

UNIVERSITA' DEGLI STUDI DI MILANO

Facoltà di Medicina e Chirurgia

Scuola di Dottorato di Ricerca in Scienze Morfologiche, Fisiologiche e dello Sport

DOTTORATO DI RICERCA IN SCIENZE MORFOLOGICHE
XXIV CICLO



OBESITA' ED EFFETTI BENEFICI DELL'EME OSSIGENASI

Tutor:

Prof.ssa RITA REZZANI

Coordinatore:

Chiar.ma Prof.ssa LAURA VIZZOTTO

Tesi di Dottorato di:

GAIA FAVERO

N. Matr.: R 08071

Anno Accademico 2010-2011

INDICE

ABSTRACT	Pag.1
1.INTRODUZIONE	Pag.3
1.1 Obesità	Pag.3
1.1.1 Obesità e tessuto adiposo	Pag.5
1.1.2 Obesità ed apparato cardiovascolare	Pag.8
1.1.3 Obesità ed apparato urinario	Pag.11
1.2 Emeossigenasi	Pag.14
1.2.1 Emeossigenasi-1	Pag.16
1.2.2 Emeossigenasi-2	Pag. 18
1.2.3 Emeossigenasi-3	Pag.18
1.2.4 Prodotti della reazione catalizzata dall'emeossigenasi	Pag.18
1.2.4.1 Biliverdina	Pag.19
1.2.4.2 Monossido di carbonio	Pag.19
1.2.4.3 Ferro	Pag.21
1.3 Funzioni dell'emeossigenasi-1	Pag.22
1.3.2 Emeossigenasi-1 e tessuto adiposo	Pag.22
1.3.3 Emeossigenasi-1 ed apparato cardiovascolare	Pag.23
1.3.4 Emeossigenasi-1 ed apparato urinario	Pag.24
1.4 Chinasi coinvolte nel pathway dell'emeossigenasi-1	Pag.24
1.4.1 AMP-activate protein kinase-AMPK	Pag.24
1.4.2 Serin/treonin chinasi LKB1	Pag.25
1.4.3 Akt	Pag.26
1.5 Induttori ed inibitori dell'emeossigenasi-1	Pag.27
1.5.1 Acido epossiecosatrienoico	Pag.28
1.5.2 Acido epossiecosatrienoico ed obesità	Pag.30
2. SCOPO DEL PROGETTO DI RICERCA	Pag.31
3. MATERIALI E METODI	Pag.32
3.1 Animali e trattamento	Pag.32
3.2 Valutazione dei parametri metabolici	Pag.33
3.2.1 Food intake e d accumulo di tessuto adiposo	Pag.33
3.3 Analisi biochimica	Pag.33

3.3.1 Analisi della concentrazione di: glucosio, fattore di necrosi tumorale- α , interleuchina-6 ed adiponectina	Pag.33
3.4 Valutazione morfo-funzionale	Pag.34
3.4.1 Preparazione dei tessuti	Pag.34
3.4.2 Analisi morfologica	Pag.34
3.4.3 Analisi morfometrica del tessuto adiposo	Pag.34
3.4.4 Immunofluorescenza per HO-1, AMPK α _I /pAMPK α _I , LKB1/pLKB1, Akt/pAkt ed eNOS	Pag.35
3.4.5 Analisi semiquantitativa	Pag.36
3.5 Western Blotting per HO-1, AMPKα_I/pAMPKα_I, LKB1/pLKB1, Akt/pAkt, , eNOS ed adiponectina	Pag.36
4. RISULTATI	Pag.38
4.1 Valutazione dei parametri metabolici	Pag.38
4.1.1 Food intake, peso corporeo ed accumulo di tessuto adiposo	Pag.38
4.1.2 Glucosio	Pag.38
4.2 Valutazione biochimica	Pag.39
4.2.1 Adiponectina	Pag.39
4.2.2 Fattore di necrosi tumorale- α	Pag.39
4.2.3 Interleuchina-6	Pag.39
4.3 Valutazione morfo-funzionale	Pag.41
4.3.1 Analisi morfologica	Pag.41
4.3.1.1 Tessuto adiposo	Pag.41
4.3.1.2 Aorta	Pag.43
4.3.1.3 Rene	Pag.44
4.3.4 Analisi di immunofluorescenza	Pag.45
4.3.4.1 Emeossigenasi-1	Pag.45
4.3.4.2 AMPK α _I /pAMPK α _I	Pag.46
4.3.4.3 LKB1/pLKB1	Pag.47
4.3.4.4 Akt/pAkt	Pag.48
4.3.4.5 eNOS	Pag.49
4.4 Analisi di Western Blotting	Pag.50
5. DISCUSSIONE	Pag.53
6. RINGRAZIAMENTI	Pag.58
7. BIBLIOGRAFIA	Pag.59

ABSTRACT

Obesity is nowadays a growing global health pandemic disease requiring an urgent intervention.

High dietary fat intake promotes the development of obesity in humans and animal models as a result of an imbalance between energy intake and energy expenditure that is determinant for the excessive energy storage in the form of fat and so redundant accumulation of adipose tissue. When the energy balance is positive, the adipose tissue prevalently undergoes an increment of white adipocytes, that become at first hypertrophic and then, due to a close relationship between one adipocyte and its neighbor, hyperplastic. Adipose tissue is a major endocrine organ, releasing signaling and mediator proteins, defined adipokines, via which adipose tissue is strictly linked with other organs. An excessive accumulation of fat tissue during obesity alters adipokines secretion: this imbalance in adipose tissue homeostasis lead to the development of both cardiovascular and renal dysfunctions linking obesity with hypertension, atherosclerosis and nephropathy.

Numerous studies have investigated the prevention and treatment of obesity and its associated dysfunctions using naturally-occurring antioxidants. We focused our attention on the inducible isoform of heme oxygenase (HO-1). HO-1 catalyzes the breakdown of heme, a potentially harmful pro-oxidant, into its products biliverdin and carbon monoxide, with a concomitant release of iron. HO-1 acts as a protective system against oxidative stress and inflammation. Moreover, it is considered to have a role in the regulation of vascular tone and it may provide renal cytoprotection.

The epoxyeicosatrienoic acid (EET), derived from the metabolism of arachidonic acid by cytochrome P450 epoxygenase enzyme, induces HO-1 expression and activity and so it plays various biological activities. It is also considered a cytoprotective mediator because its function in activating AMPK, LKB1 and Akt, kinases that play a pivotal role in the regulation of energy

metabolism. Moreover, EET could upregulate endothelial nitric oxide synthase (eNOS) and so increase the release of nitric oxide (NO), modulating vascular tone and homeostasis.

In this study we at first analyzed the consequences of high fat diet on adipose tissue, aorta and kidney and then we hypothesized that the induction of HO-1, through EET administration would ameliorate fat accumulation and the resulting dysfunctions in a mice model of obesity.

C57BL/6 mice were divided into four groups: lean, lean fed with a high fat diet (HF), lean fed with a high fat diet and treated with EET (HF EET), lean fed with a high fat diet and treated with EET and MSPPOH, an inhibitor of EET (HF EET MSPPOH). Food intake, body weight, blood levels of glucose, adiponectin and pro-inflammatory cytokines, along with HO-1, AMPK α ₁/pAMPK α ₁, LKB1/pLKB1, Akt/pAkt and eNOS expression were analyzed.

We demonstrated that adipose tissue plays a focal role in the pathogenesis of obesity: we observed in fact white hypertrophic and hyperplastic adipocytes and an imbalance of adipokine secretion in the HF group. The HF mice showed low level of HO-1 and adiponectin and high systemic levels of the pro-inflammatory TNF- α and IL-6.

The intraperitoneally EET administration prevented weight gain, decreased subcutaneous fat content, increased adiponectin and decreased TNF- α and IL-6. The HO-1 expression in adipose tissue, aorta and kidney consequently increased pAMPK α ₁, pLKB1, pAkt, and eNOS. The co-treatment with EET and MSPPOH countered the beneficial effects of EET, underling its capability of inhibitor of EET synthesis.

In conclusion, this study provides strong evidence confirming the fundamental endocrinal function of the adipose tissue and its pivotal role in the pathogenesis of obesity. Moreover, HO-1 has important anti-obesity effects, manifested by a decrease of fat content, an increased number of low size adipocytes and with reciprocal increases in adiponectin, pAMPK α ₁, pLKB1, pAkt and eNOS, all effects that ameliorate both energy metabolism and vascular tone and so the deleterious effect of a high dietary fat intake.

1. INTRODUZIONE

1.1 *Obesità*

L'obesità è una patologia multifattoriale tipica della società del “benessere”, il cui termine deriva dal latino *obesus* che significa “corpulento, grasso”.

L'Organizzazione Mondiale della Sanità (WHO) ha classificato l'obesità come un'epidemia mondiale che, in quanto colpisce più di 400 milioni di persone nel mondo, necessita di un intervento urgente (Achike e coll, 2011; Lois e Kumar, 2009; Tan e coll, 2011; Villeila e coll., 2009).

L'obesità coinvolge ad oggi il 50% degli adulti e più del 15% di bambini ed adolescenti nel mondo occidentale (Agil e coll., 2011).

Rispetto ai nostri antenati, negli ultimi decenni, non solo la disponibilità di cibo è aumentata notevolmente, ma il cibo è anche molto più ricco di grassi e l'attività fisica è stata drammaticamente ridotta. Tali cambiamenti dello stile di vita sono avvenuti velocemente, impedendo l'adattamento del genoma umano, così il maggior apporto energetico viene immagazzinato dall'organismo sottoforma di deposito adiposo con il conseguente ed inevitabile risultato dell'instaurarsi del processo patogenetico dell'obesità (Agil e coll., 2011; Tan e coll., 2011). In condizioni fisiologiche, il corpo umano è caratterizzato da depositi adiposi compresi tra 8-18% nell'uomo e 14-28% nelle donne del peso corporeo totale. Nei soggetti obesi, invece tali depositi raggiungono il 60-70% del peso corporeo (Tan e coll., 2011). L'obesità infatti è caratterizzata da un eccessivo accumulo di tessuto adiposo bianco (Daquinag e coll., 2011), indicando quindi l'importante coinvolgimento del tessuto adiposo nell'evolversi della patologia.

Come già ricordato sopra, l'obesità è una patologia multifattoriale legata a fattori genetici (30%), a fattori comportamentali ed ambientali (60%) e a fattori culturali (10%) (Lois e Kumar, 2009).

L'obesità viene regolata dal “desiderio” di sazietà a livello encefalico e dei centri dell'ipotalamo attraverso processi complessi e meccanismi modulati poi da ormoni periferici e centrali (Achike e coll., 2011; Halberg e coll., 2008;). Gli adipociti, comunicando con questi centri ipotalamici,

secernono la leptina, un ormone proteico (Zhang e coll., 2010) che agisce come un fattore antiobesità: infatti i topi privi di leptina (definiti *ob/ob*) sviluppano la patologia dell'obesità dalla quarta settimana di vita.

Negli ultimi dieci anni, è stato confermato che la patologia dell'obesità è caratterizzata da uno stato di infiammazione cronica (Achike e coll., 2011; Monteiro e Azevedo, 2010), in quanto l'accumulo di tessuto adiposo intraddominale determina uno stato pro-infiammatorio. Gli adipociti sono inoltre la fonte di numerosi peptidi bioattivi, come fattore di necrosi tumorale- α (TNF- α), resistina, leptina, adiponectina, angiotensina, prostaglandine ed interleuchine (ILs), che svolgono una funzione fondamentale nel processo di insulino-resistenza, infiammazione e stress ossidativo (Li e coll., 2008; Lois e Kumar, 2009; Peterson e coll., 2009). Inoltre, l'obesità è associata ad un aumento dell'infiltrato macrofagico a livello del tessuto adiposo che, a sua volta, induce un aumento della secrezione di agenti infiammatori bioattivi che contribuiscono a loro volta al processo di infiammazione sistemica (Lois e Kumar, 2009). Ad oggi, è comunque necessario un ulteriore approfondimento delle conoscenze riguardanti il complesso network dei meccanismi patofisiologici implicati nella stretta correlazione tra stress ossidativo, infiammazione ed obesità.

Tra i numerosi metodi di misurazione del livello/gravità di obesità, il più popolare e soprattutto di facile applicazione, è il calcolo dell'indice di massa corporea (BMI), sviluppato da Adolphe Quetelet (Achike e coll., 2011; Eknoyan e Quetelet, 2008). Tale indice si calcola dividendo il peso, espresso in kilogrammi, per l'altezza al quadrato, espressa in metri. Individui con valori di BMI minori di 18,5 kg/m² sono considerati sottopeso; individui con valori compresi tra 18,5-24,9 kg/m² sono normopeso; individui con valori tra 25-29,9 kg/m² sono considerati sovrappeso e infine individui con valori superiori a 30 kg/m² sono definiti obesi (Achike e coll., 2011; Tobler e coll., 2010). La patologia dell'obesità viene suddivisa in 3 categorie in base al BMI: classe I: BMI 30-34,9 kg/m²; classe II: BMI di 35-39,9 kg/m²; classe III: BMI \geq 40 kg/m² (Achike e coll., 2011;

WHO Consultation,). L'utilizzo del BMI non risulta però essere una valutazione accurata della patologia, in quanto può sovrastimare l'obesità nei soggetti muscolosi (Achike e coll., 2011; Lee, 1999); nella pratica clinica viene quindi utilizzato insieme ad altri indicatori clinici, tra cui la misura della circonferenza della vita.

L'obesità è spesso associata all'insorgenza di numerose altre patologie, quali diabete mellito, ipertensione, infarto, aterosclerosi, ictus, apnea notturna, alcune forme di cancro (Achike e coll., 2011; Lean, 2000), pancreatite, nefropatia ed osteoartriti e può inoltre determinare infertilità e difetti alla nascita (Achike e coll., 2011; Agil e coll., 2011; Burgess e coll., 2010; Peterson e coll., 2009; Tan e coll., 2011; Villela e coll., 2009).

1.1.1 *Obesità e tessuto adiposo*

Come già sottolineato precedentemente, l'obesità è caratterizzata da un eccessivo accumulo di tessuto adiposo bianco (Daquinag e coll., 2011). Nei mammiferi sono però identificabili due differenti tipi di adipociti, bianchi e bruni, che compongono rispettivamente il tessuto adiposo bianco ed il tessuto adiposo bruno (Cinti, 2005; Yao e coll., 2011). Il volume totale dell'organo adiposo dipende strettamente dall'equilibrio tra questi due tipi di tessuto (Tan e coll., 2011). I depositi adiposi corporei sono costituiti da entrambi i tipi tissutali, la cui estensione dipende da numerosi fattori, quali specie animale, età, temperatura, condizioni ambientali, ecc. Gli adipociti bianchi e bruni hanno differente localizzazione, morfologia e funzione, anche se non è possibile effettuare una netta distinzione anatomica in quanto il tessuto adiposo è costituito da un mix di adipociti bruni e bianchi.

Da un punto di vista morfologico, il tessuto adiposo bianco è caratterizzato dalla presenza di adipociti sferici, il cui citoplasma è costituito prevalentemente da gocce lipidiche, definite "lipid droplet", ed è visibile solo un fine orletto citoplasmatico; tali cellule vengono definite, a causa del loro aspetto morfologico, cellule uniloculari (Cinti, 2005).

Il tessuto adiposo bruno è anch'esso costituito da adipociti, che però hanno morfologia significativamente differente e, di conseguenza, anche proprietà fisiologiche diverse. Anche gli adipociti bruni accumulano i lipidi all'interno del citoplasma formando però numerosi piccoli vacuoli: vengono così definiti cellule multiloculari. Inoltre gli adipociti bruni sono caratterizzati da una forma poligonale od ellissoidale e sono collegati tra loro da gap junctions (Cinti, 2005).

Da un punto di vista funzionale, il tessuto bianco costituisce un deposito di acidi grassi, quindi molecole altamente energetiche, che possono funzionare da "scorta" per l'organismo; il tessuto adiposo bruno, al contrario, utilizza le stesse molecole energetiche per produrre calore (Cinti, 2005; Daquinag e coll., 2011). L'energia intrinseca dei lipidi viene quindi accumulata dal tessuto bianco e dissipata dal tessuto bruno. Quando l'equilibrio energetico è positivo, il tessuto adiposo aumenta la sua componente di tessuto bianco e gli adipociti vanno incontro a ipertrofia e successivamente iperplasia. Infatti, gli adipociti, dopo aver raggiunto il loro volume massimo, definito critico, vanno incontro ad un aumento di numero, cioè iperplasia (Achike e coll., 2011; Cinti, 2005; Daquinag e coll., 2011; DiGirolamo e coll., 1998; Spalding e coll., 2008).

È ampiamente noto che il tessuto bruno può transdifferenziare in bianco in modelli animali di obesità, e il tessuto bianco può transdifferenziare in bruno durante esposizione a basse temperature o in seguito a restrizione calorica, con conseguente miglioramento della patologia dell'obesità (Cinti, 2005; Collins e coll., 1997; Ghorbani e coll., 1997). In modelli sperimentali di obesità si è osservato un aumento dell'apoptosi degli adipociti bruni, attenuata però in modelli animali privi del recettore per TNF- α (Cinti, 2005; Nisoli e coll., 2000; Tan e coll., 2011).

Il tessuto adiposo non è però solo un semplice deposito di lipidi, ma è attualmente considerato una ghiandola endocrina secernente numerosi tipi di molecole bioattive, chiamate collettivamente *adipochine* o *adipocitochine* (Tilg e Moschen, 2006; Zhu e coll., 2008) e fattori pro-infiammatori (Li e coll., 2008; Nicolai e coll., 2009; Peterson e coll., 2008; Zhu e coll., 2008; Weisberg e coll., 2006), tra cui TNF- α e IL-6, in grado di svolgere un ruolo fondamentale nella

regolazione del metabolismo e dell'omeostasi energetica dell'intero organismo (Ahima e Flier, 2000; Lois e Kumar, 2009). Tali molecole vengono secrete sia dagli adipociti bianchi che bruni (Cinti, 2005; Kershaw e Flier, 2004; Trayhurn e Wood, 2004).

Negli ultimi anni, l'*adiponectina* (p.m. 30 kDa), una delle principali citochine secrete dal tessuto adiposo, ha attirato l'attenzione di numerosi Autori grazie ai suoi effetti pleiotropici sulle complicanze cardiometaboliche legate all'obesità ed alla sua azione anche a livello vascolare (Zhu e coll., 2008). Il deficit genetico di adiponectina (ipoadiponectinemia) contribuisce significativamente alla patogenesi dell'obesità e delle patologie ad essa correlate (Menzaghi e coll., 2007; Zhu e coll., 2008). Esso è associato infatti ad un incremento della diffusione e/o del peggioramento della prognosi di obesità, indipendentemente dagli altri fattori di rischio (Zhu e coll., 2008). L'adiponectina è in grado di aumentare la sensibilità all'insulina, incrementando l'ossidazione degli acidi grassi, l'uptake del glucosio ed influenzando positivamente i livelli dei trigliceridi serici (Peterson e coll., 2008). E' inoltre in grado di attenuare l'infiammazione, riducendo l'espressione di TNF- α e di IL-6 e di svolgere un ruolo protettivo a livello vascolare, proteggendo le funzioni delle cellule endoteliali (Peterson e coll., 2008). L'adiponectina ha inoltre effetti anti-aterogenici, inibendo l'adesione dei monociti alle cellule endoteliali, inducendo una ridotta espressione della molecola di adesione cellulare vascolare (VCAM₁) e di conseguenza, la formazione delle foam cells e modula negativamente l'aggregazione piastrinica ed il reclutamento dei linfociti (Di Noia e coll., 2006; Li e coll., 2007; Peterson e coll., 2008). L'adiponectina può essere quindi considerata un regolatore fisiologico dell'omeostasi vascolare sia in modelli animali che nell'uomo (Zhu e coll., 2008).

Nonostante sia prodotta perlopiù dagli adipociti, i soggetti obesi mostrano scarsi livelli di adiponectina circolante (Bomback e coll., 2008; Hunley e coll., 2010); tale riduzione dei livelli di adiponectina si è osservata in patologie correlate all'obesità, quali insulino-resistenza, patologie coronariche, infarto, steatopatie ed alcuni tipi di cancro (seno, prostata e colon) (Wang e coll.,

2007; Zhu e coll., 2008). L'aumento dell'adiponectina circolante mostra invece effetti benefici nel prevenire le complicanze correlate all'obesità (Shibata e coll., 2005; Wang e coll., 2000; Zhu e coll., 2006).

Da quanto riportato risulta quindi evidente che oltre al tessuto adiposo altri apparati, come l'apparato cardiovascolare ed urinario, possono esser coinvolti nella patogenesi dell'obesità. Di conseguenza, in questo studio abbiamo preso in considerazione e valutato anche gli apparati sopra citati.

1.1.2 Obesità ed apparato cardiovascolare

L'obesità è strettamente correlata all'insorgenza di patologie cardiovascolari (Meyer e Gokce, 2007; Tobler e coll., 2010; Zhu e coll., 2008). Essa induce infatti aumento del lavoro cardiaco e dello spessore della parete arteriosa, dislipidemia e riduzione del lume vascolare, tutti fattori che contribuiscono ad aumentare sia la resistenza periferica sia la pressione sanguigna determinando così ipertensione. Inoltre, l'obesità promuove lo sviluppo di processi di aterosclerosi, quali ossidazione delle lipoproteine a bassa densità (LDL), stress ossidativo e perossidazione lipidica; le LDL ossidate agiscono come stimoli immunogeni e pro-infiammatori, aumentando il reclutamento delle cellule infiammatorie e determinano danno endoteliale (Achike e coll., 2011). Elevati livelli di lipidi e glucosio possono esser associati alla riduzione della biodisponibilità di ossido nitrico (NO) vascolare (Steinberg and Baron, 2002; Villela e coll., 2009). Le cellule endoteliali svolgono un ruolo fondamentale nella regolazione del tono vascolare attraverso il rilascio di numerosi fattori vasoattivi, di cui il più importante è NO (Schini-Kerth e coll., 2010). NO, prodotto dall'isoforma endoteliale di ossido nitrico sintasi (eNOS) in seguito alla sua attivazione dovuta a stimoli fisiologici, gioca un ruolo cruciale nel regolare un ampio spettro di funzioni vascolari, incluso vasorilassamento, omeostasi vascolare, inibizione dell'adesione dei

leucociti attraverso riduzione dell'espressione di molecole d'adesione, migrazione e proliferazione delle cellule muscolari lisce vascolari, aggregazione piastrinica, inibizione dell'ossidazione lipidica ed apoptosi (Huang, 2003; Jiang e coll., 2007; Li e Forstermann, 2009; Pae e coll., 2010; Zhu e coll., 2008;). Di conseguenza, una diminuzione della biodisponibilità di NO è strettamente associata a numerosi disordini vascolari (Napoli e Ignarro, 2009; Pae e coll., 2010).

La regolazione dell'espressione di eNOS è complessa ed avviene a più livelli: numerosi stimoli e condizioni rilevanti per la fisiopatologia dell'endotelio vascolare sono stati riscontrati associati ad un'alterata espressione di eNOS (Pae e coll., 2010; Sprague e coll., 2010).

Durante la patogenesi dell'obesità, la regolazione della trascrizione di geni coinvolti nella sintesi degli acidi grassi e del colesterolo avviene anche attraverso l'attivazione di alcune chinasi, nello specifico protein chinasi attivata da AMP (AMPK) ed Akt (Peterson et al., 2009). In particolare, la diminuzione dell'espressione di pAMPK e pAkt, forme fosforilate ed attivate rispettivamente di Akt, emeossigenasi-1 (HO-1) ed eNOS sono strettamente correlate al danno endoteliale ed alle alterazioni vascolari riscontrate nei pazienti obesi (Peterson e coll., 2009). Una riduzione della biodisponibilità di NO può determinare una riduzione dell'attivazione di AMPK, con conseguente attivazione delle cellule muscolari lisce e del processo pro-infiammatorio (Rizzo e coll., 2011) e può diminuire la modulazione della funzionalità cardiaca (Smith e Yellow, 2011).

NO induce espressione di HO-1 e CO a livello delle cellule muscolari lisce vascolari; ci sono però studi che rivelano che l'overespressione di HO-1 a livello delle cellule muscolari lisce può inibire la risposta vasodilatatoria mediata da NO, inducendo così un effetto paradossale di aumento della pressione sanguigna (Ohta e Yachie, 2004).

Le patologie cardiovascolari associate all'obesità sono correlate a disfunzioni endoteliali, che tuttavia possono esser presenti nei soggetti obesi anche in assenza delle complicanze cardiovascolari stesse (Brook e coll., 2001; Peterson e coll., 2009; Van Guilder e coll., 2006;

Villela e coll., 2009; Tziomalous e coll., 2010). Inoltre, si osserva una diretta proporzionalità tra grado di accumulo di tessuto adiposo e disfunzione endoteliale (Arcaro e coll., 1999; Li e coll., 2008; Peterson e coll., 2009; Tziomalos e coll., 2010; Villela e coll., 2009; Williams e coll., 2006), mentre la perdita di peso migliora la funzionalità endoteliale (Ziccardi e coll., 2002; Villela e coll., 2009). Le alterazioni endoteliali indotte dall'obesità danneggiano la produzione fisiologica di fattori vasodilatanti, inibiscono il normale processo di regolazione del tono vascolare e di migrazione e crescita delle cellule muscolari lisce vascolari e stimolano i processi di infiammazione e di aggregazione piastrinica. L'alterato equilibrio tra fattori vasodilatanti e vasocostringenti e l'inibizione del meccanismo anti-coagulante facilitano l'insorgenza di infarto ed ischemia cardiaca, patologie correlate all'obesità stessa (Barton, 2010).

Numerosi meccanismi fisiopatologici sono coinvolti nell'interazione tra obesità, alterazioni cardiovascolari ed ipertensione, inclusi attivazione del sistema nervoso simpatico, del sistema renina-angiotensina-aldosterone, sviluppo di insulino-resistenza, aumento dei livelli di leptina, infiammazione sistemica, disfunzioni endoteliali e stress ossidativo (Grassi e Diez, 2009; Rizzoni e coll., 2012).

Nei soggetti obesi, i livelli di trigliceridi contenuti nei cardiomiociti sono stati riscontrati essere da 2 a 4 volte più alti che nei soggetti sani (Iozzo, 2011). L'adiposità del tessuto miocardico inoltre è associata ad un aumento della massa e del lavoro del ventricolo sinistro e ad un'alterata funzione diastolica (Iozzo, 2011; Iozzo e coll., 2009).

Anche per quanto riguarda il grasso pericardico è stato riscontrato un progressivo aumento di quest'ultimo durante lo sviluppo di obesità. Questo fenomeno risulta di particolare importanza considerando che l'aumento della quantità di tessuto adiposo attorno al cuore aumenta notevolmente il carico del cuore, ostacolandone l'espansione. Sono state riscontrate inoltre una correlazione positiva ed una correlazione negativa tra la quantità di tessuto adiposo che circonda

il cuore e, rispettivamente, parametri clinici di rischio cardiovascolare, come ad esempio elevati livelli di LDL e di pressione arteriosa (Iozzo, 2011).

Anche l'adiponectina, come già ricordato in precedenza, è in grado di esercitare una grande quantità di funzioni diverse a livello del sistema cardiovascolare. Innanzitutto, è importante sottolineare che l'adiponectina, oltre ad essere prodotta dagli adipociti, è anche sintetizzata e secreta dai cardiomiociti e, inoltre, che questi ultimi esprimono i recettori per l'adiponectina stessa: questo suggerisce che l'adiponectina potrebbe avere un ruolo come agente cardioprotettivo intrinseco. A tale proposito, alcuni Autori hanno dimostrato che l'insufficienza cardiaca si manifesta con forme più gravi in topi privi di l'adiponectina (Smith e Yellow, 2011), e che terapie sostitutive per l'adiponectina in questi animali sono in grado di migliorare notevolmente il danno cardiaco (Smith e Yellow, 2011; Takahashi e coll., 2005).

Nonostante i numerosi studi condotti, attualmente, non si hanno conclusioni definitive riguardo la correlazione tra sviluppo e/o regressione delle alterazioni strutturali cardiovascolari ed obesità.

1.1.3 Obesità ed apparato urinario

Numerosi studi hanno dimostrato che l'obesità è dannosa anche a livello renale (Axelsson, 2008), l'aumento del BMI è drammaticamente correlato a patologie renali croniche (Hunley e coll., 2010). In particolare, essa è correlata all'insorgenza di patologie renali sia in modo diretto sia in maniera indiretta, in quanto i depositi adiposi tipici dell'obesità contribuiscono allo sviluppo del danno renale, attraverso l'induzione di ipertensione, iperlipidemia e malattie cardiovascolari tutti fattori di rischio per patologie che interessano l'apparato urinario (Hunley e coll., 2010; Rheaume e coll., 2009;). In particolare, i depositi adiposi sono in grado di aumentare i livelli di attività del sistema renina-angiotensina-aldosterone, il quale induce vasocostrizione delle arteriole efferenti, aumento della pressione glomerulare e della proliferazione cellulare e

culmina così disfunzioni renali. Recentemente però, alcuni studi hanno dimostrato che l'obesità è anche in grado di promuovere in maniera diretta lo sviluppo di patologie renali (Goncalves Torres e coll., 2009; Hunley e coll., 2010; Nomura e coll., 2009).

L'obesità è strettamente associata all'insorgenza di iperfiltrazione glomerulare, aumento dell'escrezione delle proteine urinarie, fibrosi tubulointerstiziale, atrofia tubulare, glomerulomegalia, aumento della matrice mesangiale e proliferazione delle cellule mesangiali (Hunley e coll., 2010; Serra e coll., 2008), sclerosi glomerulare (Hunley e coll., 2010) e stress ossidativo ed è stata dimostrata in grado di alterare l'emodinamica renale, determinando danno ed insufficienza renale (Chagnac e coll., 2008; Friedman e coll., 2010; Hunley e coll., 2010; Percy e coll., 2005; Percy e coll., 2009). Inoltre, è noto che l'obesità induce ipertensione attraverso un iniziale aumento del riassorbimento di sali a livello renale, sia nei tubuli prossimali, che nell'ansa di Henle (Maric e Hall, 2011). A livello renale, uno degli effetti precoci dell'obesità nell'uomo è l'aumento del tasso di filtrazione glomerulare (GFR), considerato un meccanismo compensatorio per consentire il mantenimento del corretto equilibrio di sali, nonostante il continuo aumento del riassorbimento tubulare. Se però l'aumento del GFR si protrae per lunghi periodi di tempo, può contribuire all'insorgenza di danno renale, rivelandosi un'arma a doppio taglio.

Di conseguenza, i glomeruli sono le strutture che più di tutte presentano alterazioni precoci a livello morfologico associate allo stato di iperfiltrazione glomerulare indotta dall'obesità (Griffin e coll., 2008; Maric e Hall, 2011). I reni di pazienti obesi sono spesso caratterizzati dalla presenza di depositi lipidici a livello mesangiale o glomerulare: questo fatto supporta l'ipotesi di un danno renale indotto dai lipidi, che secondo alcuni Autori avrebbero un'intrinseca tossicità (lipotossicità) (Maric e Hall, 2011). Uno dei meccanismi attraverso cui l'iperlipidemia promuove il danno glomerulare è grazie all'aumento dell'espressione renale delle proteine che legano gli

elementi regolatori dello sterolo, le quali, a loro volta promuovono l'apoptosi dei podociti, la proliferazione mesangiale e la sintesi di citochine (Maric e Hall, 2011).

Anche se solo recentemente la ricerca scientifica si sta occupando di trovare un collegamento tra produzione di adipochine e danno renale, da tempo è noto che l'aumento dei depositi adiposi e l'alterata produzione di adipochine da parte delle cellule adipose, caratteristiche tipiche dei pazienti obesi, possono tradursi in fenomeni infiammatori a livello renale (Zoccali, 2009).

L'obesità è infatti caratterizzata da un basso, ma costante grado di infiammazione, associato ad infiltrazione macrofagica, oltre che nel tessuto adiposo, anche a livello renale. I macrofagi infiltranti rappresentano una fonte di citochine pro-infiammatorie, tra cui TNF- α ed IL-6 (Zoccali, 2009). L'aumento dell'adiposità tipico dei soggetti obesi, inoltre, provoca il rilascio di adipochine infiammatorie in circolo, che a loro volta, possono indurre danno renale attraverso la produzione di specie reattive dell'ossigeno e quindi l'insorgenza di stress ossidativo (Maric e Hall, 2011).

Studi ulteriori sul meccanismo alla base della correlazione tra obesità e patologie renali saranno necessari, in quanto potrebbero chiarire al meglio i meccanismi patogenetici alla base di tale correlazione e quindi permetterebbe di ottenere nuove strategie di trattamento o prevenzione di entrambe le patologie.

Le alterazioni conseguenti all'eccessivo accumulo di tessuto adiposo bianco durante la patogenesi dell'obesità e le conseguenti disfunzioni a livello dell'apparato cardiovascolare ed urinario sono riassunte in **Fig. 1**.

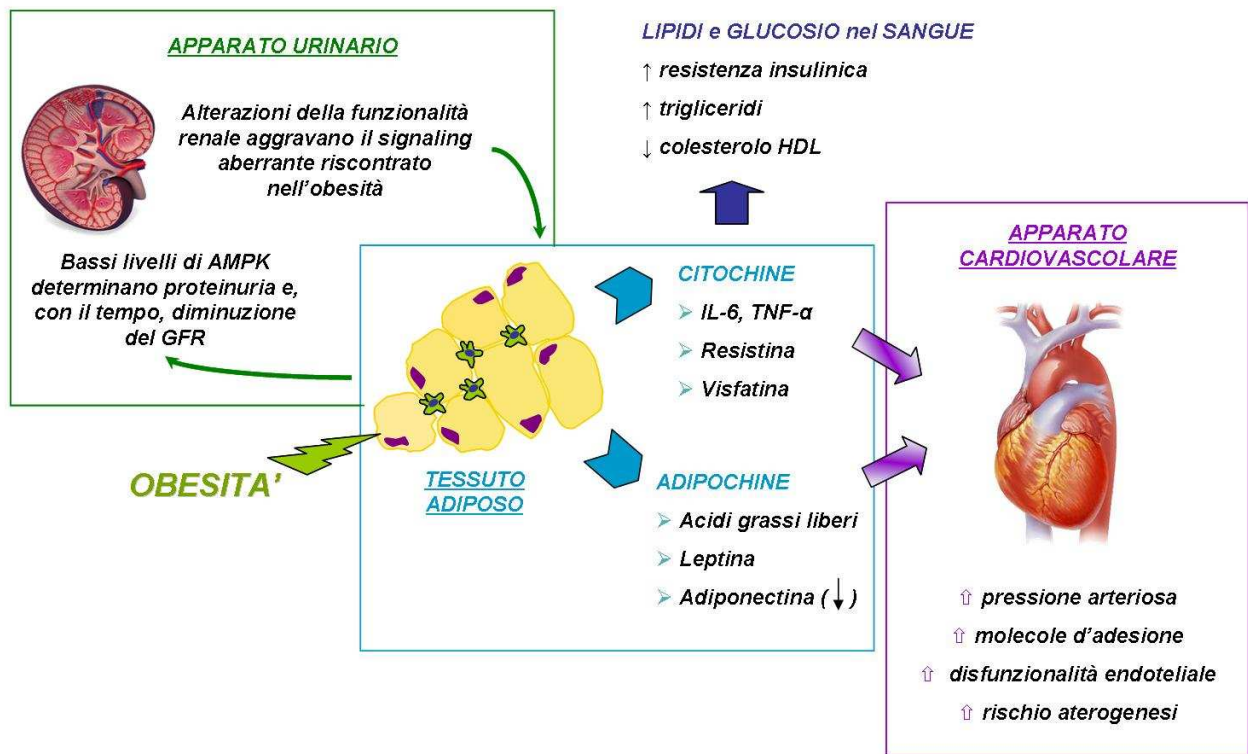


Fig.1: Schema delle alterazioni conseguenti all'eccessivo accumulo di tessuto adiposo e delle conseguenti disfunzioni a carico dell'apparato cardiovascolare ed urinario.

1.2 Emeossigenasi

L'eme, anello tetrapirrolico con uno ione centrale di ferro, costituisce il gruppo prostetico di numerose proteine responsabili del trasporto dell'ossigeno, della respirazione mitocondriale, del metabolismo del ferro, della biosintesi degli steroidi e delle difese anti-ossidanti (Maines, 2005; Paine e coll., 2010). Nonostante la sua presenza sia essenziale per lo svolgimento di diversi processi biologici, si può intercalare nelle membrane cellulari alterandone l'organizzazione (Beri e Chandra, 1993; Ryter e Tyrrell, 2000) e può inoltre avere effetti pro-ossidanti anche su macromolecole come carboidrati e DNA (Aft e Mueller, 1983; Burgess e coll., 2011); tali effetti sono dovuti al suo elevato grado di lipofilicità.

Per far fronte alla tossicità dell'eme, le cellule sono quindi dotate di enzimi in grado di ristabilire l'equilibrio del contenuto di eme libera e quindi limitare/evitare i danni conseguenti al suo effetto ossidante (Paine e coll., 2010): tra questi, uno dei più importanti è sicuramente l'enzima

microsomiale *emeossigenasi*. HO, largamente distribuito nei tessuti dei mammiferi, è in grado di catalizzare l'apertura regione-specifica dell'anello dell'eme degradandolo e formando di conseguenza biliverdina, monossido di carbonio (CO) e ferro (Abraham e Kappas, 2008; Burgess e coll., 2010; Nicolai e coll., 2009; Paine e coll., 2010; Tenhunen e coll., 1968) (**Fig.2**). La biliverdina viene successivamente metabolizzata in bilirubina ed il ferro libero viene rapidamente sequestrato dalla ferritina (Pae e coll., 2008; Pae e coll., 2010). Sono state identificate tre distinte isoforme dell'enzima *emeossigenasi*, prodotte da geni diversi, con proprietà differenti e la cui espressione differisce molto nei diversi tipi cellulari e tissutali: HO-1, HO-2 e HO-3 (McCoubrey e coll., 1997; Maines, 2005; Ohta e Yachie, 2004; Siow e coll., 1999). Tutte tre le isoforme di HO sono altamente conservate ed espresse in tutte le forme di vita (Terry e coll., 2002). Tale osservazione fa, quindi, supporre che HO rivesta un ruolo essenziale in svariati processi cellulari.

HO gioca un ruolo biologico fondamentale nella degradazione dell'eme proteggendo così le cellule dagli effetti dannosi dell'eme libero (Siow e coll., 1999). Tale effetto di difesa cellulare da parte di HO si può riscontrare anche contro lo stress ossidativo che insorge durante la patologia dell'obesità e del diabete (Burgess e coll., 2011).

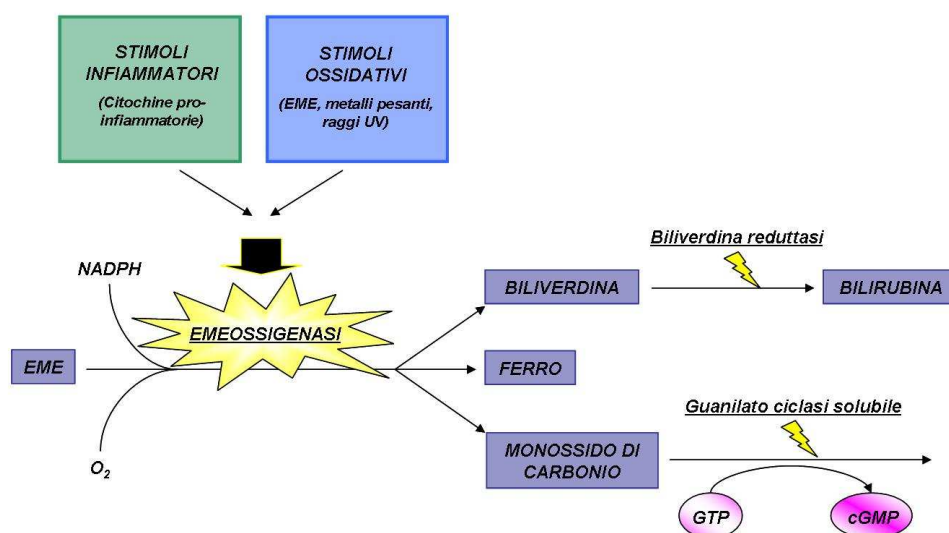


Fig.2: Schema della reazione catalizzata dall'enzima *emeossigenasi*.

1.2.1 *Hemoossigenasi-1*

HO-1 è stata identificata nel 1989 come una proteina citoprotettiva secreta durante danno cellulare (Keyse e Tyrrell, 1989; Nath, 2006). Il suo peso molecolare è 32 kDa ed infatti inizialmente l'enzima venne identificato come proteina da stress termico 32 (Heat Shock Protein, HSP₃₂). *HO-1* rappresenta l'isoforma inducibile di HO espressa in risposta a stress ossidativo; ha effetti anti-ossidanti ed anti-apoptotici e può portare alla normalizzazione delle funzioni vascolari e renali (Abraham e Kappas, 2008; Burgess e coll., 2010; Vera e coll., 2008). Secondo alcuni studi sembra infatti che *HO-1* possa regolare la pressione sanguinea ed abbia funzione citoprotettiva renale nei confronti del danno da stress ossidativo (Abraham e Kappas, 2008; Sodhi e coll., 2009). Anche CO e bilirubina, prodotti della degradazione dell'eme, hanno la capacità di modulare la funzione renale ed attenuare l'azione di vasocostrizione (Sodhi e coll., 2009).

HO-1, in condizioni fisiologiche, è espressa a bassi livelli nella maggior parte dei tipi cellulari e tissutali, mentre viene upregolata in seguito a numerosi stimoli, quali stress ossidativo, elevati livelli di eme, ipossia, ipertermia, presenza di metalli, LDL ossidate, citochine pro-infiammatorie (Ohta e Yachie, 2004; Paine e coll., 2010), radiazioni ultraviolette, agenti chimici, somministrazione di molecole di diverso tipo, tra cui l'eme stessa (Choi e Alam, 1996; Li Volti e coll., 2003; Wagener e coll., 2003). Inoltre, anche i noti fattori di rischio cardiovascolare, come fumo, ipertensione, diabete, ipercolesterolemia ed infiammazione cronica possono alterare l'espressione vascolare di *HO-1* (Pae e coll., 2010).

Un aumento dell'attività enzimatica di *HO-1* è attualmente considerato un meccanismo protettivo di risposta cellulare contro lo stress ossidativo.

HO-1 ha effetti protettivi anti-ossidanti, non solo in quanto rimuove l'eme, molecola pro-ossidante, ma anche perché lo "rimpiazza" con bilirubina, potente anti-ossidante, e CO, molecola citoprotettiva (Nath, 2006).

Numerosi dati ottenuti in differenti modelli sperimentali associano a questo enzima anche un ruolo centrale nella risposta anti-infiammatoria (Laniado Schwartzman e coll., 1997, Paine e coll., 2010; Song e coll., 2003; Yet e coll., 2001). In particolare, è stato osservato che la delezione del gene per HO-1 determina l'insorgenza di uno stato infiammatorio cronico, associato ad un aumento dell'infiltrato linfocitario (Kapturczak e coll., 2009; Poss e Tonegawa, 1997), mentre, al contrario, un'upregolazione del medesimo enzima induce una soppressione di tale risposta (Morse e coll., 2003; Otterbein e coll., 2000), probabilmente attraverso l'inibizione dell'espressione di molecole d'adesione che permetterebbero la diapedesi leucocitaria ed il reclutamento dei linfociti (Paine e coll., 2010; Soares e coll., 2004; Wagener e coll., 1999, 2003). Tale ruolo anti-infiammatorio (Siow e coll., 1999) ha fondamentali implicazioni cliniche per il trattamento di numerose patologie infiammatorie.

L'induzione di HO-1 inoltre porta a perdita di peso corporeo, diminuzione dell'infiammazione e dei livelli di TNF- α ed ILs, aumenta i livelli di adiponectina e la sensibilità all'insulina nei topi e nei ratti obesi (Burgess e coll., 2010; Nicolai e coll., 2009; Peterson e coll., 2009); HO-1 può inoltre prevenire disfunzioni vascolari e morte delle cellule endoteliali attraverso diminuzione dello stress ossidativo (Abraham e coll., 2004). Sia HO-1 di *per se* sia i prodotti della degradazione dell'eme posseggono le proprietà anti-ossidanti ed anti-infiammatorie richieste per il mantenimento di corretti livelli di NO vascolare (Pae e coll., 2010). Una possibile correlazione tra eNOS e HO-1 è attualmente indagata. Studi recenti a tal proposito dimostrano che HO-1 può migliorare le funzioni vascolari aumentando la biodisponibilità di NO (Pae e coll., 2010).

HO-1 è quindi in grado di mediare pathways che possono interrompere i principali meccanismi di danno tissutale, quali vasocostrizione, danno vascolare, ischemia, infiammazione, stress ossidativo, alterazione del ciclo cellulare, danno cellulare subletale e/o letale (Abraham e Kappas, 2005; Kirby e Adin, 2006; Nath, 2006).

1.2.2 *Emeossigenasi-2*

HO-2, isoforma costitutiva (Burgess e coll., 2010), differisce da HO-1 nella struttura primaria (presentano un'omologia di sequenza solo del 40%), nel peso molecolare (36kDa) e nella stabilità termica (Maines e Panabian, 2001; Siow e coll., 1999).

Entrambi gli enzimi possiedono però una sequenza idrofobica a livello C-terminale che permette l'ancoraggio alla membrana microsomiale. HO-2 viene espressa prevalentemente a livello encefalico, renale e dei testicoli (Paine e coll., 2010). HO-1 e HO-2 hanno entrambi proprietà anti-ossidanti ed anti-infiammatorie, associate all'induzione dell'aumento della secrezione di adiponectina e della biodisponibilità di NO (Abraham e Kappas, 2008; Sodhi e coll., 2009).

HO-2 contribuisce alla modulazione delle funzioni sia vascolari sia renali, regolando l'attività dei canali ionici renali ed il tono vascolare (Burgess e coll., 2011; Durante e Schafer, 1998; Sodhi e coll., 2009).

1.2.3 *Emeossigenasi-3*

HO-3, di recente scoperta, è espressa a livello di encefalo, fegato, milza, rene, cuore e testicoli. Tale isoforma mostra una struttura simile a HO-2. Questi due enzimi, infatti, possiedono un'identità di sequenza amminoacidica pari a circa il 90%. HO-3 mostra però scarsa capacità di degradazione dell'eme (McCoubrey e coll., 1997) e può dunque esser considerata uno pseudogene (Nath, 2006).

1.2.4 *Prodotti della reazione catalizzata dall'emeossigenasi*

Numerosi dati sperimentali suggeriscono che HO garantisca un importante meccanismo di difesa contro lo stress ossidativo, attraverso la diminuzione della concentrazione di eme (pro-ossidante), l'aumento di biliverdina (anti-ossidante) (Nath, 2006; Stocker, 1987) e la produzione

di CO, potente vasodilatante con proprietà citoprotettive, anti-infiammatorie ed anti-apoptotiche (Kushida e coll., 2002; Li e coll., 2008; Otterbein e coll., 2000; Pae e coll., 2010).

Sia CO che biliverdina non sono solo prodotti del metabolismo dell'eme, ma anche molecole chiave nella regolazione della crescita e morte delle cellule vascolari, della funzione piastrinica, del tono ed omeostasi vascolare e del processo d'infiammazione (Ohta e Yachie, 2004).

1.2.4.1 Biliverdina

La *biliverdina*, convertita in bilirubina attraverso l'azione dell'enzima biliverdina reduttasi (Paine e coll., 2010 Tenhunen e coll., 1968), grazie alle sue capacità anti-ossidanti ed anti-infiammatorie, sembra contribuire in modo significativo al globale effetto citoprotettivo di HO (Kapitulnik e Maines, 2009; Paine e coll., 2010). Sia la biliverdina che la bilirubina sono anti-ossidanti naturali che agiscono come potenti scavengers dei radicali liberi dell'ossigeno e la bilirubina è inoltre l'anti-ossidante maggiormente presente in gran parte dei tessuti (Burgess e coll., 2011).

Il pathway in cui la biliverdina viene prima convertita in bilirubina e poi nuovamente riconvertita in biliverdina, per essere riutilizzata, è un tentativo da parte delle cellule di amplificare l'effetto anti-ossidante di tali molecole (Pae e coll., 2010).

La biliverdina è implicata anche nella protezione delle cellule endoteliali ed è in grado di ridurre la tras migrazione dei leucociti a livello del sito d'infiammazione attraverso l'inibizione delle molecole d'adesione cellulare (Paine e coll., 2010).

1.2.4.2 Monossido di carbonio

Il *monossido di carbonio*, anche esso prodotto enzimatico dell'attività di HO, è un gas endogeno che svolge un importante ruolo nella modulazione della circolazione sanguigna (Durante e Schafer, 1998). Il rilascio di CO da parte delle cellule vascolari esercita effetti paracrini ed

autocrini sulle cellule muscolari lisce e sulle cellule circolanti del sangue. CO è in grado di regolare sia il flusso che la fluidità del sangue, inibendo la proliferazione delle cellule muscolari lisce vascolari e l'aggregazione piastrinica (Durante e Schafer, 1998; Ohta e Yachie, 2004).

CO può modulare la vasodilatazione, legando il sito attivo della guanilato ciclastasi ed aumentando la conversione della guanosina monofosfato in guanosina 3,5-monofosfato ciclica (cGMP) (Maines, 1997; Kapitulnik e Maines, 2009; Nath, 2006). Sia CO, derivante dalle cellule endoteliali, sia NO diffuso alle cellule muscolari lisce vascolari determinano un aumento dei livelli intracellulari di cGMP, determinando così vasodilatazione (Siow e coll., 1999). Il legame metabolico e funzionale tra CO e NO suggerisce che l'azione vasodilatante di CO può essere fondamentale nel processo di aterogenesi, dove la produzione di NO da parte delle cellule endoteliali risulta inibita. L'effetto di CO sul rilassamento delle cellule muscolari lisce è specifico per vaso sanguigno (Siow e coll., 1999).

Nonostante la capacità vasodilatante di CO sia nettamente inferiore a quella di NO (Maines, 1997; Siow e coll., 1999), in alcuni distretti vascolari, come ad esempio a livello della vascolarizzazione epatica, la vascolarizzazione è mediata da CO anziché da NO (Burgess e coll., 2011; Siow e coll., 1999).

Inoltre, CO è in grado di inibire l'aggregazione piastrinica e proteggere le cellule dall'apoptosi (Togane e coll., 2000). È stato dimostrato infatti che la somministrazione di CO esogeno riduce la risposta infiammatoria, inibendo geni pro-infiammatori ed inducendo la produzione di citochine anti-infiammatorie (Song e coll., 2000). CO è, infatti, implicato in numerose patologie cardiovascolari, quali shock endotossico, ischemia/riperfusion, ipertensione ed emorragia subaracnoidea (Durante e Schafer, 1998).

1.2.4.3 Ferro

Il ferro ferroso (Fe^{2+}), rilasciato in seguito alla degradazione dell'eme, aumenta l'espressione della pompa ATP-dipendente in grado di rimuovere il ferro dalla cellula (Ferris e coll., 1999) e induce l'espressione della ferritina, in grado di chelare il ferro, limitando in questo modo la generazione di radicali liberi dell'ossigeno e quindi l'insorgenza di stress ossidativo (Balla e coll., 1995).

I principali effetti dei prodotti della reazione catalizzata dall'enzima emeossigenasi sono riassunti in **Fig.3**.

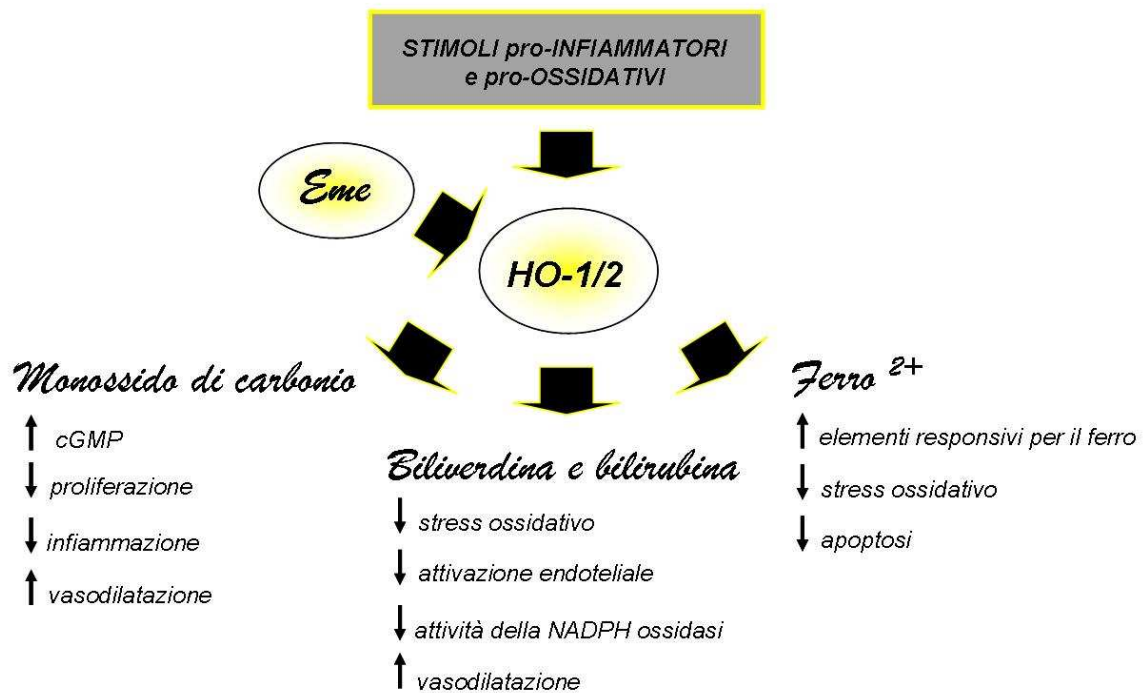


Fig.3: Schema dei principali effetti dei prodotti della reazione catalizzata dall'enzima emeossigenasi.

1.3 Funzioni dell'emeossigenasi-1

1.3.2 Emeossigenasi-1 e tessuto adiposo

Il tessuto adiposo è ora conosciuto come un organo endocrino molto attivo che sembra svolgere un ruolo fondamentale nella regolazione del metabolismo e dell'omeostasi energetica dell'intero organismo (Ahima e Flier, 2000; Cinti, 2005; Lehr e coll., 2011; Lois e Kumar, 2009). Attraverso la secrezione di innumerevoli molecole segnale ed adipochine, il tessuto adiposo comunica con gli altri organi, come fegato, muscolo scheletrico, cuore, encefalo e vasi (Lehr e coll., 2011; Ouwens e coll., 2010; Scherer, 2006). L'aumento dei depositi adiposi e di conseguenza iperplasia ed ipertrofia del tessuto adiposo stesso determinano un'alterazione della secrezione delle adipochine ed uno stato pro-infiammatorio (Lehr e coll., 2011).

Uno studio recente, ha dimostrato che HO-1 potrebbe essere considerata un'adipochina espressa e rilasciata dagli adipociti primari umani: gli adipociti secernono attivamente HO-1 e la rilasciano a livello della circolazione e tale attività secretoria è dipendente dalla dimensione degli adipociti stessi. La secrezione di HO-1 viene però downregolata da TNF- α : tale link tra HO-1 e TNF- α necessita ulteriori approfondimenti (Lehr e coll., 2011).

HO-1 è in grado di ridurre l'adipogenesi e la sua induzione in modelli animali diminuisce il peso corporeo, previene l'accumulo di tessuto adiposo, sia sottocutaneo che viscerale, aumenta il numero degli adipociti di piccole dimensioni, definiti "healthy" (Nicolai e coll., 2009; Peterson e coll., 2009), riequilibra la secrezione delle adipochine e migliora la sensibilità all'insulina (Lehr e coll., 2011; Li e coll., 2008; Vanella e coll., 2011). Tali osservazioni rivestono particolare importanza, in quanto sottolineano che HO-1 non è solo un marker di stress cellulare, ma anche un importante fattore nella regolazione del mantenimento dell'omeostasi cellulare e del tessuto adiposo (Lehr e coll., 2011).

La massa di deposito adiposo addominale è un importante fattore di rischio dell'insorgenza di patologie cardiovascolari: infatti si è riscontrata una diretta proporzionalità tra grado di deposito

adiposo e disfunzioni endoteliali (Peterson e coll., 2009). Diminuendo il grado di deposito adiposo, HO-1 risulta essere quindi protettivo anche nei confronti dell'insorgenza di disfunzioni vascolari. Si hanno però ancora poche informazioni riguardanti il legame tra HO-1 ed adipogenesi.

1-3.3 Emeossigenasi-1 ed apparato cardiovascolare

HO-1 svolge un ruolo cruciale nella protezione cellulare contro lo stress ossidativo indotto da patologie cardiovascolari e diabete (Abraham e Kappas, 2008; Li e coll., 2008). In particolare, l'upregolazione del gene HO-1 previene le disfunzioni vascolari, la morte delle cellule endoteliali (Abraham e coll., 2004; Li e coll., 2008) e contrasta il processo infiammatorio attraverso la modulazione delle funzioni endoteliali stesse (Paine e coll., 2010).

L'overespressione di HO-1 a livello delle cellule endoteliali inibisce l'espressione delle molecole d'adesione, quali E-selectine e VCAM-1, ha effetti anti-apoptotici attraverso l'inibizione di TNF- α ed attenua le complicanze cardiovascolari (Abraham e coll., 2007; Ohta e Yachie, 2004).

Numerosi farmaci per la cura delle patologie cardiovascolari, tra cui losartan e rapamicina, inducono l'aumento dell'espressione di HO-1 (Abraham e coll., 2008). Inoltre, il resveratrolo, polifenolo contenuto nel vino rosso, aiuta a ridurre lo stress ossidativo a livello cardiaco attraverso il pathway HO-1-NO e riduce così l'area infartuata (Abraham e coll., 2008; Rodella e coll., 2009).

HO-1 inoltre è un regolatore negativo della crescita delle cellule muscolari lisce vascolari. Tale inibizione sembra esser mediata anche dal rilascio di CO, derivante dall'attività di HO-1 (Ohta e Yachie, 2004). L'induzione del pathway HO-1-CO rappresenta una risposta adattativa al danno ossidativo, inibendo così lo stress ossidativo stesso e modulando il tono vascolare attraverso la sintesi di biliverdina e bilirubina (anti-ossidanti) e CO (vasodilatante) (Siow e coll., 1999).

1.3.4 Emeossigenasi-1 ed apparato urinario

Nel 1992 fu osservato per la prima volta che HO-1 può ridurre il danno tissutale anche a livello renale (Nath, 2006). L'attività di HO-1 a livello di reni "sani" riflette quella di HO-2: sono, infatti, entrambi espressi a livello della vascolatura pre-glomerulare, della parte ascendente dell'ansa di Henle, dei tubuli e dei dotti collettori. HO-1 è debolmente espressa anche a livello dei tubuli prossimali, del loop dell'ansa di Henle e dei tubuli collettori midollari (Nath, 2006; Shepard e coll., 2002).

Studi clinici hanno rivelato che pazienti con patologie genetiche che li rendono incapaci di esprimere l'enzima HO-1 hanno maggior predisposizione all'insorgenza di patologie renali, mentre soggetti con polimorfismi del gene HO-1, che determinano una minor attività dell'enzima stesso, mostrano alterazioni dell'emodialisi ed insorgenza di fistole arteriovenose (Nath, 2006).

L'attività di HO-1 contribuisce a regolare l'emodinamica renale e l'assorbimento di sodio e fluidi a livello del loop dell'ansa di Henle (Nath, 2006). HO-1 promuove la crescita delle cellule endoteliali (Nath, 2006) ed inibisce la crescita delle cellule epiteliali tubulari renali (Inguaggiaro e coll., 2001; Nath, 2006).

Gli effetti citoprotettivi di HO-1 e dei suoi prodotti in modelli di danno renale, sia *in vitro* che *in vivo*, offrono prospettive incoraggianti per la terapia delle patologie renali (Nath, 2006; Ohta e Yachie, 2004).

1.4 Chinasi coinvolte nel pathway dell'emeossigenasi-1

1.4.1 Protein chinasi attivata dall'AMP-AMPK

AMPK è un complesso eterotrimerico con una subunità catalitica α e due subunità regolatorie β e γ (Hardie, 2004; Hardie e coll., 2003; Xu e coll., 2008), coinvolto principalmente nella modulazione energetica cellulare, in quanto inibisce il pathway anabolico ed induce quello

catabolico (Percy e coll., 2009). Inoltre, la fosforilazione di AMPK (pAMPK) attraverso la serin/treonin chinasi LKB1, e quindi la sua conseguente attivazione, regola la trascrizione di proteine come Akt ed eNOS (Percy e coll., 2009). AMPK viene attivata dall'aumento del rapporto AMP/ATP, indotto dal metabolismo e da fattori di stress (Percy e coll., 2009), quali stress ossidativo, ipossia e privazione dei nutrienti che riducono così l'ATP cellulare (Hardie, 2004); al contrario processi anabolici di consumo di ATP lo inibiscono (Tang e coll., 2011).

Elevati livelli di leptina *in vivo* possono indurre lo switch degli adipociti dalla sintesi all'ossidazione degli acidi grassi: tale meccanismo è strettamente associato all'attivazione di AMPK (Hardie, 2004; Orci e coll., 2004;). AMPK stimola così il consumo dei depositi adiposi quando l'accumulo risulta eccessivo; il motivo per cui tale meccanismo fallisce nei soggetti obesi è ad oggi sconosciuto.

AMPK regola l'intake energetico dei mammiferi: nelle regioni ipotalamiche coinvolte nella regolazione della sazietà, AMPK è inibita da alti livelli di glucosio, leptina ed insulina, che reprimono a loro volta l'intake di cibo; al contrario AMPK è attivata dalla grelina, ormone che stimola l'intake di cibo (Andersson e coll., 2004; Hardie, 2004). L'overespressione di AMPK stimola inoltre l'attivazione di eNOS e quindi la produzione di NO, modulando così le funzioni endoteliali (Fisslthaler e Fleming, 2009; Rizzo e coll., 2010; Zhu e coll., 2008).

AMPK può attivare direttamente eNOS anche se, recentemente, è stata osservata anche l'attivazione di AMPK da parte di eNOS, sottolineando una reciproca correlazione tra AMPK ed eNOS (Goldstein e coll., 2009; Hardie, 2004; Rizzo e coll., 2010).

1.4.2 Serin/treonin chinasi LKB1

La serin/treonin chinasi LKB1, soppressore tumorale, viene attualmente considerata il maggior regolatore dell'attivazione di AMPK (Chau e coll., 2010; Hardie, 2004; Tzatsos e Kandror, 2006). LKB1 è infatti in grado di attivare 13 differenti chinasi della superfamiglia di AMPK (Chau e

coll., 2010; Estall e coll., 2009). Per esser attivata, LKB1 deve costituire un complesso con due subunità accessorie, STRADA α/β e MO25 α/β (Chau e coll., 2010; Zhou e coll., 2001). Un disequilibrio tra le subunità può indurre comunque un aumento dell'espressione di LKB1, ma senza determinare fosforilazione di AMPK (Chau e coll., 2010).

Soggetti con obesità severa mostrano alterate funzioni del pathway LKB1-AMPK e la somministrazione di composti che attivano AMPK stimola il trasporto muscolare di glucosio e migliorano i livelli di glicemia (Chau e coll., 2010). I ratti Zucker obesi mostrano una diminuita attività della chinasi AMPK e quindi un'alterazione dei meccanismi che regolano l'asse LKB1-AMPK: ciò potrebbe spiegare, almeno in parte, il disequilibrio metabolico di tali modelli animali.

L'identificazione di attivatori di LKB1, e quindi del pathway di AMPK, potrebbe permettere di sviluppare nuove terapie contro le patologie dell'obesità e del diabete.

1.4.3 Akt

Corretti livelli di Akt attivata attraverso fosforilazione (pAkt) sono necessari per il fisiologico funzionamento vascolare (Peterson e coll., 2009); probabilmente tale meccanismo viene a sua volta regolato da AMPK (Peterson e coll., 2009; Sambuceti e coll., 2009). La chinasi Akt, definita anche protein kinase B può, una volta attivata, può fosforilare a sua volta una serie di substrati, quali glicogeno sintasi chinasi-3, Bad, caspasi-9, determinando l'attivazione di queste proteine (Fulton e coll., 1999).

E' inoltre noto che tale chinasi possa fosforilare eNOS in risposta a numerosi stimoli (Jiang e coll., 2007; Schini-Kerth e coll., 2010; Xu e coll., 2008) e quindi aumentare la capacità di tale enzima di generare NO. Tale azione di attivazione di eNOS può esser svolta anche, come già descritto in precedenza, da AMPK (Xu e coll., 2008). Il coinvolgimento sia di AMPK sia di Akt nella fosforilazione di eNOS e quindi nella produzione di NO a livello delle cellule endoteliali è

un importante meccanismo di regolazione del tono vascolare. Tuttavia, è noto che anche il pathway dell'adiponectina può indurre la fosforilazione di eNOS attraverso l'azione di AMPK, ma non coinvolgendo Akt (Xu e coll., 2008): tale osservazione permette di concludere che l'azione di tali chinasi dipende dal differente tipo di stimolo.

La regolazione della sintesi di NO da parte di Akt può essere considerata un interessante target terapeutico per lo sviluppo di nuovi farmaci al fine di ridurre le alterazioni endoteliali dovute alle patologie cardiovascolari, come ipertensione, aterosclerosi, infarto cardiaco e diabete.

Inoltre, anche l'attivazione di Akt, infine, determina upregolazione di HO-1 con conseguenti effetti protettivi (Paine e coll., 2010).

1.5 Induttori ed inibitori dell'emeossigenasi-1

Varie molecole sono in grado di indurre od inibire l'espressione e l'attivazione di HO-1. Tra gli induttori, i più noti ed utilizzati in letteratura sono le metalloporfirine, i peptidi mimetici dell'apolipoproteina A1 (L4D, L4F), l'acido epossiecosatrienoico (EET) ed i suoi agonisti; tra gli inibitori, invece, il più conosciuto è la tin-mesoporfirina (SnMP).

Le metalloporfirine vengono comunemente utilizzate in modelli sperimentali sia *in vivo* che *in vitro*, ma non in trials clinici in quanto non sono cellule-specifiche e possono determinare grave citotossicità (Paine e coll., 2010).

I peptidi mimetici dell'apolipoproteina A1, L4D e L4F, vengono sintetizzati rispettivamente dagli aminoacidi D e F ed aumentano la capacità protettiva delle lipoproteine ad elevata densità (HDL) di ridurre l'ossidazione delle LDL durante il processo aterosclerotico (Peterson e coll., 2008, 2009). Sia L4D che L4F migliorano le funzioni vascolari e ripristinano l'equilibrio di NO, inducono l'aumento dei livelli circolanti di adiponectina e diminuiscono lo stato infiammatorio e lo stress ossidativo (Peterson e coll., 2009; Reihill e coll., 2007). Hanno perciò un effetto prevalentemente a livello cardiovascolare.

Studi recenti hanno inoltre evidenziato che alcuni farmaci comunemente utilizzati nella pratica clinica (aspirina, losartan, statine, ecc.) possono upregolare l'espressione e l'attività di HO-1 e quindi attenuare le disfunzioni cardiovascolari (Burgess e coll., 2011).

1.5.1 Acido epossiecosatrienoico

In questo studio abbiamo focalizzato la nostra attenzione su EET, un derivato del metabolismo dell'acido arachidonico che attraverso un meccanismo che coinvolge l'attivazione delle chinasi AMPK ed Akt (Sodhi e coll., 2009; Vanella e coll., 2011), è in grado di indurre l'aumento dell'espressione di HO-1 (Kim e coll., 2010; Vanella e coll., 2011). In presenza di NADPH e ossigeno, l'acido arachidonico viene epossidato dall'enzima citocromo P450 (CYP450) in quattro sottotipi di acido epossiecosatrienoico: 5,6-EET; 8,9-EET; 11,12-EET e 14,15-EET. Tale sintesi può essere effettuata da differenti isoforme di CYP, quali CYP1A, CYP2B, CYP2C, CYP2D, CYP2E e CYP2J (Huang e coll., 2007) con espressione tessuto specifica e selettività regionale e stereospecificità (Kim e coll., 2010; Sacerdoti e coll., 2007; Sodhi e coll., 2009).

EET appartiene ad una classe di mediatori lipidici con proprietà citoprotettive e con una varietà di attività biologiche che permettono la dilatazione dei vasi arteriosi, l'inibizione dell'aggregazione piastrinica, la stimolazione dell'angiogenesi (Michaelis e coll., 2003; Sacerdoti e coll., 2007), l'inibizione del co-trasporto sia basale che apicale di $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-2Cl}^-$ a livello delle cellule epiteliali renali (He e coll., 2003; Sacerdoti e coll., 2007), la modulazione dell'eccitabilità elettrica cardiaca (Lu e coll., 2002), l'induzione dell'aggregazione dei leucociti (Pratt e coll., 2002; Sacerdoti e coll., 2007), la riduzione della migrazione delle cellule muscolari lisce vascolari (Sacerdoti e coll., 2007; Sun e coll., 2002), l'inibizione dell'apoptosi e dell'espressione delle molecole d'adesione vascolare, come VCAM-1 e E-selectine (Fleming e coll., 2001;) e l'aumento delle capacità fibrinolitiche (Nade e coll., 2001; Sacerdoti e coll., 2007).

EET svolge la sua azione vasodilatante, anti-infiammatoria ed anti-apoptotica prevalentemente a livello renale e vascolare (Burgess e coll., 2011). A livello renale, EET svolge un ampio spettro di azioni biologiche tra cui modulazione del tono vascolare (Brand-Schieber e coll., 2000) e del trasporto ionico (Brand-Schieber e coll., 2000; Sakairi e coll., 1995).

EET è inoltre un importante modulatore del sistema cardiovascolare (Sodhi e coll., 2009). Esso rappresenta infatti un fattore protettivo vascolare in grado di modulare positivamente l'endotelio, upregolando l'espressione e l'attività di eNOS (Jiang e coll., 2007) e l'equilibrio tra proliferazione ed apoptosi delle cellule muscolari lisce vascolari (Fleming, 2001; Jiang e coll., 2007). EET inoltre agisce in maniera analoga al fattore endoteliale iperpolarizzante in alcuni letti vascolari, inducendo così vasodilatazione mediata dall'endotelio (Sacerdoti e coll., 2007). In particolare, EET aumenta la concentrazione di Ca^{2+} intracellulare delle cellule endoteliali (Hoebel e coll., 1998; Sacerdoti e coll., 2007). L'effetto vasodilatante di EET è mediato, almeno in parte, dal sistema HO-CO (Sacerdoti e coll., 2007), ma l'esatto meccanismo non è ancora completamente noto (Pratt e coll., 2001; Sacerdoti e coll., 2007).

L'azione di EET può essere inibita da *N*-metilsulfosil-6-(2-propirgilossifenil)esanamide (MSPPOH), analogo acetilenico che inibisce in modo selettivo l'eossidazione dell'acido arachidonico mediata dall'enzima CYP-eossigenasi (Brand-Schieber e coll., 2000). L'inibizione di EET da parte di MSPPOH è ampiamente dimostrata in studi sia *in vivo* che *in vitro* (Huang e coll., 2007; Zhou e coll., 2005).

La reazione di sintesi dell'acido epossiecosatrienoico e dei principali effetti correlati alla patogenesi dell'obesità sono riassunti in **Fig. 4**.

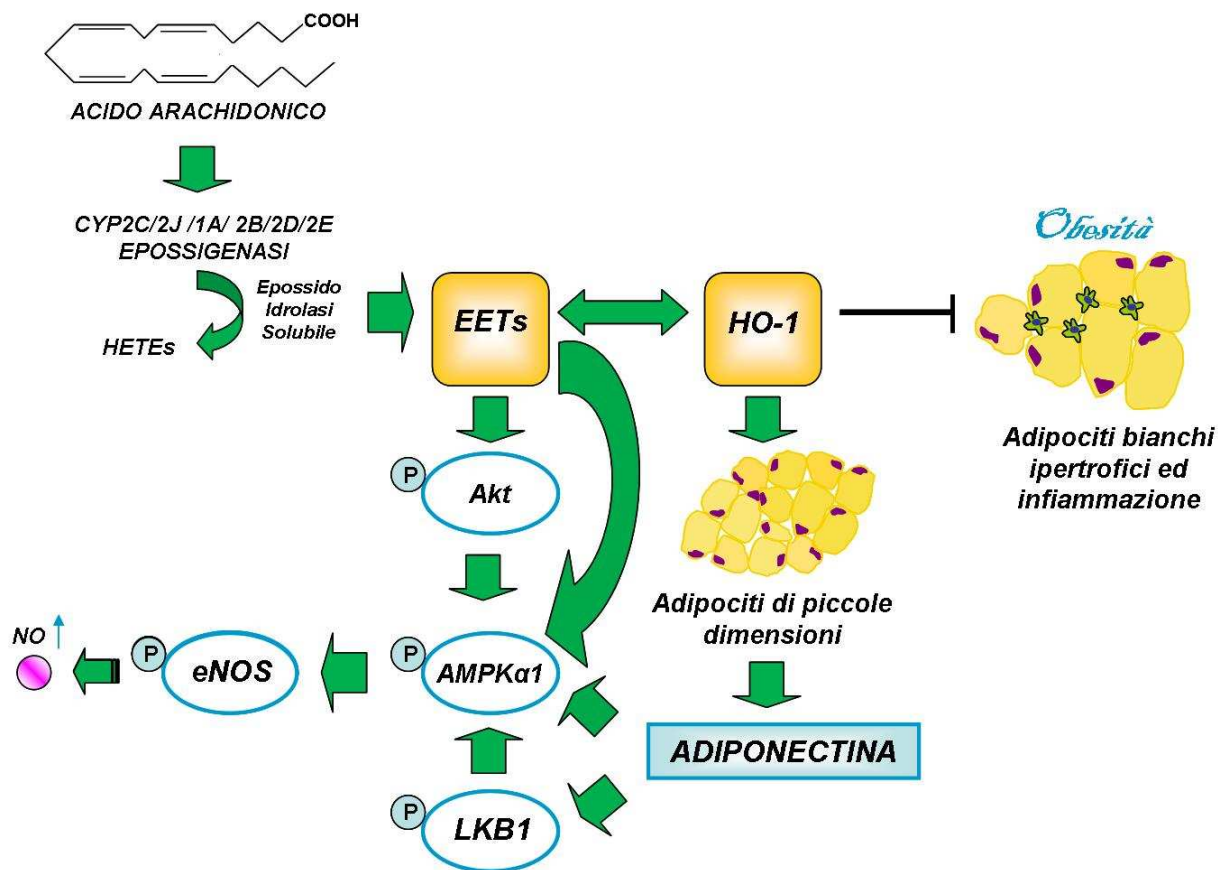


Fig.4: Schema della reazione di sintesi dell'acido epossiecosatrienoico e dei principali effetti correlati alla patogenesi dell'obesità.

1.5.2 Acido epossiecosatrienoico ed obesità

La stimolazione dell'espressione di HO-1 da parte di EET nella patologia dell'obesità e del diabete di secondo tipo determina una diminuzione dell'accumulo di grasso viscerale e sottocutaneo e dell'ipertrofia degli adipociti, migliora la sensibilità all'insulina, aumenta la fosforilazione dei recettori insulinici (Kim e coll., 2010; Nicolai e coll., 2009; Vanella e coll., 2011), diminuisce la sintesi delle citochine pro-infiammatorie, aumenta la secrezione di adiponectina (Kim et al., 2010) ed attiva AMPK ed Akt (Kim e coll., 2010; Kusmic e coll., 2010; Li e Keaney, 2010). Il risultato di tutti questi effetti è la riduzione dei danni indotti sia dalla patologia dell'obesità stessa sia delle patologie da essa derivate.

2. SCOPO DEL PROGETTO DI RICERCA

L'obiettivo di questo studio è stato quello di analizzare a livello del tessuto adiposo, dell'apparato cardiovascolare (aorta) e dell'apparato urinario (rene) il processo patogenetico dell'obesità e successivamente di valutare gli effetti benefici dell'isoforma inducibile dell'emeossigenasi (HO-1) in un modello animale di obesità (topi sottoposti a dieta high fat).

A tale scopo abbiamo analizzato

- le alterazioni morfologiche indotte dal processo patogenetico dell'obesità;
- i processi biologici ed i markers correlati a HO-1, proteina che costituisce un possibile importante collegamento tra obesità, stress ossidativo, disfunzioni vascolari e renali;
- gli effetti dell'induzione dell'espressione di HO-1, dopo somministrazione dell'acido epossicosatrienoico (EET) quale induttore dell'espressione e dell'attività di HO-1;
- il meccanismo mediante il quale HO-1 determina il suo effetto protettivo sulla patogenesi dell'obesità e dei danni vascolari e renali ad essa correlati.

3. MATERIALI E METODI

3.1 *Animali e trattamento*

In questo studio si sono utilizzati 40 topi maschi C57BL/6, di cui 30 topi, definiti HF, sono stati alimentati per 13 settimane secondo la dieta high fat contenente 60% di calorie dal grasso (D12492 Research Diet, Brunswick, NJ, US) e 5,2 Kcal/g (Ghosh e coll., 2011) e 10 topi alimentati con la dieta “classica” contenente 12% di calorie del grasso, definiti lean in questo studio. Il modello animale di topi alimentati con una dieta high fat mima in modo efficace gli effetti di una dieta ad elevato contenuto di grassi nell’uomo e tali animali hanno una patogenesi del tutto paragonabile a quella dei soggetti obesi, incluso ipertensione, aumento della ritenzione di sodio, diminuzione dell’espressione dell’enzima CYP-eossigenasi renale, diminuzione dell’espressione di EET ed aumento del riassorbimento tubulare renale e della velocità di filtrazione glomerulare (Huang e coll., 2007).

Dopo 13 settimane, gli animali HF, sempre alimentati secondo la dieta high fat, sono stati a loro volta suddivisi in tre gruppi sperimentali (10 animali per gruppo): gruppo I, animali HF senza ulteriore trattamento; gruppo II, animali HF trattati attraverso iniezione intraperitoneale giornaliera di acido epossiecosatrienoico (EET) per 2 settimane, alla dose di 1,5 mg/100g di peso corporeo e gruppo III, animali HF cotrattati con EET (trattamento uguale al gruppo II) ed attraverso iniezione giornaliera intravenosa dell’inibitore di EET, N-methylsulphonyl-6-(2-propargyloxyphenyl)hexanamide (MSPPOH), per 2 settimane, alla dose di 20mg/kg (Huang e coll., 2007; Sodhi e coll., 2009). Gli animali sono stati stabulati in gabbie individuali con acqua e cibo *ad libitum*, ad una temperatura costante di 22°C e con un ciclo di alternanza luce/buio di 12 ore. Tutti gli animali sono stati pesati ogni due giorni per preparare il corretto dosaggio dei trattamenti sulla base del cambiamento di peso. La sofferenza ed il numero degli animali utilizzati è stata ridotta al minimo.

Al termine dei diversi trattamenti sperimentali, gli animali sono stati sacrificati tramite dislocazione cervicale sono stati prelevati: tessuto adiposo sottocutaneo, aorta e rene per l'analisi morfologica, immunoistochimica e di Western Blotting. Inoltre, al momento del sacrificio, è stato prelevato il sangue di ciascun animale sperimentale. Per l'analisi della concentrazione di glucosio è stato utilizzato il sangue intero ottenuto dalla coda. Il sangue intero prelevato direttamente dal cuore è stato invece raccolto in tubi K₃EDTA, centrifugato a 1000 giri per 15 minuti alla temperatura di 4°C, al fine di ottenere il plasma, utilizzato poi per l'analisi di citochine infiammatorie ed adiponectina.

3.2 Valutazione dei parametri metabolici

3.2.1 Food intake ed accumulo di tessuto adiposo sottocutaneo

Il consumo di cibo è stato monitorato settimanalmente, pesando il mangime di ciascuna gabbia. Durante il sacrificio, il tessuto adiposo sottocutaneo di ciascun gruppo sperimentale è stato prelevato, lavato in soluzione fisiologica e pesato, al fine di monitorare l'accumulo adiposo conseguente alla dieta HF e gli eventuali effetti benefici del trattamento con EET.

3.3 Analisi biochimica

3.3.1 Analisi della concentrazione di: glucosio, fattore di necrosi nucleare- α , interleuchina-6 ed adiponectina

Al fine di valutare la concentrazione di glucosio si è utilizzato un analizzatore automatizzato (Life Scan Inc., Milpitas, CA); per valutare la concentrazione plasmatica di TNF- α , IL-6 ed adiponectina è stato utilizzato invece il metodo enzyme linked immunoabsorbent assay (ELISA)(Thermo Fischer LSR, Rockford, IL; Pierce Biotechnology, Inc). In particolare, il saggio ELISA prevede l'incubazione dei campioni per 2 ore in una piastra da 96 pozzetti pre-coated con l'anticorpo primario d'interesse. Il legame antigene-anticorpo viene poi rilevato

attraverso incubazioni successive in: anticorpo secondario HRP-coniugato, Detector solution e HRP-substrato, rispettivamente per un'ora, 20 e 30 minuti al buio. La reazione viene poi bloccata attraverso una Stop solution e, infine, viene analizzata l'assorbanza dei campioni, ad una lunghezza d'onda compresa tra 450 e 550 nm, attraverso un lettore di piastre.

3.4 Valutazione morfo-funzionale

3.4.1 Preparazione dei tessuti

Parte degli organi prelevati sono stati lavati in soluzione fisiologica, fissati in aldeide formica (10%) per 24 ore ed inclusi in paraffina, seguendo un protocollo standard, per la valutazione morfologica ed immunistochemica. Tali campioni sono stati, quindi, tagliati con un microtomo a rotazione in sezioni seriali di 7 μ m di spessore.

La restante parte degli organi prelevati è stata immediatamente congelata in azoto liquido e conservata a -80°C per i successivi studi attraverso Western Blotting.

3.4.2 Analisi morfologica

Le sezioni di ciascuno organo sono state sparaffinate, reidratate attraverso passaggi in soluzioni a scala crescente di etanolo ed, infine, analizzate attraverso la colorazione morfologica ematossilina-eosina, in accordo con le procedure standard. Le sezioni sono state successivamente osservate al microscopio ottico (Olympus, Germany).

3.4.3 Analisi morfometrica del tessuto adiposo

Attraverso l'analisi morfometrica, sono state valutate le dimensioni degli adipociti nei differenti modelli sperimentali.

Le sezioni di tessuto adiposo, analizzate attraverso la colorazione ematossilina-eosina, sono state dapprima osservate ad un ingrandimento finale di 200X mediante un microscopio ottico

(Olympus, Germany). E' stata poi calcolata l'area (μm^2) delle singole cellule adipose attraverso un analizzatore d'immagine computerizzato (Image-Pro Plus, Milano, Italia) e, in particolare, per ciascun animale sono stati analizzati 50 adipociti, ottenuti in campi casuali, per ciascuna sezione.

Il significato statistico delle differenze tra i gruppi sperimentali è stato stimato utilizzando il test ANOVA, considerando significativo $p < 0.05$. Tutti i dati sono presentati come media \pm errore standard.

3.4.4 Immunofluorescenza per HO-1, AMPK α_1 /pAMPK α_1 , LKB1/pLKB1, Akt/pAkt ed eNOS

Le sezioni di ciascun organo sono state "paraffinate", incubate 30 minuti in una soluzione di H₂O₂-metanolo (1:1) per l'inibizione delle perossidasi endogene, reidratate mediante immersioni in una serie decrescente di etanolo e lavate in tampone Tris-amino-salino 1X (TBS). Successivamente sono state immerse in tampone citrato 0.05M ed incubate 8 minuti in forno a microonde a 700 W per lo smascheramento antigenico. Le sezioni sono state, quindi, incubate in albumina sierica bovina 1% (BSA) per un'ora, al fine di saturare i siti di legame aspecifico e successivamente, per un'ora a temperatura ambiente e overnight a 4°C, con i seguenti anticorpi primari: 1) anti-HO-1 (rabbit polyclonal, Stressgen, diluito 1:100); 2) anti-AMPK α_1 (goat polyclonal, Santa Cruz Biotechnology, diluito 1:150) e anti-pAMPK α_1 (rabbit polyclonal, Santa Cruz Biotechnology, diluito 1:100) in double staining; 3) anti-LKB1 (goat polyclonal, Santa Cruz Biotechnology, diluito 1:50) e anti-pLKB1 (rabbit polyclonal, Santa Cruz Biotechnology, diluito 1:50) in double staining; 4) anti-Akt1 (mouse monoclonal, Santa Cruz Biotechnology, diluito 1:100) e anti-pAkt1 (rabbit polyclonal, Santa Cruz Biotechnology, diluito 1:100) in double staining; e, solo per le sezioni di aorta; 5) anti-eNOS (rabbit polyclonal, AnaSpec, diluito 1:70).

Le sezioni tissutali sono state successivamente incubate per 45 minuti in una mix di anticorpi secondari fluorescinati, diluiti 1:200, ed infine controcolorate con il DAPI (4'-6-diamino-2-fenilindolo cloridato) che, legandosi al DNA, colora i nuclei delle cellule di blu.

Le reazioni di controllo dell'anticorpo sono state ottenute utilizzando TBS 1X in sostituzione dell'anticorpo primario.

Tutte le sezioni sono state successivamente osservate ed analizzate attraverso l'utilizzo del microscopio confocale (510 Meta Zeiss, Germany).

3.4.5 Analisi semiquantitativa

Le sezioni trattate con il metodo dell'immunofluorescenza sono state valutate da un punto di vista semiquantitativo, seguendo i seguenti parametri: (-) quando non vi era espressione della proteina ricercata; (+) quando la sezione risultava debolmente positiva; (++) quando la sezione risultava mediamente positiva; (+++) quando l'espressione della proteina era molto forte.

3.5 Western Blotting per HO-1, AMPK α ₁/pAMPK α ₁, LKB1/pLKB1, Akt/pAkt e NOS ed adiponectina

Per l'analisi attraverso Western Blotting, tessuto adiposo, l'aorta ed i reni criopreservati sono stati omogenati in tampone di lisi e, quindi, centrifugati a 10.000 giri per 15 minuti al fine di ottenere la separazione tra surnatante e sedimento. La concentrazione delle proteine contenute nel surnatante è stata quantificata con l'utilizzo di BSA come campione standard di assorbimento spettrofotometrico. L'elettroforesi su gel di poliacrilamide al 8% è stata eseguita e le proteine sono poi state trasferite su membrana di nitrocellulosa usando un elettroblotter.

Le membrane sono state poi immerse, al fine di saturare i siti di legame aspecifico, in BSA 5% per un ora a temperatura ambiente; quindi, sono state lavate in TBS 1X ed incubate un'ora a temperatura ambiente e overnight a 4°C, con i seguenti anticorpi primari: 1) anti-HO-1 (rabbit polyclonal; Stressgen, diluito 1:1000); 2) anti-AMPK α ₁ (mouse monoclonal, Stressgen, diluito

1:2000); 3) anti-pAMPK α 1 (rabbit polyclonal, Stressgen, diluito 1:1500); 4) anti-LKB1 (mouse monoclonal, Stressgen, diluito 1:1000); 5) anti-pLKB1 (rabbit polyclonal, Stressgen, diluito 1:1500); 6) anti-Akt1 (mouse monoclonal, Stressgen, diluito 1:1000); 7) anti-pAkt1 (rabbit polyclonal, Stressgen, diluito 1:1000); 8) solo per i campioni di tessuto adiposo, anti-adiponectina (mouse monoclonal, Cell Signaling Technology Inc., diluito 1:200); solo per i campioni di aorta, 9) anti-eNOS (rabbit polyclonal, Stressgen, diluito 1:1000) e, come controllo del corretto caricamento dei campioni, 10) anti- β actina (mouse monoclonal; Sigma-Aldrich, diluito 1:10000). Successivamente, le membrane sono state lavate in TBS 1x ed incubate con l'appropriato anticorpo secondario fluorescinato per un'ora a temperatura ambiente. Le membrane sono state infine osservate grazie all'utilizzo di Imaging System (Odyssey, Lincoln Biosciences, US). La densità delle bande ottenute è stata normalizzata rispetto alla densità delle bande della β actina dei rispettivi campioni.

Per valutare l'intensità ottica (OD) delle bande ottenute dall'analisi con Western Blotting è stato utilizzato un programma computerizzato, Image J 1.41. Il significato statistico delle differenze tra i gruppi sperimentali a volta è stato stimato utilizzando il *t* test, considerando significativo $p < 0.05$. Tutti i dati sono presentati come media \pm errore standard.

4. RISULTATI

4.1 Valutazione dei parametri metabolici

4.1.1 Food intake, peso corporeo e deposito di tessuto adiposo

Il peso dei topi alimentati secondo la dieta high fat è risultato statisticamente aumentato, rispetto al peso di dei topi lean di controllo. Il consumo di cibo non risulta significativamente diverso nei topi HF rispetto ai topi di controllo. Il trattamento con EET è ben tollerato dai topi obesi; inoltre EET riduce l'aumento di peso nei topi HF, rispetto ai topi HF senza trattamento. La prevenzione dell'aumento del peso corporeo mediata da EET, è stata però annullata dal co-trattamento EET-MSPPOH.

Il dati ottenuti dalla valutazione del peso del grasso sottocutaneo confermano l'aumento significativo di peso corporeo nei topi HF e la successiva perdita di peso dopo trattamento con EET, effetto annullato dal co-trattamento EET-MSPPOH.

4.1.2 Glucosio

I livelli di glucosio plasmatico nei topi HF sono significativamente maggiori rispetto ai topi lean di controllo. La somministrazione di EET al gruppo di topi HF riduce significativamente i livelli di glucosio plasmatico, effetto annullato dal co-trattamento con MSPPOH.

I dati ottenuti dalla valutazione dei parametri metabolici sono riassunti in **Tabella I**.

	Peso corporeo (g)	Food Intake (g/giorno)	Deposito di tessuto adiposo sottocutaneo (g)	Glucosio (mg/dl)
Lean	28,3 ± 2.2	4.27 ± 2.11	1.13 ± 2.2	147 ± 1.79
HF	50,8 ± 2.7	4.32 ± 2.36	4.57 ± 1.84	453 ± 3.2
HF EET	34,3 ± 1.8	4.18 ± 1.87	3.02 ± 2.18	179 ± 0.94
HF EET MSPPOH	51,24 ± 3.2	4.51 ± 2.04	4.71 ± 2.06	424 ± 1.71

Tabella I: La tabella riassume i parametri metabolici ottenuti dalla valutazione di peso corporeo, food intake, peso del tessuto adiposo sottocutaneo e glucosio.

4.2 Valutazione biochimica

4.2.1 Adiponectina

Si è osservato un aumento significativo dei livelli plasmatici di adiponectina nei topi HF trattati con EET rispetto ai topi HF non trattati, in cui l'adiponectina è significativamente minore rispetto ai topi di controllo. L'effetto di EET sui livelli di adiponectina plasmatica viene annullato dal co-trattamento con EET-MSPPOH (**Fig. 5a**).

4.2.2 Fattore di necrosi tumorale- α

I topi HF mostrano elevati livelli di TNF- α plasmatico rispetto agli animali di controllo. Il trattamento con EET induce una significativa diminuzione di TNF- α rispetto ai topi HF. L'effetto di EET viene annullato dal co-trattamento con EET-MSPPOH (**Fig. 5b**).

4.2.3 Interleuchina-6

I topi HF mostrano livelli significativamente maggiori di IL-6 plasmatica rispetto ai topi di controllo. La somministrazione di EET nei topi HF induce una significativa diminuzione dell'espressione della proteina serica. Il co-trattamento EET-MSPPOH annulla invece l'effetto di EET mantenendo i livelli di IL-6 elevati (**Fig. 5c**).

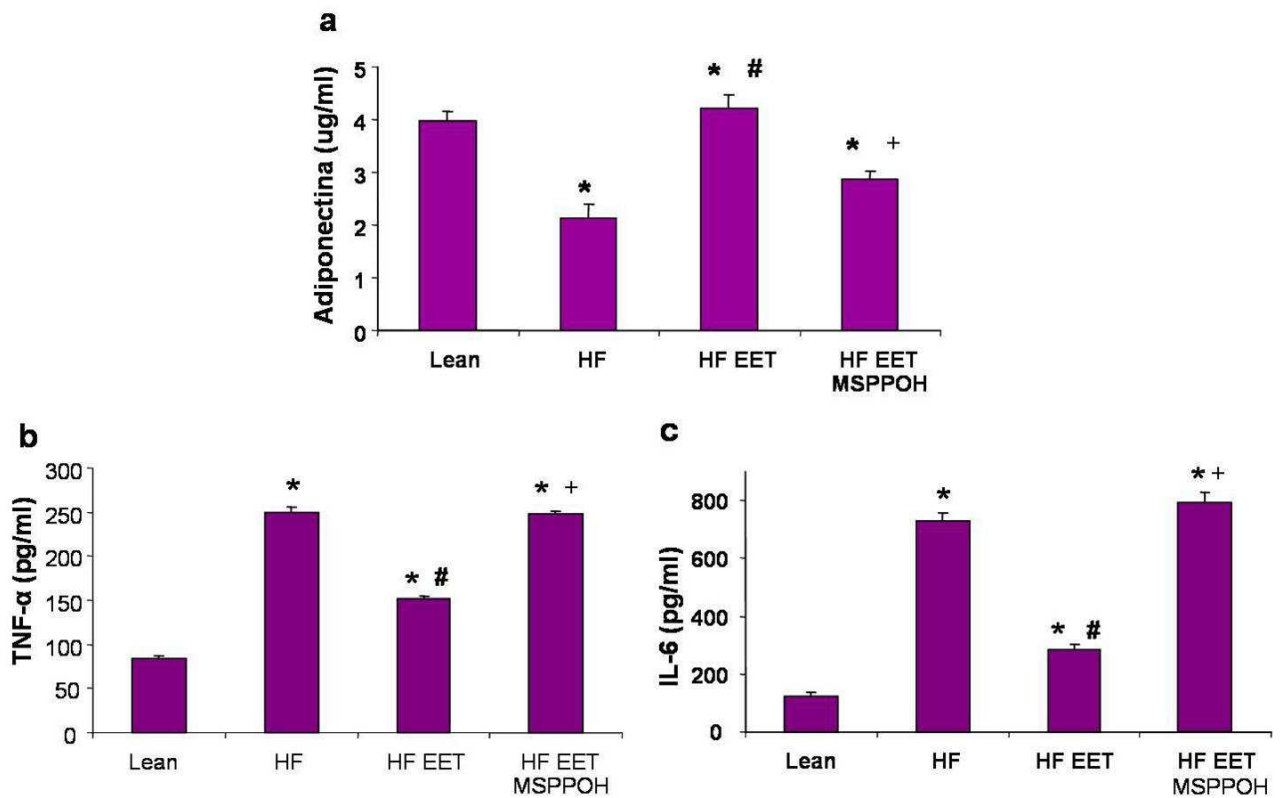


Fig.5a-c: Valutazione biochimica dei livelli plasmatici di adiponectina (a), fattore di necrosi tumorale- α (b) ed interleuchina-6 (c). * $p < 0.05$ vs lean; # $p < 0.05$ vs HF; + $p < 0.05$ vs HF EET.

	Adiponectina ($\mu\text{m/ml}$)	TNF- α (pg/ml)	IL-6 (pg/ml)
Lean	3.98 ± 0.17	83.27 ± 3.8	124.27 ± 12.4
HF	2.12 ± 0.28	250.12 ± 5.3	727.36 ± 30.2
HF EET	4.21 ± 0.27	151.23 ± 3.1	284.44 ± 17.2
HF EET MSPPOH	2.88 ± 0.15	247.5 ± 4.3	792.15 ± 36.6

Tabella II: La tabella riassume i valori dell'analisi biochimica rappresentati in Fig. 5a-c.

4.3 Valutazione morfo-funzionale

4.3.1 Analisi morfologica

L'analisi morfologica, attraverso la colorazione ematossilina-eosina, permette di valutare sia le alterazioni indotte dall'insorgenza dell'obesità, conseguente alla dieta HF, sia gli effetti benefici e simil-terapeutici dell'induzione di HO-1, attraverso trattamento con EET.

4.3.1.1 Tessuto adiposo

L'analisi morfologica del tessuto adiposo conferma innanzitutto che il tessuto adiposo sottocutaneo analizzato in questo studio è costituito prevalentemente da adipociti bianchi; è infatti evidente la presenza di adipociti sferici ed uniloculari. Viene inoltre confermata l'ipertrofia degli adipociti nei topi HF, rispetto ai topi lean di controllo (**Fig. 6a,b**). Il trattamento con EET induce una significativa diminuzione delle dimensioni degli adipociti; il co-trattamento EET-MSPPOH, invece, mantiene gli adipociti di dimensioni paragonabili a quelle dei topi HF (**Fig. 6c,d**).

Tali osservazioni sono confermate dall'analisi quantitativa, che ha evidenziato una media delle dimensioni degli adipociti significativamente minore nei topi lean rispetto ai topi HF, e una diminuzione di tali dimensioni nei topi HF trattati con EET. Nei topi HF trattati con EET e MSPPOH le dimensioni tornano a livelli paragonabili a quelle del gruppo HF senza trattamento (**Fig. 6e**).

La valutazione del numero degli adipociti per campo ha evidenziato un aumento del numero di tali cellule nei topi HF trattati con EET, paragonabile a quello osservato nei topi lean di controllo rispetto ai topi HF. I topi co-trattati con EET-MSPPOH mostrano una minor quantità di adipociti per campo paragonabile ai topi HF non trattati (**Fig. 6f**).

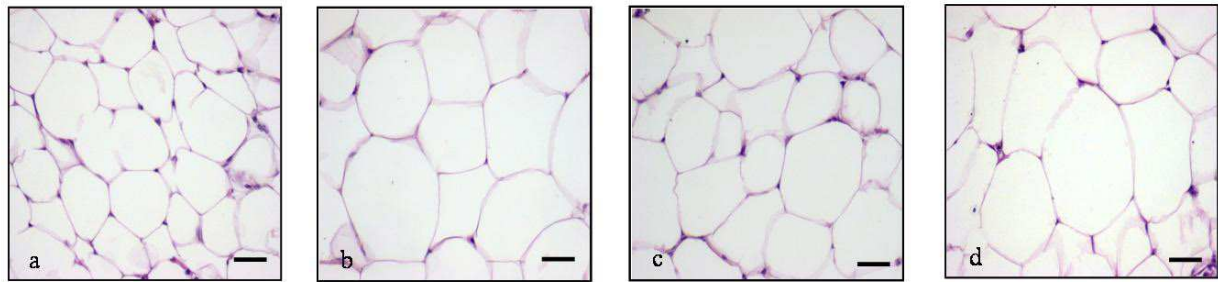


Fig. 6a-d: Valutazione morfologica di sezioni istologiche di tessuto adiposo sottocutaneo analizzate con la colorazione ematossilina-eosina. Le microfotografie mostrano i seguenti gruppi sperimentali: (a) lean; (b) lean alimentati con una dieta high fat (HF); (c) lean alimentati con una dieta high fat e trattati con acido epossiecosatrienoico (HF EET) e (d) lean alimentati con una dieta high fat e co-trattati con acido epossiecosatrienoico e N-metilsulfosil-6-(2-propirgilossifenil)esanamide (HF EET MSPPOH).

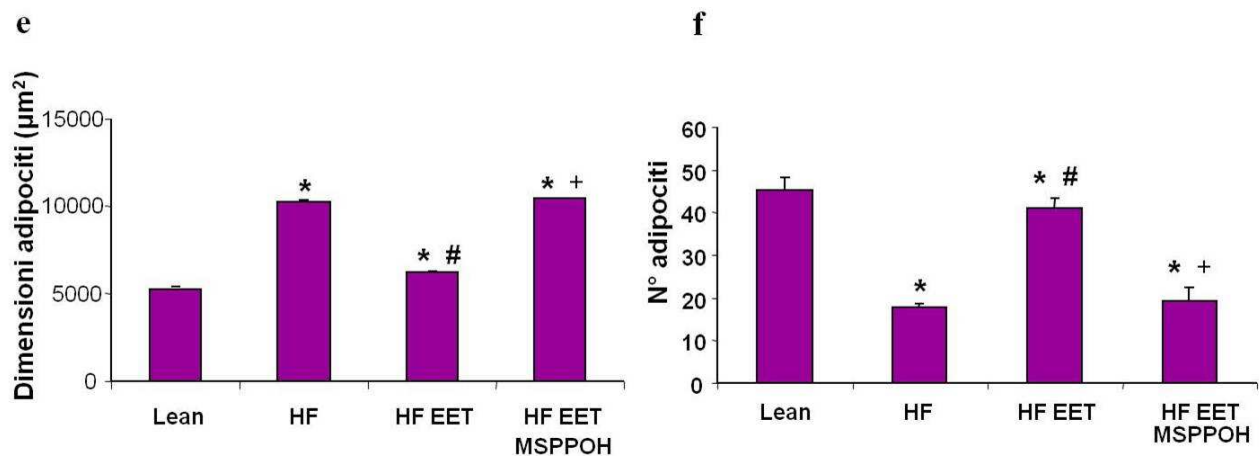


Fig. 6e-f: Analisi quantitativa degli adipociti sottocutanei: valutazione delle dimensioni (e) e del numero degli adipociti (f). * $p < 0.05$ vs lean; # $p < 0.05$ vs HF; + $p < 0.05$ vs HF EET.

4.3.1.2 Aorta

I topi lean appartenenti al gruppo di controllo presentano una normale morfologia a livello aortico; al contrario, i topi HF mostrano un quadro morfologico alterato, con alterazioni della citoarchitettura vascolare, distacco delle cellule endoteliali ed ipertrofia delle cellule muscolari lisce (**Fig. 7a,b**). Il trattamento con EET dei topi HF ristabilisce la normale morfologia dell'aorta; mentre il co-trattamento con MSPPOH annulla l'effetto benefico indotto da EET (**Fig. 7c,d**).

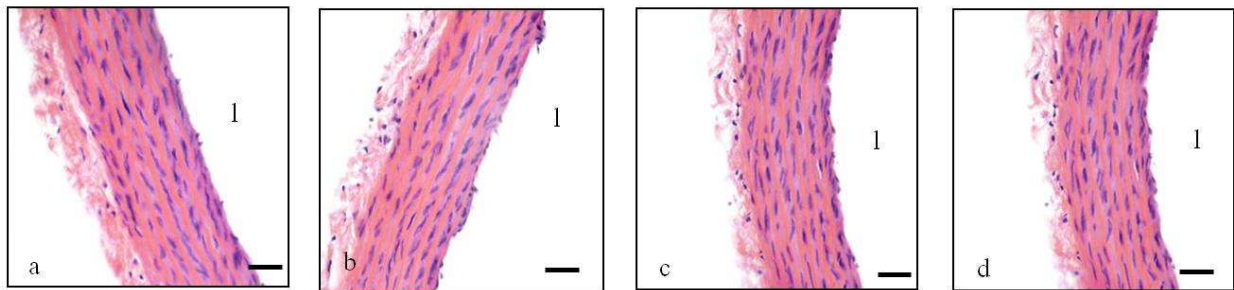


Fig. 7a-d: Valutazione morfologica di sezioni istologiche di aorta analizzate con la colorazione ematossilina-eosina. Le microfotografie mostrano i seguenti gruppi sperimentali: (a) lean; (b) lean alimentati con una dieta high fat (HF); (c) lean alimentati con una dieta high fat e trattati con acido epossiecosatrienoico (HF EET) e (d) lean alimentati con una dieta high fat e co-trattati con acido epossiecosatrienoico e N-metilsulfosil-6-(2-propirgilossifenil)esanamide (HF EET MSPPOH). (l) indica il lume dell'aorta.

4.3.1.3 Rene

I topi lean di controllo mostrano una normale morfologia del parenchima renale. Al contrario, i topi HF evidenziano alterazioni sia a carico dei glomeruli, sia dei tubuli distali e prossimali. Si osservano, infatti, costrizione glomerulare associata ad un aumento dello spazio periglomerulare e dilatazione dei tubuli prossimali e distali (**Fig. 8a,b**).

La somministrazione di EET ai topi HF determina un significativo miglioramento del quadro morfologico: il parenchima renale appare, infatti, del tutto paragonabile a quello osservato nei topi di controllo.

Al contrario, in seguito alla somministrazione di MSPPOH si evidenziano ancora anomalie sia a livello glomerulare sia a carico dei tubuli distali e prossimali (**Fig. 8c,d**).

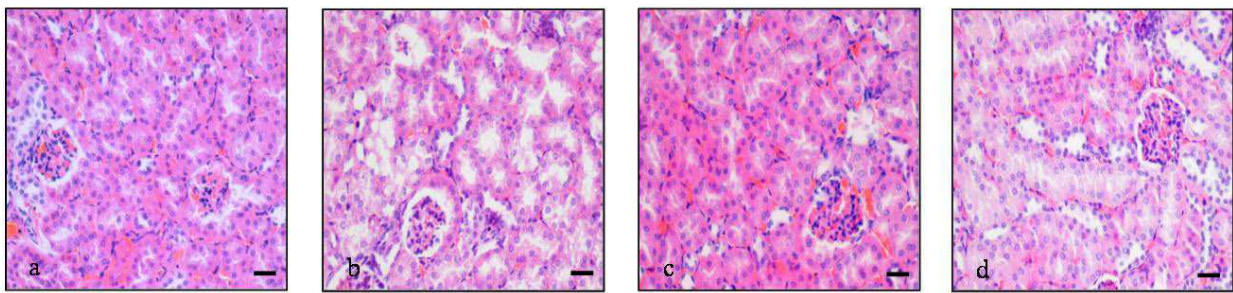


Fig. 8a-d: Valutazione morfologica di sezioni istologiche di rene analizzate con la colorazione ematossilina-eosina. Le microfotografie mostrano i seguenti gruppi sperimentali: (a) lean; (b) lean alimentati con una dieta high fat (HF); (c) lean alimentati con una dieta high fat e trattati con acido epossiecosatrienoico (HF EET) e (d) lean alimentati con una dieta high fat e co-trattati con acido epossiecosatrienoico e N-metilsulfosil-6-(2-propirgilossifenil)esanamide (HF EET MSPPOH).

4.3.4 Analisi d'immunofluorescenza

4.3.4.1 Emeossigenasi-1

Lo studio immunoistochimico di HO-1 evidenzia, a livello del tessuto adiposo (segnale verde), dell'aorta (segnale verde) e del rene (segnale rosso), una significativa diminuzione dei livelli di espressione di tale enzima nei topi HF rispetto ai topi di controllo (**Fig. 9a,b**). Il trattamento con EET mostra un significativo aumento di tale espressione rispetto ai topi HF non trattati; l'espressione viene riportata a livelli paragonabili a quelli dei topi HF nel gruppo di topi co-trattati con EET e MSPPOH (**Fig. 9c,d**).

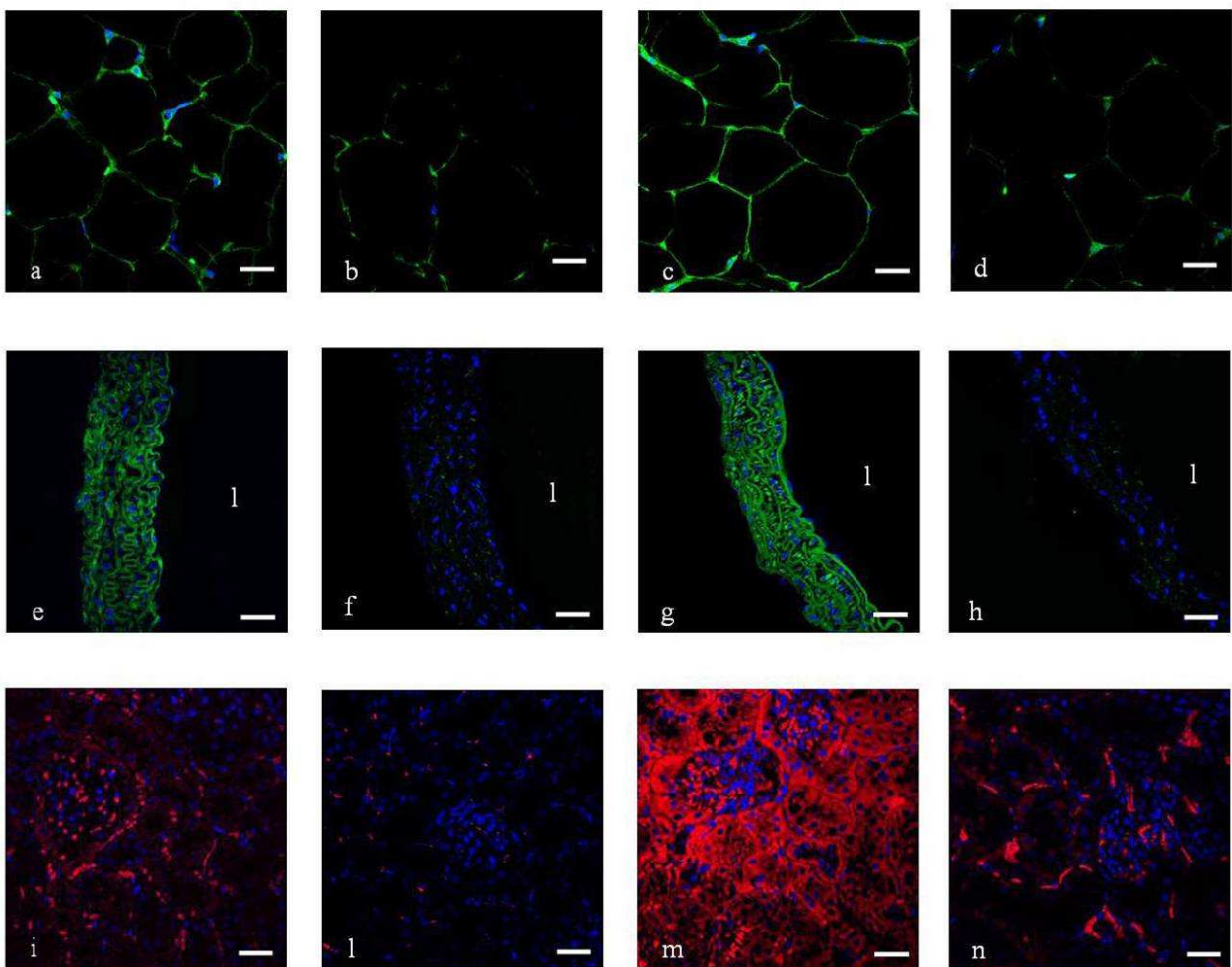


Fig. 9a-n: Valutazione morfo-funzionale attraverso analisi d'immunofluorescenza per HO-1 di sezioni di tessuto adiposo sottocutaneo (**a-d**), aorta (**e-h**) e rene (**i-n**). Le microfotografie mostrano i seguenti gruppi sperimentali: lean (**a, e, i**), lean alimentati con una dieta high fat (HF) (**b, f, l**); lean alimentati con una dieta high fat e trattati con acido epossiecosatrienoico (HF EET) (**c, g, m**) e lean alimentati con una dieta high fat e co-trattati con acido epossiecosatrienoico e N-metilsulfosil-6-(2-propirgilossifenil)esanamide (HF EET MSPPOH) (**d, h, n**). (l) indica il lume dell'aorta.

4.3.4.2 AMPK α_1 /pAMPK α_1

L'immunofluorescenza in double staining per AMPK α_1 /pAMPK α_1 mostra, a livello del tessuto adiposo, dell'aorta e del rene, un'espressione costante di AMPK α_1 , forma inattiva della proteina (segnale in verde), in tutti 4 i gruppi sperimentali. L'espressione di pAMPK α_1 , forma attivata per fosforilazione (segnale in rosso), invece diminuisce nei topi HF rispetto al gruppo di controllo. Si evidenzia inoltre un significativo aumento dell'espressione nei topi trattati con EET; il co-trattamento EET-MSPPOH induce invece inibizione di tale espressione (**Fig. 10**).

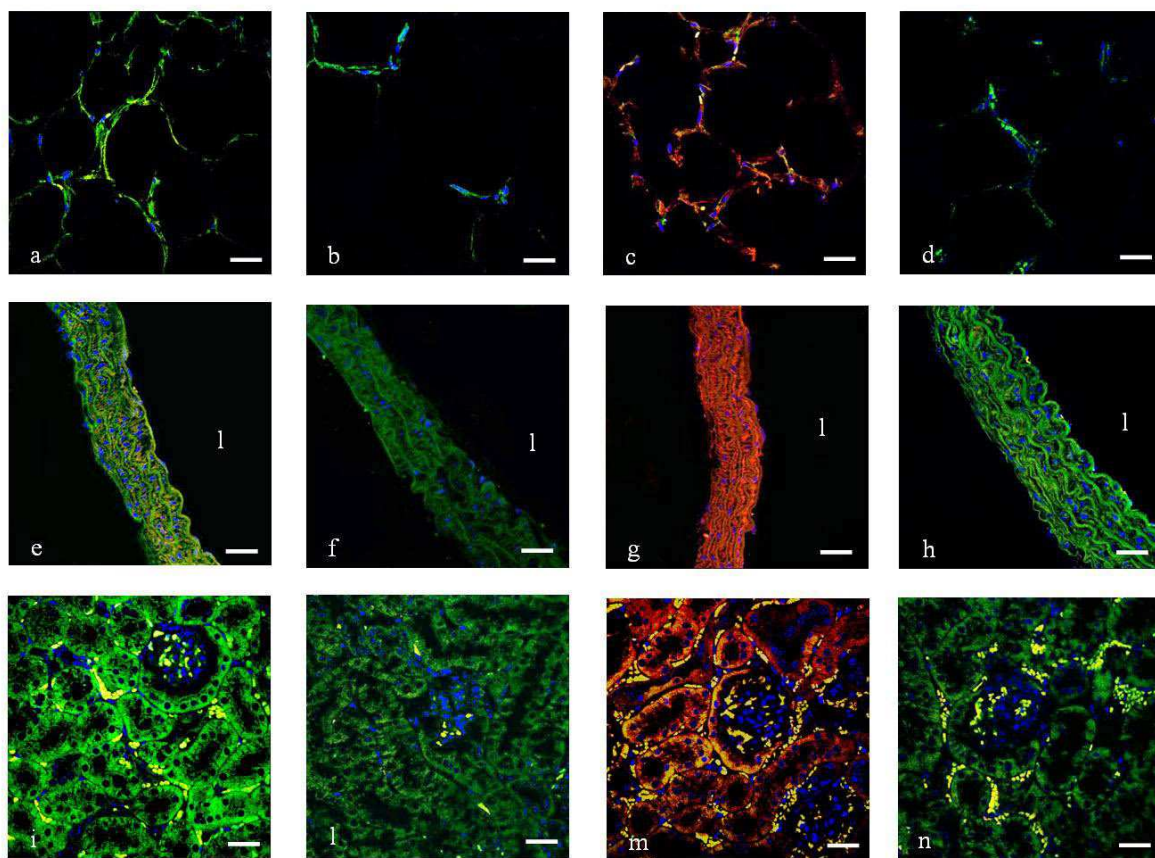


Fig. 10a-n: Valutazione morfo-funzionale attraverso analisi d'immunofluorescenza per AMPK α_1 e pAMPK α_1 di sezioni di tessuto adiposo sottocutaneo (**a-d**), aorta (**e-h**) e rene (**i-n**). Le microfotografie mostrano i seguenti gruppi sperimentali: lean (**a, e, i**); lean alimentati con una dieta high fat (HF) (**b, f, j**); lean alimentati con una dieta high fat e trattati con acido epossiecosatrienoico (HF EET) (**c, g, m**) e lean alimentati con una dieta high fat e co-trattati con acido epossiecosatrienoico e N-metilsulfosil-6-(2-propirgilossifenil)esanamide (HF EET MSPPOH) (**d, h, n**). (l) indica il lume dell'aorta.

4.3.4.3 LKB1/pLKB1

L'immunofluorescenza in double staining per LKB1/pLKB1 evidenzia, per il tessuto adiposo, per l'aorta e per il rene, un'espressione costante di LKB1, forma inattiva della proteina (segnale in verde), in tutti 4 i gruppi sperimentali ed un significativo aumento dell'espressione di pLKB1, forma attivata per fosforilazione (segnale in rosso), nei topi HF trattati con EET, rispetto ai topi HF, che presentano livelli molto bassi di espressione, paragonabile al gruppo di topi sottoposti a co-trattamento EET-MSPPOH, ma molto inferiori rispetto ai topi lean di controllo (**Fig. 11**).

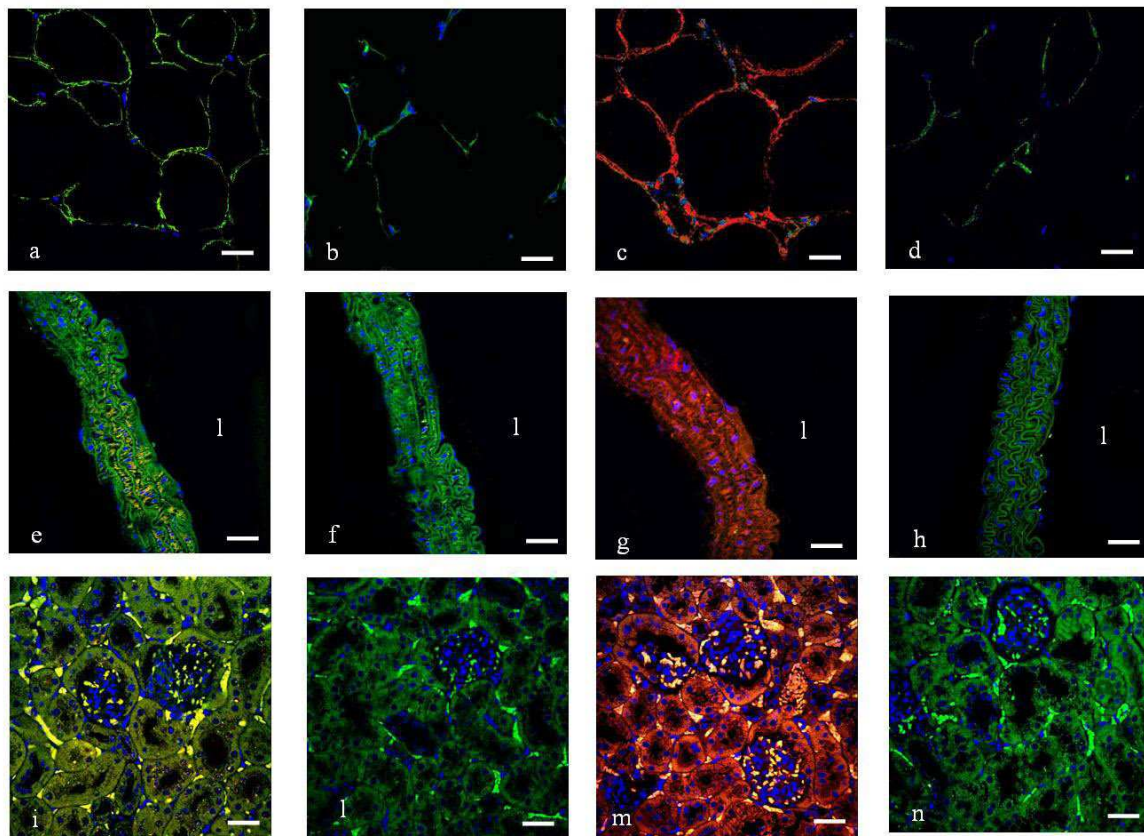


Fig. 11a-n: Valutazione morfo-funzionale attraverso analisi d'immunofluorescenza per Akt e pAkt di sezioni di tessuto adiposo sottocutaneo (**a-d**), aorta (**e-h**) e rene (**i-n**). Le microfotografie mostrano i seguenti gruppi sperimentali: lean (**a, e, i**); lean alimentati con una dieta high fat (HF) (**b, f, l**); lean alimentati con una dieta high fat e trattati con acido epossiecosatrienoico (HF EET) (**c, g, m**) e lean alimentati con una dieta high fat e co-trattati con acido epossiecosatrienoico e N-metilsulfosil-6-(2-propirgilossifenil)esanamide (HF EET MSPPOH) (**d, h, n**). (l) indica il lume dell'aorta.

4.3.4.4 Akt/pAkt

L'immunofluorescenza in double staining per Akt/pAkt mostra per il tessuto adiposo, per l'aorta e per il rene, un'espressione costante di Akt, forma inattiva della proteina (segnale in verde), in tutti 4 i gruppi sperimentali. L'espressione di pAkt, forma attivata per fosforilazione (segnale in rosso), invece risulta quasi nulla nel topi HF, al contrario dei topi HF trattati con EET che mostrano invece un significativo aumento di tale espressione, rispetto ai topi di controllo. Si osservano invece livelli di espressione paragonabili a quelli dei topi HF nel gruppo sperimentale co-trattato con EET e MSPPOH (**Fig. 12**).

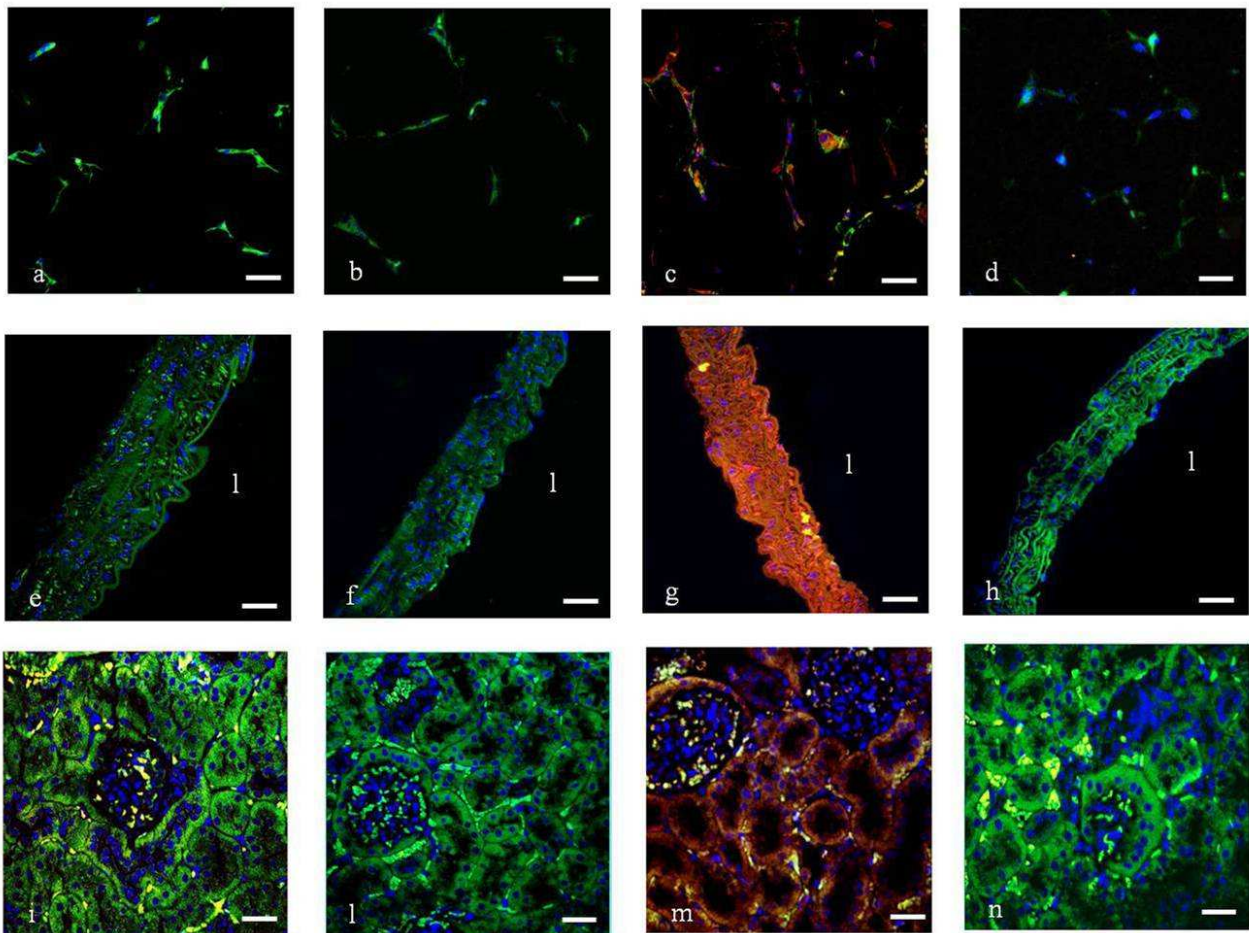


Fig. 12a-n: Valutazione morfo-funzionale attraverso analisi d'immunofluorescenza per Akt e pAkt di sezioni di tessuto adiposo sottocutaneo (**a-d**), aorta (**e-h**) e rene (**i-n**). Le microfotografie mostrano i seguenti gruppi sperimentali: lean (**a, e, i**); lean alimentati con una dieta high fat (HF) (**b, f, j**); lean alimentati con una dieta high fat e trattati con acido epossiecoisatrienoico (HF EET) (**c, g, m**) e lean alimentati con una dieta high fat e co-trattati con acido epossiecoisatrienoico e N-metilsulfosil-6-(2-propirgilossifenil)esanimide (HF EET MSPPOH) (**d, h, n**). (l) indica il lume dell'aorta.

In particolare, l'espressione di tali proteine è localizzata per il tessuto adiposo a livello delle membrane e, in parte, a livello del nucleo degli adipociti sottocutanei. Per l'aorta si osserva un'immunopositività a livello del citoplasma e, in parte, del nucleo delle cellule endoteliali della tonaca intima e delle cellule muscolari lisce della tonaca media; non si osserva al contrario alcuna espressione a livello della tonaca avventizia di nessun gruppo sperimentale studiato. A livello renale si osserva l'espressione localizzata nel citoplasma e, in parte, nel nucleo delle cellule glomerulari e dei tubuli, distali e prossimali, della zona corticale.

4.3.4.5 eNOS

L'immunofluorescenza per eNOS effettuata a livello aortico evidenzia una ridotta espressione di tale enzima nei topi HF rispetto ai topi di controllo; tale espressione ritorna a livelli paragonabili al controllo nel gruppo di topi trattati con EET, mentre il co-trattamento EET-MSPPOH mostra bassi livelli d'espressione, paragonabili ai topi HF (**Fig. 13**).

In particolare, l'espressione di eNOS si osserva solo a livello del citoplasma delle cellule endoteliali della tonaca intima; nessun segnale è rilevabile sia a livello della tonaca media che avventizia di nessun gruppo sperimentale studiato.

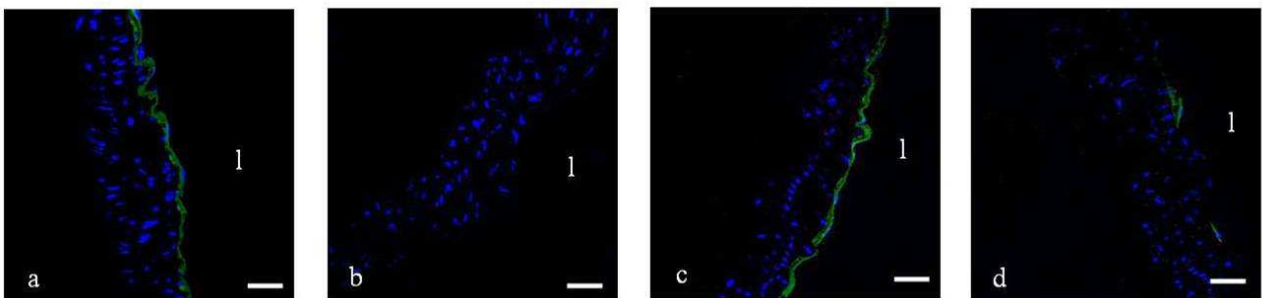


Fig. 13a-d: Valutazione morfo-funzionale attraverso analisi d'immunofluorescenza per eNOS di sezioni di aorta (**a-d**). Le microfotografie mostrano i seguenti gruppi sperimentali: lean (**a, e, i**); lean alimentati con una dieta high fat (HF) (**b, f, l**); lean alimentati con una dieta high fat e trattati con acido epossicosatrienoico (HF EET) (**c, g, m**) e lean alimentati con una dieta high fat e co-trattati con acido epossicosatrienoico e N-metilsulfosil-6-(2-propirgilossifenil)esanamide (HF EET MSPPOH) (**d, h, n**). (l) indica il lume dell'aorta.

Tali risultati sono riassunti mediante l'analisi semiquantitativa mostrata in **Tabella II**.

	Lean	HF	HF EET	HF EET MSPPOH
HO-1	++	-	+++	-/+
Akt	++	+	++	+
pAkt	+	-	+++	-
AMPK α 1	++	+	++	+
pAMPK α 1	+	-	+++	-
LKB1	++	+	++	+
pLKB1	+	-	+++	-

Tabella III: La tabella riassume i dati dell'analisi semiquantitativa ottenuti attraverso la metodica dell'immunofluorescenzae.

4.4 Analisi di Western Blotting

I risultati ottenuti attraverso la metodica dell'immunofluorescenza sono stati confermati dall'analisi mediante Western Blotting, sia per il tessuto adiposo, sia per l'aorta e sia per il rene (**Fig. 14, 15,16**).

Solo per il tessuto adiposo, è stata effettuata l'analisi mediante Western Blotting anche per l'adiponectina. Tale analisi ha evidenziato una notevole riduzione dell'espressione di adiponectina a livello del tessuto adiposo dei topi HF; il trattamento con EET ha invece indotto un aumento dell'espressione dell'adipochina, raggiungendo valori paragonabili al gruppo di controllo. Il co-trattamento con EET-MSPPOH, invece, annulla quasi completamente tale aumento di espressione (**Fig. 16**).

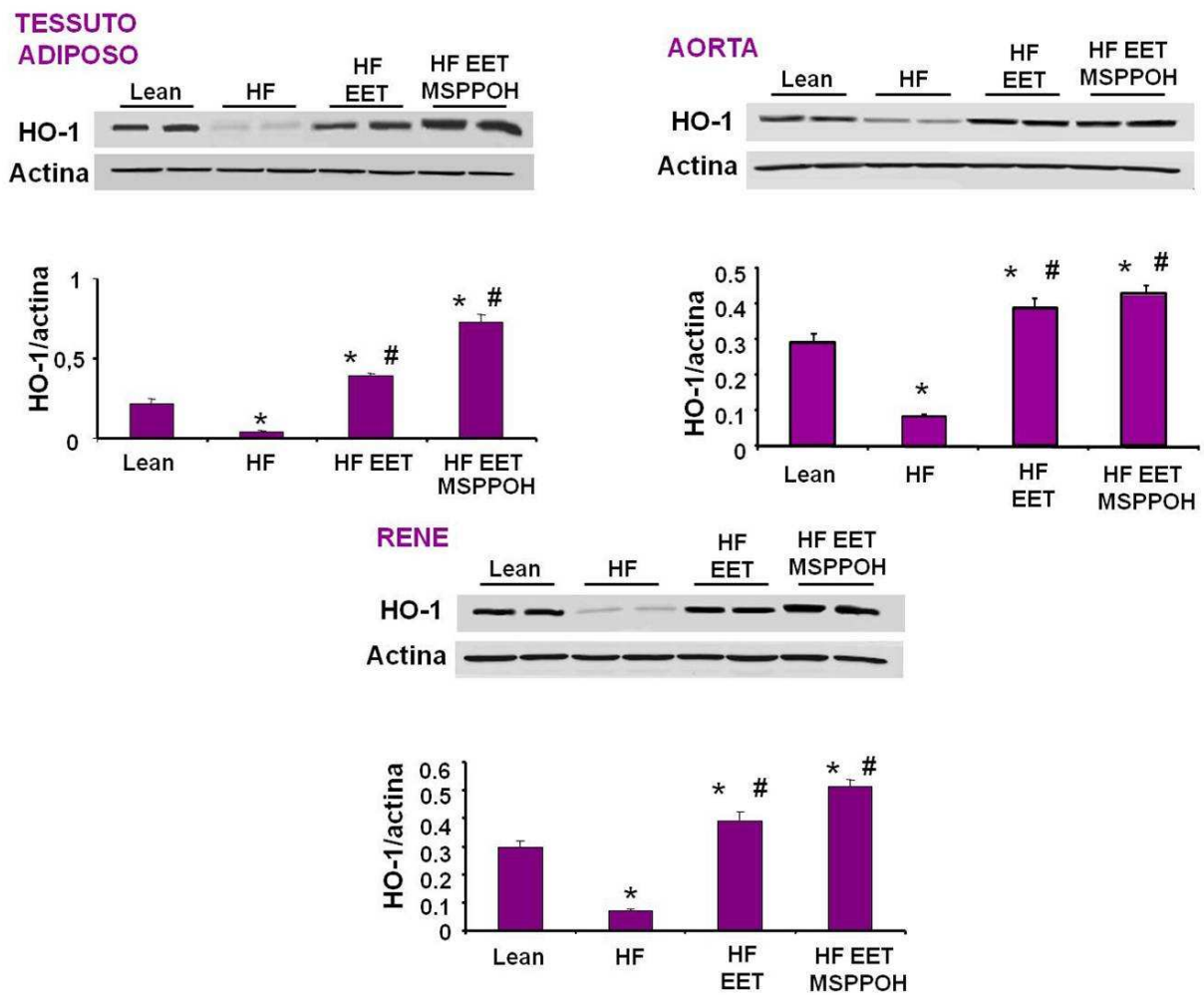


Fig. 14: Analisi di Western Blotting per HO-1. I grafici mostrano l'analisi quantitativa. * $p < 0.05$ vs lean; # $p < 0.05$ vs HF; + $p < 0.05$ vs HF EET.

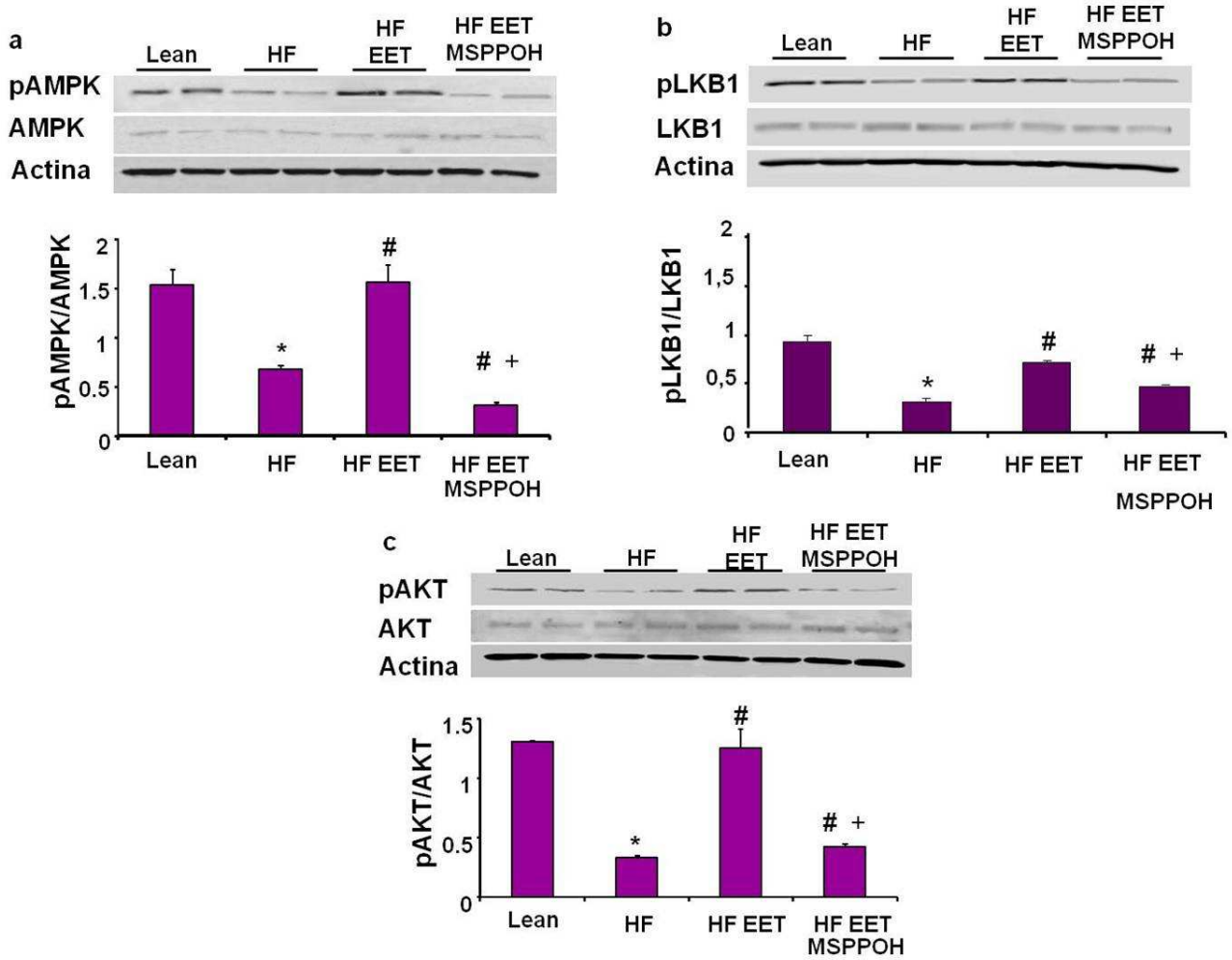


Fig. 15: Analisi attraverso Western Blotting per AMPK α_1 /pAMPK α_1 , LKB1/pLKB1 ed Akt/pAkt. I grafici mostrano l'analisi quantitativa. * $p < 0.05$ vs lean; # $p < 0.05$ vs HF; + $p < 0.05$ vs HF EET.

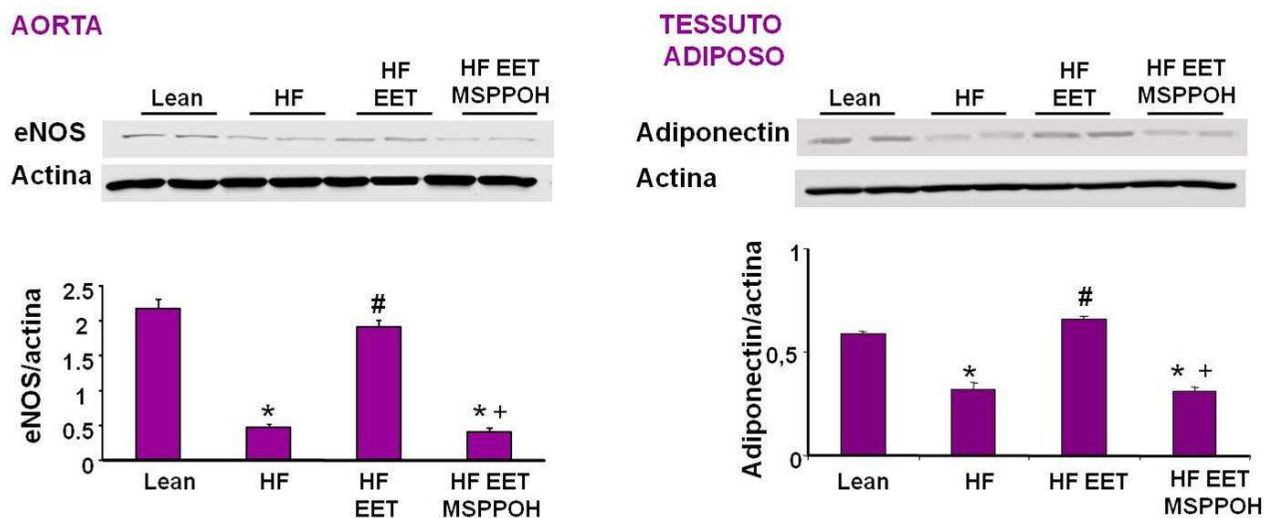


Fig. 16: Analisi di Western Blotting per eNOS ed adiponectina. I grafici mostrano l'analisi quantitativa. * $p < 0.05$ vs lean; # $p < 0.05$ vs HF; + $p < 0.05$ vs HF EET.

5. DISCUSSIONE

I risultati di questo studio confermano chiaramente che il tessuto adiposo è strettamente implicato nella patogenesi dell'obesità. Dai nostri dati infatti emerge che i topi alimentati con una dieta high fat (HF) hanno un peso corporeo maggiore rispetto ai topi di controllo e che l'accumulo di grasso sottocutaneo è significativamente maggiore. Come noto, quando l'equilibrio energetico diviene positivo, come nel caso della dieta HF, il tessuto adiposo aumenta la sua componente di adipociti bianchi che, dopo aver raggiunto il volume critico (ipertrofia), vanno incontro ad iperplasia (Achike e coll., 2011; Cinti, 2005; Daquinag e coll., 2011; DiGirolamo e coll., 1998; Spalding e coll., 2008). Inoltre, l'aumento dell'accumulo di grasso sottocutaneo è strettamente correlato all'insorgenza di uno stato infiammatorio cronico: nei topi HF abbiamo infatti osservato un aumento dei livelli di TNF- α ed IL-6, sintetizzati prevalentemente dai macrofagi infiltrati nel tessuto adiposo (Zoccali, 2009), ed una diminuzione dei livelli di adiponectina nei topi HF. Abbiamo così sottolineato e confermato che il tessuto adiposo, attraverso la secrezione di adipochine e citochine, contribuisce alla formazione di uno stato infiammatorio che porta, di conseguenza, al calo delle difese anti-ossidanti (Lehr e coll., 2011). E' interessante notare inoltre che l'alterato equilibrio della secrezione di adipochine da parte del tessuto adiposo è strettamente correlata all'insorgenza di disfunzioni cardiovascolari e renali. Abbiamo infatti confermato che l'accumulo di tessuto adiposo bianco, che si riscontra durante l'obesità, induce disfunzioni anche a livello aortico, quali alterazioni della citoarchitettura vascolare, distacco delle cellule endoteliali ed ipertrofia delle cellule muscolari lisce ed a livello renale, quali costrizione glomerulare associata ad un aumento dello spazio periglomerulare ed alla dilatazione dei tubuli prossimali.

L'adiponectina svolge un importante ruolo protettivo a livello endoteliale: aumenta l'espressione di eNOS e quindi la biodisponibilità di NO, regola la funzionalità cellulare attraverso attivazione di pAMPK e pAkt (Nicolai e coll., 2009; Ouchi e coll. 2004) che a loro volta aumentano l'attivazione di eNOS, diminuisce l'espressione dei fattori pro-ossidanti e pro-

infiammatori ed inibenti eNOS, ad esempio TNF- α , ristabilendo/migliorando le funzioni vascolari (Nicolai e coll., 2009). L'adiponectina può migliorare anche le funzioni renali (Sharma e coll., 2009; Sodhi e coll., 2009), diminuendo la pressione sanguigna, il tasso di filtrazione glomerulare e gli effetti citotossici delle citochine pro-infiammatorie. Il coinvolgimento delle adipochine nella patogenesi dell'obesità ed il fatto che i livelli serici di adiponectina calano notevolmente durante lo sviluppo di tale patologia potrebbe fornire una possibile ipotesi per il loro utilizzo come biomarkers diagnostici e terapeutici nel trattamento dell'obesità.

Riassumendo brevemente, tali osservazioni risultano interessanti dato che, mentre è nota la funzione di riserva energetica del tessuto adiposo, il suo ruolo come organo endocrino è di recente scoperta e necessita quindi ulteriori studi al fine di approfondire i meccanismi implicati in tale funzione. Non è ancora noto, infatti, se gli adipociti di piccole dimensioni secernano maggiori livelli di adiponectina o se, viceversa, elevati livelli di adiponectina inducano la riduzione delle dimensioni degli adipociti: di conseguenza, tale relazione deve essere ulteriormente investigata.

Dopo aver delineato un quadro generale del ruolo svolto dal tessuto adiposo nella patogenesi dell'obesità ed al fine di chiarire al meglio tale meccanismo patogenetico, nel corso del nostro studio ci è sembrato interessante analizzare il suo ruolo in relazione all'isoforma inducibile dell'emeossigenasi (HO-1), partendo dal presupposto che tale proteina, accanto alle sue proprietà anti-ossidanti ed anti-infiammatorie, è anche implicata nell'attivazione di alcune delle chinasi coinvolte nella regolazione dell'equilibrio energetico. In particolare, abbiamo valutato la relazione tra HO-1 e le chinasi AMPK α _I, LKB1 ed Akt e la funzione di HO-1 nel mantenimento dell'equilibrio tra vasocostrizione e vasodilatazione, equilibrio che subisce alterazioni durante l'obesità, determinando quindi disfunzioni vascolari e renali.

È interessante innanzitutto notare che sia l'analisi immunostochimica, che l'analisi di Western Blotting hanno evidenziato come la dieta HF diminuisca quasi completamente l'enzima HO-1, a

livello del tessuto adiposo, ma anche dell'aorta e del rene determinando di conseguenza una riduzione della protezione contro stress ossidativo ed infiammazione e quindi insorgenza di quelle disfunzioni cardiovascolari e renali correlate all'obesità.

Abbiamo osservato anche che l'induzione di HO-1, attraverso trattamento con EET, determina importanti cambiamenti morfologici, "riprogrammando" gli adipociti e determinando riduzione sia dell'iperplasia sia dell'ipertrofia degli adipociti stessi, che quindi evidenziano dimensioni ridotte rispetto a quelle osservate nei topi HF non trattati. L'induzione di HO-1 diminuisce l'accumulo adiposo, risultando quindi in una diminuzione sia del volume di tessuto adiposo che del peso corporeo.

Il pathway attraverso cui avviene l'adattamento metabolico in seguito a trattamento con EET, indipendentemente dal food intake, è ancora sconosciuto. La riduzione di peso corporeo e la diminuzione del deposito adiposo suggeriscono però che il trattamento con EET degli animali sottoposti a dieta HF induca l'organismo ad utilizzare preferenzialmente gli acidi grassi come substrato d'energia e diminuire la sintesi lipidica. Gli effetti simil-terapeutici dell'induzione di HO-1 sembrano correlati al meccanismo che coinvolge l'adiponectina e le chinasi AMPK, LKB1 ed Akt. Nel nostro studio, abbiamo infatti osservato che l'upregolazione di HO-1 è associata ad un aumento dell'espressione da parte degli adipociti di pAMPK α 1, pLKB1 e pAkt, forme attive di tali chinasi; tale espressione si è osservata anche a livello vascolare e renale. Numerosi dati confermano che pAMPK, partecipi alla regolazione dell'equilibrio energetico sia a livello cellulare sia sistemico (Nicolai e coll., 2009; Percy e coll., 2009). Risulta quindi di particolare importanza la nostra ipotesi secondo la quale l'attivazione di AMPK, LKB1 ed Akt venga ridotta durante l'obesità e secondo cui HO-1, indotta dal trattamento con EET, è in grado di indurre invece l'attivazione, diminuendo, di conseguenza, la lipogenesi ed aumentando il consumo degli acidi grassi. Un altro effetto benefico del trattamento con EET sembra essere legato in modo particolare sia alla capacità di incrementare l'espressione e la funzionalità di eNOS, sia di

aumentare i livelli di NO, favorendo la sopravvivenza delle cellule endoteliali in risposta a stress ossidativo ed al progredire del processo infiammatorio (Pae e coll., 2010; Zhu e coll., 2008). E' inoltre noto che una prolungata mancanza degli effetti protettivi di NO sull'endotelio, dovuta ad una riduzione della sua biodisponibilità, conduce a squilibrio tra vasodilatazione e vasocostrizione tipico delle fasi iniziali di numerose patologie cardiovascolari (Kalani, 2008) e renali (Wilcox, 2002). I risultati illustrati in questo studio evidenziano una significativa riduzione dei livelli di eNOS nei topi HF, conseguente anche al distacco endoteliale, rispetto ai topi di controllo; tale espressione ritorna a livelli paragonabili al controllo nel gruppo di topi trattato con EET.

Come emerge da quanto spiegato in precedenza, grazie all'azione di pAMPK, pLKB1 e pAkt, HO-1 svolge anche un ruolo fondamentale nel prevenire/attenuare il danno endoteliale e modulare il tono vascolare, riducendo l'ipertensione conseguente all'obesità.

I risultati ottenuti in questo studio hanno permesso di confermare gli effetti negativi di una dieta HF e sottolineare come il tessuto adiposo, attraverso la sua funzione endocrina, può rappresentare un elemento determinante nella patogenesi dell'obesità e delle disfunzioni vascolari e renali ad essa associate. I dati presentati in questo studio chiariscono, inoltre, il ruolo di HO-1, confermando il suo effetto anti-ossidante ed anti-infiammatorio, ma anche dimostrando l'importanza del suo crosstalk con alcuni sensori della regolazione dell'equilibrio energetico a livello cellulare e dell'intero organismo. In conclusione, anche se ulteriori studi saranno sicuramente necessari per approfondire i processi biologici che si nascondono dietro all'azione di EET contro la patogenesi dell'obesità, EET offre una promettente possibilità per il trattamento dell'obesità.

I probabili meccanismi biologici attraverso cui EET determina effetti simil-terapeutici per questa patologia sono riassunti in **Fig.5**.

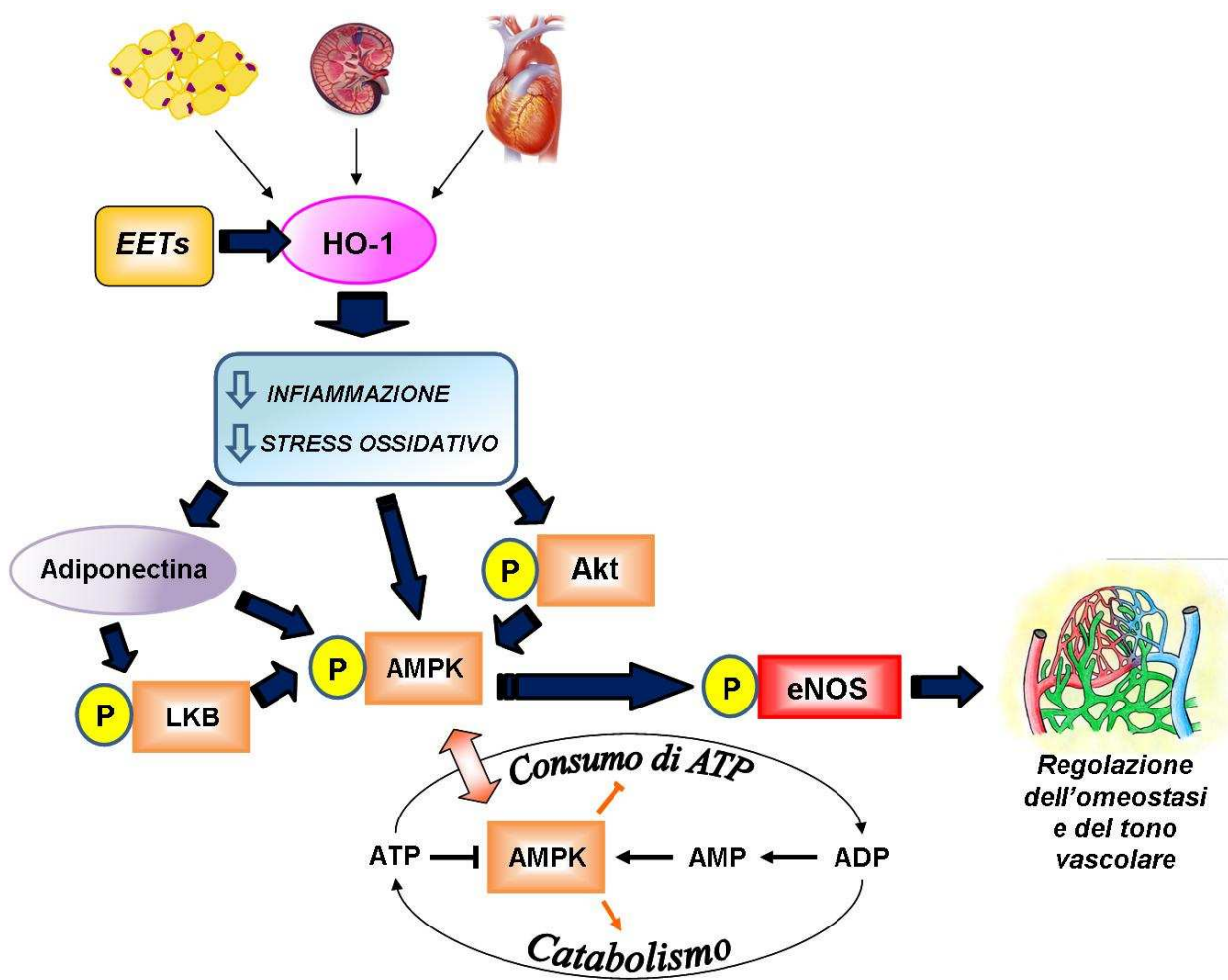


Fig.17: Schema dei probabili meccanismi biologici attraverso cui EET determina effetti anti-obesità.

6. RINGRAZIAMENTI

Desidero ringraziare con profonda riconoscenza la Prof.ssa Rita Rezzani per gli insegnamenti ricevuti e per l'appoggio e la comprensione dimostratemi durante questo studio.

Ringrazio il Prof. Luigi F. Rodella per la disponibilità e cortesia avute nei miei confronti.

Grazie al Prof. Nader G. Abraham per la Sua disponibilità e gentilezza e per essere stato un forte punto di riferimento in ambito professionale durante lo stage presso Department of Physiology and Pharmacology, University of Toledo, Ohio, US.

Ringrazio tutto il personale della Sezione di Anatomia Umana per aver contribuito alla mia formazione professionale e personale.

Grazie di cuore a Claudia per non avermi mai negato un aiuto e a Eleonora per gli anni trascorsi insieme, per la solidarietà e la costante disponibilità dimostratami.

Un grazie davvero speciale e sincero a Sara L., Ornella, Federica, Valentina e Sara M. per avermi supportato, ma soprattutto sopportato, durante questi anni.

Desidero infine ringraziare i miei genitori, mio fratello, mia nonna e Domenico per aver sempre avuto fiducia in me, per la pazienza, il sostegno e l'amore dimostratomi in qualsiasi momento.

Grazie di cuore
Gaia

7. BIBLIOGRAFIA

Abraham NG, Brunner EJ, Eriksson JW, Robertson RP. Metabolic syndrome: psychosocial, neuroendocrine, and classical risk factors in type 2 diabetes. *Ann N Y Acad Sci.* 2007;1113:256-75.

Abraham NG, Kappas A. Heme oxygenase and the cardiovascular-renal system. *Free Radic Biol Med.* 2005;39(1):1-25.

Abraham NG, Kappas A. Pharmacological and clinical aspects of heme oxygenase. *Pharmacol Rev.* 2008 Mar;60(1):79-127. Epub 2008 Mar 6. Review. Erratum in: *Pharmacol Rev.* 2008;60(2):242.

Abraham NG, Rezzani R, Rodella L, Kruger A, Taller D, Li Volti G, Goodman AI, Kappas A. Overexpression of human heme oxygenase-1 attenuates endothelial cell sloughing in experimental diabetes. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2004;287(6):H2468-77.

Abraham NG, Tsenovoy PL, McClung J, Drummond GS. Heme oxygenase: a target gene for anti-diabetic and obesity. *Curr Pharm Des.* 2008;14(5):412-21.

Achike FI, To NH, Wang H, Kwan CY. Obesity, metabolic syndrome, adipocytes and vascular function: A holistic viewpoint. *Clin Exp Pharmacol Physiol.* 2011;38(1):1-10.

Aft RL, Mueller GC. Hemin-mediated DNA strand scission. *J Biol Chem.* 1983;258: 12069-12072.

Agil A, Rosado I, Ruiz R, Figueroa A, Zen N, Fernández-Vázquez G. Melatonin improves glucose homeostasis in young Zucker diabetic fatty rats. *J Pineal Res.* [Epub ahead of print].

Ahima RS, Flier JS. Adipose tissue as an endocrine organ. *Trends Endocrinol Metab.* 2000;11(8):327-32.

Andersson U, Filipsson K, Abbott CR, Woods A, Smith K, Bloom SR, Carling D, Small CJ. AMP-activated protein kinase plays a role in the control of food intake. *J Biol Chem.* 2004;279(13):12005-8.

Arcaro G, Zamboni M, Rossi L, Turcato E, Covi G, Armellini F, Bosello O, Lechi A. Body fat distribution predicts the degree of endothelial dysfunction in uncomplicated obesity. *Int J Obes Relat Metab Disord.* 1999;23(9):936-42.

Axelsson J. Obesity in chronic kidney disease: good or bad? *Blood Purif.* 2008;26(1):23-9.

Balla G, Jacob HS, Balla J, Rosenberg M, Nath K, Apple F, Eaton JW, Vercellotti GM. Ferritin: cytoprotective antioxidant strategem of endothelium. *J Biol Chem.* 1995;267: 18148-18153.

Barton M. Obesity and aging: determinants of endothelial cell dysfunction and atherosclerosis. *Pflugers Arch.* 2010 Oct;460(5):825-37.

Beri R, Chandra R. Chemistry and biology of heme. Effect of metal salts, organometals, and metalloporphyrins on heme synthesis and catabolism, with special reference to clinical implications and interactions with cytochrome P-450. *Drug Metab Rev.* 1993;25: 49-152.

Bomback AS, Klemmer PJ. Renal injury in extreme obesity: the important role of aldosterone. *Kidney Int.* 2008;74(9):1216; author reply 1216-7.

Brand-Schieber E, Falck JF, Schwartzman M. Selective inhibition of arachidonic acid epoxidation in vivo. *J Physiol Pharmacol.* 2000;51(4 Pt 1):655-72.

Brook RD, Bard RL, Rubenfire M, Ridker PM, Rajagopalan S. Usefulness of visceral obesity (waist/hip ratio) in predicting vascular endothelial function in healthy overweight adults. *Am J Cardiol.* 2001;88(11):1264-9.

Burgess A, Li M, Vanella L, Kim DH, Rezzani R, Rodella L, Sodhi K, Canestraro M, Martasek P, Peterson SJ, Kappas A, Abraham NG. Adipocyte heme oxygenase-1 induction attenuates metabolic syndrome in both male and female obese mice. *Hypertension.* 2010;56(6):1124-30.

Burgess A, Vanella L, Bellner L, Schwartzman ML, Abraham NG. Epoxyeicosatrienoic acids and heme oxygenase-1 interaction attenuates diabetes and metabolic syndrome complications. *Prostaglandins Other Lipid Mediat.* 2011. [Epub ahead of print].

Chagnac A, Herman M, Zingerman B, Erman A, Rozen-Zvi B, Hirsh J, Gafer U. Obesity-induced glomerular hyperfiltration: its involvement in the pathogenesis of tubular sodium reabsorption. *Nephrol Dial Transplant*. 2008;23(12):3946-52.

Chau MD, Gao J, Yang Q, Wu Z, Gromada J. Fibroblast growth factor 21 regulates energy metabolism by activating the AMPK-SIRT1-PGC-1 α pathway. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2010;107(28):12553-8.

Choi AM and Alam J. Heme oxygenase-1: function, regulation, and implication of a novel stress-inducible protein in oxidant-induced lung injury. *Am J Respir Cell Mol Biol*. 1996;15:9-19.

Cinti S. The adipose organ. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids*. 2005;73(1):9-15.

Collins S, Daniel KW, Petro AE, Surwit RS. Strain-specific response to beta 3-adrenergic receptor agonist treatment of diet-induced obesity in mice. *Endocrinology*. 1997;138(1):405-13.

Daquinag AC, Zhang Y, Kolonin MG. Vascular targeting of adipose tissue as an anti-obesity approach. *Trends Pharmacol Sci*. 2011;32(5):300-7.

Di Noia MA, Van Driesche S, Palmieri F, Yang LM, Quan S, Goodman AI, Abraham NG. Heme oxygenase-1 enhances renal mitochondrial transport carriers and cytochrome C oxidase activity in experimental diabetes. *J Biol Chem*. 2006;281(23):15687-93.

DiGirolamo M, Fine JB, Tagra K, Rossmanith R. Qualitative regional differences in adipose tissue growth and cellularity in male Wistar rats fed ad libitum. *Am J Physiol*. 1998;274(5 Pt 2):R1460-7.

Durante W, Schafer AI. Carbon monoxide and vascular cell function (review). *Int J Mol Med*. 1998;2(3):255-62.

Eknoyan G. Adolphe Quetelet (1796-1874)--the average man and indices of obesity. *Nephrol Dial Transplant*. 2008;23(1):47-51.

Estall JL, Ruas JL, Choi CS, Laznik D, Badman M, Maratos-Flier E, Shulman GI, Spiegelman BM. PGC-1 α negatively regulates hepatic FGF21 expression by modulating the heme/Rev-Erb(α) axis. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2009;106(52):22510-5.

Ferris CD, Jaffrey SR, Sawa A, Takahashi M, Brady SD, Barrow RK, Tysoe SA, Wolosker H, Barañano DE, Doré S, Poss KD, Snyder SH. Haem oxygenase-1 prevents cell death by regulating cellular iron. *Nat Cell Biol*. 1999;1:152-157.

Fisslthaler B, Fleming I. Activation and signaling by the AMP-activated protein kinase in endothelial cells. *Circ Res*. 2009;105(2):114-27.

Fleming I, Michaelis UR, Bredenkötter D, Fisslthaler B, Dehghani F, Brandes RP, Busse R. Endothelium-derived hyperpolarizing factor synthase (Cytochrome P450 2C9) is a functionally significant source of reactive oxygen species in coronary arteries. *Circ Res*. 2001;88(1):44-51.

Fleming I. Cytochrome p450 and vascular homeostasis. *Circ Res*. 2001;89(9):753-62.

Friedman AN, Yu Z, Juliar BE, Nguyen JT, Strother M, Quinney SK, Li L, Inman M, Gomez G, Shihabi Z, Moe S. Independent influence of dietary protein on markers of kidney function and disease in obesity. *Kidney Int*. 2010;78(7):693-7.

Fulton D, Gratton JP, McCabe TJ, Fontana J, Fujio Y, Walsh K, Franke TF, Papapetropoulos A, Sessa WC. Regulation of endothelium-derived nitric oxide production by the protein kinase Akt. *Nature*. 1999;399(6736):597-601. Erratum in: *Nature* 1999;400(6746):792.

Ghorbani M, Claus TH, Himms-Hagen J. Hypertrophy of brown adipocytes in brown and white adipose tissues and reversal of diet-induced obesity in rats treated with a beta3-adrenoceptor agonist. *Biochem Pharmacol*. 1997;54(1):121-31.

Ghosh S, Sulistyoningrum DC, Glier MB, Verchere CB, Devlin AM. Altered Glutathione Homeostasis in Heart Augments Cardiac Lipotoxicity Associated with Diet-induced Obesity in Mice. *J Biol Chem*. 2011;286(49):42483-93.

Goldstein BJ, Scalia RG, Ma XL. Protective vascular and myocardial effects of adiponectin. *Nat Clin Pract Cardiovasc Med.* 2009;6(1):27-35.

Gonçalves Torres MR, Cardoso LG, de Abreu VG, Sanjuliani AF, Francischetti EA. Temporal relation between body mass index and renal function in individuals with hypertension and excess body weight. *Nutrition.* 2009;25(9):914-9.

Grassi G, Diez J. Obesity-related cardiac and vascular structural alterations: beyond blood pressure overload. *J Hypertens.* 2009;27(9):1750-2.

Griffin KA, Kramer H, Bidani AK. Adverse renal consequences of obesity. *Am J Physiol Renal Physiol.* 2008;294(4):F685-96.

Halberg N, Wernstedt-Asterholm I, Scherer PE. The adipocyte as an endocrine cell. *Endocrinol Metab Clin North Am.* 2008;37(3):753-68.

Hardie DG. Minireview: the AMP-activated protein kinase cascade: the key sensor of cellular energy status. *Endocrinology.* 2003;144(12):5179-83.

Hardie DG. The AMP-activated protein kinase pathway--new players upstream and downstream. *J Cell Sci.* 2004;117(Pt 23):5479-87.

He H, Podymow T, Zimpelmann J, Burns KD. NO inhibits Na⁺-K⁺-2Cl⁻ cotransport via a cytochrome P-450-dependent pathway in renal epithelial cells (MMDD₁). *Am J Physiol Renal Physiol.* 2003;284(6):F1235-44.

Hoebel BG, Steyrer E, Graier WF. Origin and function of epoxyeicosatrienoic acids in vascular endothelial cells: more than just endothelium-derived hyperpolarizing factor? *Clin Exp Pharmacol Physiol.* 1998;25(10):826-30.

Huang H, Morisseau C, Wang J, Yang T, Falck JR, Hammock BD, Wang MH. Increasing or stabilizing renal epoxyeicosatrienoic acid production attenuates abnormal renal function and hypertension in obese rats. *Am J Physiol Renal Physiol.* 2007;293(1):F342-9.

Huang HM, Liang YC, Cheng TH, Chen CH, Juan SH. Potential mechanism of blood vessel protection by resveratrol, a component of red wine. *Ann N Y Acad Sci.* 2005;1042:349-56.

Huang PL. Endothelial nitric oxide synthase and endothelial dysfunction. *Curr Hypertens Rep.* 2003;5(6):473-80.

Hunley TE, Ma LJ, Kon V. Scope and mechanisms of obesity-related renal disease. *Curr Opin Nephrol Hypertens.* 2010;19(3):227-34.

Inguaggiato P, Gonzalez-Michaca L, Croatt AJ, Haggard JJ, Alam J, Nath KA. Cellular overexpression of heme oxygenase-1 up-regulates p21 and confers resistance to apoptosis. *Kidney Int.* 2001;60(6):2181-91.

Iozzo P, Lautamaki R, Borra R, Lehto HR, Bucci M, Viljanen A, Parkka J, Lepomaki V, Maggio R, Parkkola R, Knuuti J, Nuutila P. Contribution of glucose tolerance and gender to cardiac adiposity. *J Clin Endocrinol Metab.* 2009;94(11):4472-82.

Iozzo P. Myocardial, perivascular, and epicardial fat. *Diabetes Care.* 2011;34 Suppl 2:S371-9.

Jiang JG, Chen RJ, Xiao B, Yang S, Wang JN, Wang Y, Cowart LA, Xiao X, Wang DW, Xia Y. Regulation of endothelial nitric-oxide synthase activity through phosphorylation in response to epoxyeicosatrienoic acids. *Prostaglandins Other Lipid Mediat.* 2007;82(1-4):162-74.

Kalani M. The importance of endothelin-1 for microvascular dysfunction in diabetes. *Vasc Health Risk Manag.* 2008;4(5):1061-8.

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

Kapturczak MH, Wasserfall C, Brusko T, Campbell-Thompson M, Ellis TM, Atkinson MA, Agarwal A. Heme oxygenase-1 modulates early inflammatory response: evidence from the heme oxygenase-1-deficient mouse. *Am J Pathol.* 2004;165: 1045-1053.

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

Keyse SM, Tyrrell RM. Heme oxygenase is the major 32-kDa stress protein induced in human skin fibroblasts by UVA radiation, hydrogen peroxide, and sodium arsenite. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1989;86(1):99-103.

Kim DH, Vanella L, Inoue K, Burgess A, Gotlinger K, Manthathi VL, Koduru SR, Zeldin DC, Falck JR, Schwartzman ML, Abraham NG. Epoxyeicosatrienoic acid agonist regulates human mesenchymal stem cell-derived adipocytes through activation of HO-1-pAKT signaling and a decrease in PPAR γ . *Stem Cells Dev.* 2010;19(12):1863-73.

Kirkby KA, Adin CA. Products of heme oxygenase and their potential therapeutic applications. *Am J Physiol Renal Physiol.* 2006;290(3):F563-71.

Kushida T, LiVolti G, Goodman AI, Abraham NG. TNF-alpha-mediated cell death is attenuated by retrovirus delivery of human heme oxygenase-1 gene into human microvessel endothelial cells. *Transplant Proc.* 2002;34:2973-2978.

Kusmic C, L'abbate A, Sambuceti G, Drummond G, Barsanti C, Matteucci M, Cao J, Piccolomini F, Cheng J, Abraham NG. Improved myocardial perfusion in chronic diabetic mice by the up-regulation of pLKB1 and AMPK signaling. *J Cell Biochem.* 2010;109(5):1033-44.

Laniado Schwartzman M, Abraham NG, Connors MS, Dunn MW, Levere RD, Kappas A. Heme oxygenase induction with attenuation of experimentally-induced corneal inflammation. *Biochem Pharmacol.* 1997;53:1069-1075.

Lean ME. Pathophysiology of obesity. *Proc Nutr Soc.* 2000;59(3):331-6.

Lee CD, Blair SN, Jackson AS. Cardiorespiratory fitness, body composition, and all-cause and cardiovascular disease mortality in men. *Am J Clin Nutr.* 1999;69(3):373-80.

Lehr S, Hartwig S, Lamers D, Famulla S, Mueller S, Hanisch FG, Cuvelier C, Ruige J, Eckardt K, Ouwens DM, Sell H, Eckel J. Identification and validation of novel adipokines released from primary human adipocytes. *Mol Cell Proteomics*. 2011; [Epub ahead of print].

Li C, Keaney JF Jr. AMP-activated protein kinase: a stress-responsive kinase with implications for cardiovascular disease. *Curr Opin Pharmacol*. 2010;10(2):111-5.

Li H, Förstermann U. Prevention of atherosclerosis by interference with the vascular nitric oxide system. *Curr Pharm*. 2009;15(27):3133-45.

Li M, Kim DH, Tsenovoy PL, Peterson SJ, Rezzani R, Rodella LF, Aronow WS, Ikehara S, Abraham NG. Treatment of obese diabetic mice with a heme oxygenase inducer reduces visceral and subcutaneous adiposity, increases adiponectin levels, and improves insulin sensitivity and glucose tolerance. *Diabetes*. 2008;57(6):1526-35.

Li M, Peterson S, Husney D, Inaba M, Guo K, Terada E, Morita T, Patil K, Kappas A, Ikehara S, Abraham NG. Interdiction of the diabetic state in NOD mice by sustained induction of heme oxygenase: possible role of carbon monoxide and bilirubin. *Antioxid Redox Signal*. 2007;9(7):855-63.

Li Volti, Seta F, Schwartzman ML, Nasjletti A, Abraham NG. Heme oxygenase attenuates angiotensin II-mediated increase in cyclooxygenase-2 activity in human femoral endothelial cells. *Hypertension*. 2003;41:715-719.

Lois K, Kumar S. Obesity and diabetes. *Endocrinol Nutr*. 2009 Dec;56 Suppl 4:38-42.

Lu T, VanRollins M, Lee HC. Stereospecific activation of cardiac ATP-sensitive K(+) channels by epoxyeicosatrienoic acids: a structural determinant study. *Mol Pharmacol*. 2002;62(5):1076-83.

Maines MD, Panahian N. The heme oxygenase system and cellular defense mechanisms. Do HO-1 and HO-2 have different functions? *Adv Exp Med Biol*. 2001;502: 249-272.

Maines MD. The heme oxygenase system: a regulator of second messenger gases. *Annu Rev Pharmacol Toxicol*. 1997;37:517-554.

Maines MD. The heme oxygenase system: a regulator of second messenger gases. *Annu Rev Pharmacol Toxicol.* 1997;37:517-54.

Maines MD. The heme oxygenase system: update 2005. *Antioxid Redox Signal.* 2005;7: 19761-1766.

Maric C, Hall JE. Obesity, metabolic syndrome and diabetic nephropathy. *Contrib Nephrol.* 2011;170:28-35.

McCoubrey WK Jr, Huang TJ, Maines MD. Isolation and characterization of cDNA from the rat brain that encodes hemoprotein heme oxygenase-3. *Eur J Biochem.* 1997;247:725-732.

Menzaghi C, Trischitta V, Doria A. Genetic influences of adiponectin on insulin resistance, type 2 diabetes, and cardiovascular disease. *Diabetes.* 2007;56(5):1198-209.

Meyers MR, Gokce N. Endothelial dysfunction in obesity: etiological role in atherosclerosis. *Curr Opin Endocrinol Diabetes Obes.* 2007;14(5):365-9.

Michaelis UR, Fisslthaler B, Medhora M, Harder D, Fleming I, Busse R. Cytochrome P450 2C9-derived epoxyeicosatrienoic acids induce angiogenesis via cross-talk with the epidermal growth factor receptor (EGFR). *FASEB J.* 2003;17(6):770-2.

Monteiro R, Azevedo I. Chronic inflammation in obesity and the metabolic syndrome. *Mediators Inflamm.* 2010;2010:1-10.

Morse D, Pischke SE, Zhou Z, Davis RJ, Flavell RA, Loop T, Ottebein SL, Otterbein LE, Choi AM. Suppression of inflammatory cytokine production by carbon monoxide involves the JNK pathway and AP-1. *J Biol Chem.* 2003;278:36993-36998.

Napoli C, Ignarro LJ. Nitric oxide and pathogenic mechanisms involved in the development of vascular diseases. *Arch Pharm Res.* 2009;32(8):1103-8.

Nath KA. Heme oxygenase-1: a provenance for cytoprotective pathways in the kidney and other tissues. *Kidney Int.* 2006;70(3):432-43.

Nicolai A, Li M, Kim DH, Peterson SJ, Vanella L, Positano V, Gastaldelli A, Rezzani R, Rodella LF, Drummond G, Kusmic C, L'Abbate A, Kappas A, Abraham NG. Heme oxygenase-1 induction remodels adipose tissue and improves insulin sensitivity in obesity-induced diabetic rats. *Hypertension.* 2009;53(3):508-15.

Nisoli E, Briscini L, Giordano A, Tonello C, Wiesbrock SM, Uysal KT, Cinti S, Carruba MO, Hotamisligil GS. Tumor necrosis factor alpha mediates apoptosis of brown adipocytes and defective brown adipocyte function in obesity. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2000;97(14):8033-8.

Node K, Ruan XL, Dai J, Yang SX, Graham L, Zeldin DC, Liao JK. Activation of Galpha s mediates induction of tissue-type plasminogen activator gene transcription by epoxyeicosatrienoic acids. *J Biol Chem.* 2001;276(19):15983-9.

Nomura I, Kato J, Kitamura K. Association between body mass index and chronic kidney disease: a population-based, cross-sectional study of a Japanese community. *Vasc Health Risk Manag.* 2009;5(1):315-20.

Ohta K, Yachie A. Development of vascular biology over the past 10 years: heme oxygenase-1 in cardiovascular homeostasis. *J Endovasc Ther.* 2004 Dec;11 Suppl2:II140-50.

Orci L, Cook WS, Ravazzola M, Wang MY, Park BH, Montesano R, Unger RH. Rapid transformation of white adipocytes into fat-oxidizing machines. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2004;101(7):2058-63.

Otterbein LE, Bach FH, Alam J, Soares M, Tao Lu H, Wysk M, Davis RJ, Flavell RA, Choi AM. Carbon monoxide has anti-inflammatory effects involving the mitogen-activated protein kinase pathway. *Nat Med.* 2000;6:422-428.

Ouchi N, Kobayashi H, Kihara S, Kumada M, Sato K, Inoue T, Funahashi T, Walsh K. Adiponectin stimulates angiogenesis by promoting cross-talk between AMP-activated protein kinase and Akt signaling in endothelial cells. *J Biol Chem.* 2004;279(2):1304-9.

Ouwens DM, Sell H, Greulich S, Eckel J. The role of epicardial and perivascular adipose tissue in the pathophysiology of cardiovascular disease. *J Cell Mol Med.* 2010;14(9):2223-34.

Pae HO, Kim EC, Chung HT. Integrative survival response evoked by heme oxygenase-1 and heme metabolites. *J Clin Biochem Nutr.* 2008;42(3):197-203.

Pae HO, Son Y, Kim NH, Jeong HJ, Chang KC, Chung HT. Role of heme oxygenase in preserving vascular bioactive NO. *Nitric Oxide.* 2010;23(4):251-7.

Paine A, Eiz-Vesper B, Blasczyk R, Immenschuh S. Signaling to heme oxygenase-1 and its anti-inflammatory therapeutic potential. *Biochem Pharmacol.* 2010;80(12):1895-903.

Percy C, Pat B, Poronnik P, Gobe G. Role of oxidative stress in age-associated chronic kidney pathologies. *Adv Chronic Kidney Dis.* 2005;12(1):78-83.

Percy CJ, Brown L, Power DA, Johnson DW, Gobe GC. Obesity and hypertension have differing oxidant handling molecular pathways in age-related chronic kidney disease. *Mech Ageing Dev.* 2009;130(3):129-38.

Peterson SJ, Drummond G, Kim DH, Li M, Kruger AL, Ikehara S, Abraham NG. L-4F treatment reduces adiposity, increases adiponectin levels, and improves insulin sensitivity in obese mice. *J Lipid Res.* 2008;49(8):1658-69.

Peterson SJ, Kim DH, Li M, Positano V, Vanella L, Rodella LF, Piccolomini F, Puri N, Gastaldelli A, Kusmic C, L'Abbate A, Abraham NG. The L-4F mimetic peptide prevents insulin resistance through increased levels of HO-1, pAMPK, and pAKT in obese mice. *J Lipid Res.* 2009;50(7):1293-304.

Poss KD and Tonegawa S. Heme oxygenase 1 is required for mammalian iron reutilization. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1997;94: 10919-10924.

Pratt PF, Li P, Hillard CJ, Kurian J, Campbell WB. Endothelium-independent, ouabain-sensitive relaxation of bovine coronary arteries by EETs. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2001;280(3):H1113-21.

Pratt PF, Rosolowsky M, Campbell WB. Effects of epoxyeicosatrienoic acids on polymorphonuclear leukocyte function. *Life Sci.* 2002;70(21):2521-33.

Reihill JA, Ewart MA, Hardie DG, Salt IP. AMP-activated protein kinase mediates VEGF-stimulated endothelial NO production. *Biochem Biophys Res Commun.* 2007;354(4):1084-8.

Rh eaume C, Arsenault BJ, B elanger S, P erusse L, Tremblay A, Bouchard C, Poirier P, Despr es JP. Low cardiorespiratory fitness levels and elevated blood pressure: what is the contribution of visceral adiposity? *Hypertension.* 2009;54(1):91-7.

Rizzo NO, Maloney E, Pham M, Luttrell I, Wessells H, Tateya S, Daum G, Handa P, Schwartz MW, Kim F. Reduced NO-cGMP signaling contributes to vascular inflammation and insulin resistance induced by high-fat feeding. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2010;30(4):758-65.

Rizzoni D, De Ciuceis C, Porteri E, Semeraro F, Rosei EA. Structural alterations in small resistance arteries in obesity. *Basic Clin Pharmacol Toxicol.* 2012;110(1):56-62

Rodella LF, Vanella L, Peterson SJ, Drummond G, Rezzani R, Falck JR, Abraham NG. Heme oxygenase-derived carbon monoxide restores vascular function in type 1 diabetes. *Drug Metab Lett.* 2008;2(4):290-300.

Ryter SW, Tyrrell RM. The heme synthesis and degradation pathways: role in oxidant sensitivity. Heme oxygenase has both pro- and antioxidant properties. *Free Radic Biol Med.* 2000;28: 289-309.

Sacerdoti D, Colombrita C, Di Pascoli M, Schwartzman ML, Bolognesi M, Falck JR, Gatta A, Abraham NG. 11,12-epoxyeicosatrienoic acid stimulates heme-oxygenase-1 in endothelial cells. *Prostaglandins Other Lipid Mediat.* 2007;82(1-4):155-61.

Sakairi Y, Jacobson HR, Noland TD, Capdevila JH, Falck JR, Breyer MD. 5,6-EET inhibits ion transport in collecting duct by stimulating endogenous prostaglandin synthesis. *Am J Physiol.* 1995;268(5 Pt 2):F931-9.

Sambuceti G, Morbelli S, Vanella L, Kusmic C, Marini C, Massollo M, Augeri C, Corselli M, Gherzi C, Chiavarina B, Rodella LF, L'Abbate A, Drummond G, Abraham NG, Frassoni F.

Diabetes impairs the vascular recruitment of normal stem cells by oxidant damage, reversed by increases in pAMPK, heme oxygenase-1, and adiponectin. *Stem Cells*. 2009;27(2):399-407.

Scherer PE. Adipose tissue: from lipid storage compartment to endocrine organ. *Diabetes*. 2006;55(6):1537-45.

Schini-Kerth VB, Auger C, Kim JH, Etienne-Selloum N, Chataigneau T. Nutritional improvement of the endothelial control of vascular tone by polyphenols: role of NO and EDHF. *Pflugers Arch*. 2010;459(6):853-62.

Serra A, Romero R, Lopez D, Navarro M, Esteve A, Perez N, Alastrue A, Ariza A. Renal injury in the extremely obese patients with normal renal function. *Kidney Int*. 2008;73(8):947-55.

Sharma M, McCarthy ET, Reddy DS, Patel PK, Savin VJ, Medhora M, Falck JR. 8,9-Epoxyeicosatrienoic acid protects the glomerular filtration barrier. *Prostaglandins Other Lipid Mediat*. 2009;89(1-2):43-51.

Shepard M, Dhulipala P, Kabaria S, Abraham NG, Lianos EA. Heme oxygenase-1 localization in the rat nephron. *Nephron*. 2002;92(3):660-4.

Shibata R, Sato K, Pimentel DR, Takemura Y, Kihara S, Ohashi K, Funahashi T, Ouchi N, Walsh K. Adiponectin protects against myocardial ischemia-reperfusion injury through AMPK- and COX-2-dependent mechanisms. *Nat Med*. 2005;11(10):1096-103.

Siow RC, Sato H, Mann GE. Heme oxygenase-carbon monoxide signalling pathway in atherosclerosis: anti-atherogenic actions of bilirubin and carbon monoxide? *Cardiovasc Res*. 1999;41(2):385-94.

Smith CC, Yellon DM. Adipocytokines, cardiovascular pathophysiology and myocardial protection. *Pharmacol Ther*. 2011;129(2):206-19.

Soares MP, Seldon MP, Gregoire IP, Vassilevskaia T, Berberat PO, Yu J, Tsui TY, Bach FH. Heme oxygenase-1 modulates the expression of adhesion molecules associated with endothelial cell activation. *J Immunol*. 2004;172(6):3553-63.

Sodhi K, Inoue K, Gotlinger KH, Canestraro M, Vanella L, Kim DH, Manthati VL, Koduru SR, Falck JR, Schwartzman ML, Abraham NG. Epoxyeicosatrienoic acid agonist rescues the metabolic syndrome phenotype of HO-2-null mice. *J Pharmacol Exp Ther.* 2009;331(3):906-16.

Song R, Kubo M, Morse D, Zhou Z, Zhang X, Dauber JH, Fabisiak J, Alber SM, Watkins SC, et al. Carbon monoxide induces cytoprotection an rat orthotopic lung transplantation via anti-inflammatory and anti-apoptotic effects. *Am J Pathol.* 2003;163:231-242.

Song R, Kubo M, Morse D, Zhou Z, Zhang X, Dauber JH, Fabisiak J, Alber SM, Watkins SC, et al. Carbon monoxide induces cytoprotection an rat orthotopic lung transplantation via anti-inflammatory and anti-apoptotic effects. *Am J Pathol.* 2000;163:231-242.

Spalding KL, Arner E, Westermark PO, Bernard S, Buchholz BA, Bergmann O, Blomqvist L, Hoffstedt J, Näslund E, Britton T, Concha H, Hassan M, Rydén M, Frisén J, Arner P. Dynamics of fat cell turnover in humans. *Nature.* 2008;453(7196):783-7.

Sprague B, Chesler NC, Magness RR. Shear stress regulation of nitric oxide production in uterine and placental artery endothelial cells: experimental studies and hemodynamic models of shear stresses on endothelial cells. *Int J Dev Biol.* 2010;54(2-3):331-9.

Steinberg HO, Baron AD. Vascular function, insulin resistance and fatty acids. *Diabetologia.* 2002;45(5):623-34.

Stocker R, Yamamoto Y, McDonagh AF, Glazer AN, Ames BN. Bilirubin is an antioxidant of possible physiological importance. *Science.* 1987;235:1043-1046.

Sun J, Sui X, Bradbury JA, Zeldin DC, Conte MS, Liao JK. Inhibition of vascular smooth muscle cell migration by cytochrome p450 epoxygenase-derived eicosanoids. *Circ Res.* 2002;90(9):1020-7.

Takahashi T, Saegusa S, Sumino H, Nakahashi T, Iwai K, Morimoto S, Kanda T. Adiponectin replacement therapy attenuates myocardial damage in leptin-deficient mice with viral myocarditis. *J Int Med Res.* 2005;33(2):207-14.

Tan DX, Manchester LC, Fuentes-Broto L, Paredes SD, Reiter RJ. Significance and application of melatonin in the regulation of brown adipose tissue metabolism: relation to human obesity. *Obes Rev.* 2011;12(3):167-88.

Tang X, Zhuang J, Chen J, Yu L, Hu L, Jiang H, Shen X. Arctigenin efficiently enhanced sedentary mice treadmill endurance. *PLoS One.* 2011;6(8):e24224.

Tenhunen R, Marver HS, Schmid R. The enzymatic conversion of heme to bilirubin by microsomal heme oxygenase. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1968;61:748-755.

Tenhunen R, Marver HS, Schmid R. The enzymatic conversion of heme to bilirubin by microsomal heme oxygenase. *Proc Natl Acad Sci USA,* 61:748-755, 1968.

Terry MJ, Linley PJ, Kohchi T. Making light of it: the role of plant haem oxygenases in phytochrome chromophore synthesis. *Biochem Soc Trans.* 2002; 30: 604-609.

Tilg H, Moschen AR. Adipocytokines: mediators linking adipose tissue, inflammation and immunity. *Nat Rev Immunol.* 2006;6(10):772-83.

Tobler K, Freudenthaler A, Baumgartner-Parzer SM, Wolzt M, Ludvik B, Nansalmaa E, Nowotny PJ, Seidinger D, Steiner S, Luger A, Artwohl M. Reduction of both number and proliferative activity of human endothelial progenitor cells in obesity. *Int J Obes (Lond).* 2010;34(4):687-700.

Togane Y, Morita T, Suematsu M, Ishimura Y, Yamazaki JI, Katayama S. Protective roles of endogenous carbon monoxide in neointimal development elicited by arterial injury. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2000;278: 623-632.

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

Tzatsos A, Kandror KV. Nutrients suppress phosphatidylinositol 3-kinase/Akt signaling via raptor-dependent mTOR-mediated insulin receptor substrate 1 phosphorylation. *Mol Cell Biol.* 2006;26(1):63-76.

Tziomalos K, Athyros VG, Karagiannis A, Mikhailidis DP. Endothelial dysfunction in metabolic syndrome: prevalence, pathogenesis and management. *Nutr Metab Cardiovasc Dis.* 2010;20(2):140-6.

Van Guilder GP, Hoetzer GL, Dengel DR, Stauffer BL, DeSouza CA. Impaired endothelium-dependent vasodilation in normotensive and normoglycemic obese adult humans. *J Cardiovasc Pharmacol.* 2006;47(2):310-3

Vanella L, Kim DH, Sodhi K, Barbagallo I, Burgess AP, Falck JR, Schwartzman ML, Abraham NG. Crosstalk between EET and HO-1 downregulates Bach1 and adipogenic marker expression in mesenchymal stem cell derived adipocytes. *Prostaglandins Other Lipid Mediat.* 2011;96(1-4):54-62.

Vera T, Kelsen S, Stec DE. Kidney-specific induction of heme oxygenase-1 prevents angiotensin II hypertension. *Hypertension.* 2008;52(4):660-5.

Villela NR, Kramer-Aguiar LG, Bottino DA, Wiernsperger N, Bouskela E. Metabolic disturbances linked to obesity: the role of impaired tissue perfusion. *Arq Bras Endocrinol Metabol.* 2009;53(2):238-45.

Wagener FA, da Silva JL, Farley T, de Witte T, Kappas A, Abraham NG. Differential effects of heme oxygenase isoforms on heme mediation of endothelial intracellular adhesion molecule 1 expression. *J Pharmacol Exp Ther.* 1999;291:416-423.

Wagener FA, Volk HD, Willis D, Abraham NG, Soares MP, Adema GJ, Figdor CG. Different faces of the heme-heme oxygenase system in inflammation. *Pharmacol Rev.* 2003;55:551-571.

Wang Y, Lam JB, Lam KS, Liu J, Lam MC, Hoo RL, Wu D, Cooper GJ, Xu A. Adiponectin modulates the glycogen synthase kinase-3 β /beta-catenin signaling pathway and attenuates mammary tumorigenesis of MDA-MB-231 cells in nude mice. *Cancer Res.* 2006;66(23):11462-70.

Wang Y, Lam KS, Xu A. Adiponectin as a negative regulator in obesity-related mammary carcinogenesis. *Cell Res.* 2007;17(4):280-2.

Weisberg SP, Hunter D, Huber R, Lemieux J, Slaymaker S, Vaddi K, Charo I, Leibel RL, Ferrante AW Jr. CCR₂ modulates inflammatory and metabolic effects of high-fat feeding. *J Clin Invest.* 2006;116(1):115-24. Epub 2005. Erratum in: *J Clin Invest.* 2006;116(5):1457.

Wilcox CS. Reactive oxygen species: roles in blood pressure and kidney function. *Curr Hypertens Rep.* 2002;4(2):160-6.

Williams IL, Chowienczyk PJ, Wheatcroft SB, Patel A, Sherwood R, Momin A, Shah AM, Kearney MT. Effect of fat distribution on endothelial-dependent and endothelial-independent vasodilatation in healthy humans. *Diabetes Obes Metab.* 2006;8(3):296-301.

World health organization (WHO). Consultation on Obesity: preventing and Managing the Global Epidemic. WHO Technical Report Series 894. WHO, Geneva, 1999.

Xu X, Jhun BS, Ha CH, Jin ZG. Molecular mechanisms of ghrelin-mediated endothelial nitric oxide synthase activation. *Endocrinology.* 2008;149(8):4183-92.

Yao X, Shan S, Zhang Y, Ying H. Recent progress in the study of brown adipose tissue. *Cell Biosci.* 2011;1:35.

Yet SF, Tian R, Layne MD, Wang ZY, Maemura K, Solovyeva M, Ith B, Melo LG, Zhang L, Ingwall JS, et al. Cardiac-specific expression of heme oxygenase-1 protects against ischemia and reperfusion injury in transgenic mice. *Circ Res.* 2001;89:168-173.

Zhang H, Cui J, Zhang C. Emerging role of adipokines as mediators in atherosclerosis. *World J Cardiol.* 2010;2(11):370-6.

Zhou G, Myers R, Li Y, Chen Y, Shen X, Fenyk-Melody J, Wu M, Ventre J, Doebber T, Fujii N, Musi N, Hirshman MF, Goodyear LJ, Moller DE. Role of AMP-activated protein kinase in mechanism of metformin action. *J Clin Invest*. 2001;108(8):1167-74.

Zhou Y, Chang HH, Du J, Wang CY, Dong Z, Wang MH. Renal epoxyeicosatrienoic acid synthesis during pregnancy. *Am J Physiol Renal Physiol*. 2005;288(1):F221-6.

Zhu W, Cheng KK, Vanhoutte PM, Lam KS, Xu A. Vascular effects of adiponectin: molecular mechanisms and potential therapeutic intervention. *Clin Sci (Lond)*. 2008;114(5):361-74.

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;105(7):804-9.

Zoccali C. Overweight, obesity and metabolic alterations in chronic kidney disease. *Prilozi*. 2009;30(2):17-31.