellular insulin resistance in hepatocytes. *Diabetes.* 2002 Dec;51(12):3391-9.

Senn JJ, Klover PJ, Nowak IA, Zimmers TA, Koniaris LG, Furlanetto RW, Mooney RA. Suppressor of cytokine signaling-3 (SOCS-3), a potential mediator of interleukin-6-dependent insulin resistance in hepatocytes. *J Biol Chem*. 2003 Apr 18;278(16):13740-6.

Serdula MK, Ivery D, Coates RJ, Freedman DS, Williamson DF, Byers T. Do obese children become obese adults? A review of the literature. *Prev Med*. 1993 Mar;22(2):167-77.

Shabana, Hasnain S. Prevalence of POMC R236G mutation in Pakistan. *Obes Res Clin Pract*. 2016 Sep;10 Suppl 1: S110-S116.

Shepherd PR, Withers DJ, Siddle K. Phosphoinositide 3-kinase: the key switch mechanism in insulin signalling. *Biochem J*. 1998 Aug 1;333 (Pt 3):471-90.

Sherar LB, Eisenmann JC, Chilibeck PD, Muhajarine N, Martin S, Bailey DA, Baxter-Jones AD. Relationship between trajectories of trunk fat mass development in adolescence and cardiometabolic risk in young adulthood. *Obesity (Silver Spring)*. 2011 Aug;19(8):1699-706.

Shi H, Kokoeva MV, Inouye K, Tzameli I, Yin H, Flier JS. TLR4 links innate immunity and fatty acid-induced insulin resistance. *J Clin Invest*. 2006 Nov;116(11):3015-25.

Shoelson SE, Herrero L, Naaz A. Obesity, inflammation, and insulin resistance. *Gastroenterology*. 2007 May;132(6):2169-80.

Songyang Z, Shoelson SE, McGlade J, Olivier P, Pawson T, Bustelo XR, Barbacid M, Sabe H, Hanafusa H, Yi T, et al. Specific motifs recognized by the SH2 domains of Csk, 3BP2, fps/fes, GRB-2, HCP, SHC, Syk, and Vav. *Mol Cell Biol*. 1994 Apr;14(4):2777-85.

Spranger J, Kroke A, Möhlig M, Hoffmann K, Bergmann MM, Ristow M, Boeing H, Pfeiffer AF. Inflammatory cytokines and the risk to develop type 2 diabetes: results of the prospective population-based European Prospective Investigation into Cancer and Nutrition (EPIC)-Potsdam Study. *Diabetes*. 2003 Mar;52(3):812-7.

Starkie R, Ostrowski SR, Jauffred S, Febbraio M, Pedersen BK. Exercise and IL-6 infusion inhibit endotoxin-induced TNF- α production in humans. *FASEB J*. 2003 May;17(8):884-6.

Stec DE, Gordon DM, Nestor-Kalinoski AL, Donald MC, Mitchell ZL, Creeden JF, Hinds TD Jr. Biliverdin Reductase A (BVRA) Knockout in Adipocytes Induces Hypertrophy and Reduces Mitochondria in White Fat of Obese Mice. *Biomolecules*. 2020 Mar 2;10(3):387.

Stec DE, John K, Trabbic CJ, Luniwal A, Hankins MW, Baum J, Hinds TD Jr. Bilirubin Binding to PPAR α Inhibits Lipid Accumulation. *PLoS One*. 2016 Apr 12;11(4): e0153427.

Steen E, B.M. Terry, E.J. Rivera, J.L. Cannon, T.R. Neely, R. Tavares, X.J. Xu, J. R. Wands, S.M. de laMonte, Impaired insulin and insulin-like growth factor Expression and signaling mechanisms in Alzheimer's disease—is this type 3 diabetes? *J. Alzheimer's Dis.: Jad*.7(2005)63–80.

Takeda K, Ichiki T, Tokunou T, Iino N, Fujii S, Kitabatake A, Shimokawa H, Takeshita A. Critical role of Rho-kinase and MEK/ERK pathways for angiotensin II-induced plasminogen activator inhibitor type-1 gene expression. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2001 May;21(5):868-73.

Talbot K, Wang HY, Kazi H, Han LY, Bakshi KP, Stucky A, Fuino RL, Kawaguchi KR, Samoyedny AJ, Wilson RS, Arvanitakis Z, Schneider JA, Wolf BA, Bennett DA, Trojanowski JQ, Arnold SE. Demonstrated brain insulin resistance in Alzheimer's disease patients is associated with IGF-1 resistance, IRS-1 dysregulation, and cognitive decline. *J Clin Invest*. 2012 Apr;122(4):1316-38.

Tao H, Yang JJ, Shi KH, Li J. Wnt signaling pathway in cardiac fibrosis: new insights and directions. *Metabolism* 2016, 65, 30–40.

Tilg H, Moschen AR. Evolution of inflammation in nonalcoholic fatty liver disease: the multiple parallel hits hypothesis. *Hepatology* 2010; 52(5):1836-46.

Trayhurn P, Wood IS. Adipokines: inflammation and the pleiotropic role of white adipose tissue. *Br J Nutr*. 2004 Sep;92(3):347-55.

Tudor C, Lerner-Marmarosh N, Engelborghs Y, Gibbs PE, Maines MD. Biliverdin reductase is a transporter of haem into the nucleus and is essential for regulation of HO-1 gene expression by haematin. *Biochem J.* 2008 Aug 1;413(3):405-16.

Vaisse C, Clement K, Guy-Grand B, Froguel P. A frameshift mutation in human MC4R is associated with a dominant form of obesity. *Nat Genet.* 1998 Oct;20(2):113-4.

Van Gaal LF, Maggioni AP. Overweight, obesity, and outcomes: fat mass and beyond. *Lancet.* 2014 Mar 15;383(9921):935-6.

Visser M, Bouter LM, McQuillan GM, Wener MH, Harris TB. Elevated C-reactive protein levels in overweight and obese adults. *JAMA.* 1999 Dec 8;282(22):2131-5.

Wellen KE, Hotamisligil GS. Obesity-induced inflammatory changes in adipose tissue. *J Clin Invest.* 2003 Dec;112(12):1785-8.

Whitaker RC, Wright JA, Pepe MS, Seidel KD, Dietz WH. Predicting obesity in young adulthood from childhood and parental obesity. *N Engl J Med.* 1997 Sep 25;337(13):869-73.

White MF. Insulin signaling in health and disease. *Science.* 2003 Dec 5;302(5651):1710-1.

Whitehead JP, Humphreys P, Krook A, Jackson R, Hayward A, Lewis H, Siddle K, O'Rahilly S. Molecular scanning of the insulin receptor substrate 1 gene in subjects with severe insulin resistance: detection and functional analysis of a naturally occurring mutation in a YMXM motif. *Diabetes.* 1998 May;47(5):837-9.

Wieckowska A, McCullough AJ, Feldstein AE. Noninvasive diagnosis and monitoring of nonalcoholic steatohepatitis: present and future. *Hepatology.* 2007 Aug;46(2):582-9.

Wilcox G. Insulin and insulin resistance. *Clin Biochem Rev.* 2005 May;26(2):19-39.

Wolf A, D.A. Bennett, J.Q. Trojanowski, S.E. Arnold, Demonstrated brain insulin resistance in Alzheimer's disease patients is associated with IGF-1 resistance, IRS-1 dysregulation and cognitive decline, *J. Clin. Investig.* 122(2012) 1316–1338.

Xu H, Barnes GT, Yang Q, Tan G, Yang D, Chou CJ, Sole J, Nichols A, Ross JS, Tartaglia LA, Chen H. Chronic inflammation in fat plays a crucial role in the development of obesity-related insulin resistance. *J Clin Invest* 2003; 112:1821–30.

Yamauchi T, Tobe K, Tamemoto H, Ueki K, Kaburagi Y, Yamamoto-Honda R et al. Insulin signalling and insulin actions in the muscles and livers of insulin-resistant, insulin receptor substrate 1-deficient mice. *Mol Cell Biol* 1996; 16: 3074–3084.

Ye J. Mechanisms of insulin resistance in obesity. *Front Med*. 2013 Mar;7(1):14-24.

Yeo GS, Farooqi IS, Aminian S, Halsall DJ, Stanhope RG, O'Rahilly S. A frameshift mutation in MC4R associated with dominantly inherited human obesity. *Nat Genet*. 1998 Oct;20(2):111-2.

Yudkin JS. Adipose tissue, insulin action and vascular disease: inflammatory signals. *Int J Obes Relat Metab Disord*. 2003 Dec;27 Suppl 3: S25-8.

Yumuk V, Tsigos C, Fried M, Schindler K, Busetto L, Micic D, Toplak H. Obesity Management Task Force of the European Association for the Study of Obesity. *Obes Facts* 2015;8: 402-424.

Zeng G, Nystrom FH, Ravichandran LV, Cong LN, Kirby M, Mostowski H, Quon MJ. Roles for insulin receptor, PI3-kinase, and Akt in insulin-signaling pathways related to production of nitric oxide in human vascular endothelial cells. *Circulation*. 2000 Apr 4;101(13):1539-45.

Zhang M, Xin W, Yi Z, Li Y, Liu Y, Zhang H, Chen H, Chen X, Tan S, Zhu D. Human biliverdin reductase regulates the molecular mechanism underlying cancer development. *J Cell Biochem*. 2018 Feb;119(2):1337-1345.

Zhang Q, Zhang C, Li X, Yu Y, Liang K, Shan X, Zhao K, Niu Q, Tian Z. WISP1 Is Increased in Intestinal Mucosa and Contributes to Inflammatory Cascades in Inflammatory Bowel Disease. *Dis Markers*. 2016; 2016: 3547096.

Ziccardi P, Nappo F, Giugliano G, Esposito K, Marfella R, Cioffi M, D'Andrea F, Molinari AM, Giugliano D. Reduction of inflammatory cytokine concentrations and improvement of endothelial functions in obese women after weight loss over one year. *Circulation*. 2002 Feb 19;105(7):804-9.

PUBBLICAZIONI SCIENTIFICHE SU RIVISTE INTERNAZIONALI DERIVANTI DAL PERIODO DI DOTTORATO

a) Pubblicazioni specifiche del progetto di dottorato

Cimini FA, Arena A, Barchetta I, Tramutola A, **Ceccarelli V**, Lanzillotta C, Fontana M, Bertoccini L, Leonetti F, Capoccia D, Silecchia G, Di Cristofano C, Chiappetta C, Di Domenico F, Baroni MG, Perluigi M, Cavallo MG, Barone E. Reduced biliverdin reductase-A levels are associated with early alterations of insulin signaling in obesity. *Biochim Biophys Acta Mol Basis Dis*. 2019 Feb 28. doi: 10.1016/j.bbadis.2019.02.021.

Cimini FA, Barchetta I, Ciccarelli G, Leonetti F, Silecchia G, Chiappetta C, Di Cristofano C, Capoccia D, Bertoccini L, **Ceccarelli V**, Carletti R, Fraioli A, Baroni MG, Morini S, Cavallo MG. Adipose tissue remodelling in obese subjects is a determinant of presence and severity of fatty liver disease. *Diabetes Metab Res Rev*. 2020 May 29: e3358. doi: 10.1002/dmrr.3358. Epub ahead of print. PMID: 32469428.

Ceccarelli V, Barchetta I, Cimini FA, Barone E, Sentinelli F, Coluzzi M, Chiappetta C, Bertoccini L, Tramutola A, Labbadia G, Di Cristofano C, Silecchia G, Leonetti F, Cavallo MG. Circulating dipeptidyl peptidase-4 is independently associated with the presence and severity of NAFLD/NASH in individuals with and without obesity and metabolic disease. *J Endocrinol Invest*. 2020 Aug 27. doi:10.1007/s40618-020-01392-5. Epub ahead of print. PMID: 32852705.

Ceccarelli V, Barchetta I, Cimini FA, Bertoccini L, Chiappetta C, Capoccia D, Di Cristofano C, Silecchia G, Fontana M, Leonetti F, Lenzi A, Baroni MG, Barone E, Cavallo MG. Relationship between BVR-A expression and adipose tissue inflammation in human obesity. *Manuscript Submitted*.

Cimini FA, Barchetta I, **Ceccarelli V**, Chiappetta C, Di Stasio A, Bertoccini L, Sentinelli F, Leonetti F, Silecchia G, Di Cristofano C, Baroni MG, Velotti F, Cavallo MG. Granzyme B expression in visceral adipose tissue associates with local inflammation and glyco-metabolic alterations in obesity. *Manuscript Submitted.*

Ceccarelli V et al. BVR-A expression during OGTT in healthy and insulin-resistant individuals. *Manuscript in preparation.*

b) Pubblicazioni derivanti da altri studi collaborativi

Barchetta I, Cimini FA, Chiappetta C, Bertoccini L, **Ceccarelli V**, Capoccia D, Gaggini M, Di Cristofano C, Della Rocca C, Silecchia G, Leonetti F, Lenzi A, Gastaldelli A, Cavallo MG. Relationship between hepatic and systemic angiopoietin-like 3, hepatic Vitamin D receptor expression and NAFLD in obesity. *Liver Int.* 2020 Jun 8. doi: 10.1111/liv.14554. Epub ahead of print. PMID: 32510837.

Barchetta I, Ciccarelli G, Barone E, Cimini FA, **Ceccarelli V**, Bertoccini L, Sentinelli F, Tramutola A, Del Ben M, Angelico F, Baroni MG, Lenzi A, Cavallo MG. Greater circulating DPP4 activity is associated with impaired flow-mediated dilatation in adults with type 2 diabetes mellitus. *Nutr Metab Cardiovasc Dis.* 2019 Oct;29(10):1087-1094. doi: 10.1016/j.numecd.2019.07.010. Epub 2019 Jul 23. PubMed PMID: 31431395.

Ceccarelli V, Barchetta I, Cimini FA, Bertoccini L, Fraioli A, Alessandri C, Lenzi A, Baroni MG, Cavallo MG. Impaired bone matrix glycoprotein pattern is associated with increased cardio-metabolic risk profile in patients with type 2 diabetes mellitus. *J Endocrinol Invest.* 2019 May;42(5):513-520. doi:10.1007/s40618-018-0941-x. Epub 2018 Aug 21. PMID: 30132286.

Barchetta I, Cimini FA, Capoccia D, Bertoccini L, **Ceccarelli V**, Chiappetta C, Leonetti F, Di Cristofano C, Silecchia G, Orho-Melander M, Melander O, Cavallo MG. Neurotensin Is a Lipid-Induced Gastrointestinal Peptide Associated with Visceral Adipose Tissue Inflammation in Obesity. *Nutrients.* 2018 Apr 23;10(4). pii: E526. doi: 10.3390/nu10040526.

Barchetta I, Ciccarelli G, Cimini FA, **Ceccarelli V**, Orho-Melander M, Melander O, Cavallo MG. Association between systemic leptin and neurotensin concentration in adult individuals with and without type 2 diabetes mellitus. *J Endocrinol Invest.* 2018 Oct;41(10):1159-1163. doi: 10.1007/s40618-018-0845-9. Epub 2018 Feb 7.

ABSTRACTS (comunicazioni orali e/o poster con discussione) DERIVANTI DAL PERIODO DI DOTTORATO

BVR-A expression in human VAT and associations with metabolic and inflammatory alterations.

Ceccarelli V, Cimini FA, Barchetta I, Bertocchini L, Leonetti F, Capoccia D, Silecchia G, Di Cristofano C, Chiappetta C, Baroni MG, Pierluigi M, Barone E, Cavallo MG.

56° Congresso Annuale della Società Europea per lo studio del Diabete (EASD), Settembre 2020, Virtual Meeting.

Liver and adipose tissue expression of VDR is associated with adipose tissue inflammation and hepatic fat accumulation in obese subjects with and without type 2 diabetes.

Cimini FA, Barchetta I, Chiappetta C, Capoccia D, Bertocchini L, **Ceccarelli V**, Di Cristofano C, Silecchia G, Morini S, Baroni MG, Leonetti F, Cavallo MG.

55° Congresso Annuale della Società Europea per lo studio del Diabete (EASD), Settembre 2019, Barcellona.

Increased hepatic Angiopoietin-Like Protein 3 is associated with NAFLD and with liver expression of vitamin D receptor and vitamin D hydroxylases.

Barchetta I, Cimini FA, Chiappetta C, Bertocchini L, **Ceccarelli V**, Capoccia D, Di Cristofano C, Silecchia G, Leonetti F, Cavallo MG.

EASL Non-Alcoholic Fatty Liver Disease (NAFLD) Summit 2019, Settembre 2019, Siviglia.

Elevated plasma proneurotensin levels predict NAFLD and visceral adipose tissue inflammation in adults with and without type 2 diabetes.

Barchetta I, Cimini FA, Leonetti F, Capoccia D, Bertocchini L, **Ceccarelli V**, Silecchia G, Orho-Melander M, Melander O, Cavallo MG.

54° Congresso Annuale della Società Europea per lo studio del Diabete (EASD), Ottobre 2018, Berlino.

Studio della BVR-A e del segnale insulinico in soggetti obesi prima e dopo chirurgia bariatrica.

Cimini FA, Barchetta I, Barone E, **Ceccarelli V**, Bertoccini L, Capoccia D, Leonetti F, Baroni MG, Perluigi M, Cavallo MG.

27° Congresso Nazionale della Società Italiana di Diabetologia (SID), Maggio 2018, Rimini.

Alterati livelli circolanti di Granzima B si associano ad adiposite nel diabete di tipo 2.

Cimini FA, Barchetta I, D'Eliseo D, Bertoccini L, **Ceccarelli V**, Ciccarelli G, Baroni MG, Velotti F, Cavallo MG.

27° Congresso Nazionale della Società Italiana di Diabetologia (SID), Maggio 2018, Rimini.

Biomarcatori dell'osso e aumentato rischio cardiometabolico in pazienti con diabete di tipo 2.

Ceccarelli V, Barchetta I, Cimini FA, Bertoccini L, Alessandri C, Baroni MG, Cavallo MG.

27° Congresso Nazionale della Società Italiana di Diabetologia (SID), Maggio 2018, Rimini.