

UNIVERSITA' DEGLI STUDI DI PARMA

Dottorato di ricerca in  
FISIOPATOLOGIA DELL'INSUFFICIENZA RENALE  
CRONICA

Ciclo XXIV

ESPRESSIONE GENICA E PROTEICA  
DELL'ALBUMINA NEGLI ADIPOCITI UMANI  
MATURI. RELAZIONE TRA ALBUMINEMIA E  
TESSUTO ADIPOSO NEI PAZIENTI IN  
TRATTAMENTO DIALITICO.

Coordinatore:

Chiar.mo Prof. CARLO BUZIO

Tutor:

Chiar.mo Prof. BRUNO MEMOLI

Dottorando: MARIA LUISA SIRICO

## **Indice**

Introduzione	pag. 3
Metodi	pag. 6
Risultati	pag. 14
Discussione	pag. 16
Bibliografia	pag. 21
Tabelle	pag. 25
Figure	pag. 27

## INTRODUZIONE

Il tessuto adiposo, un tempo ritenuto semplice sito di deposito dell'energia in eccesso, è oggi considerato un vero e proprio organo endocrino con un ruolo fondamentale nella regolazione di diversi sistemi omeostatici [1]. Molteplici sono, infatti, le molecole metabolicamente attive prodotte dal tessuto adiposo, che, in base alla loro attività prevalente, possono essere distinte in molecole con funzione nella regolazione dei processi metabolici, come l'omeostasi del glucosio, e in molecole ad azione modulatrice della risposta infiammatoria, quali l'interleuchina-6 (IL-6), l'interleuchina-1 $\beta$ , il Tumor Necrosis Factor- $\alpha$ , la Proteina C Reattiva (PCR), la Leptina e l'Adiponectina [2]. In riferimento alla specifica attività di modulazione della risposta infiammatoria, è stato dimostrato che il tessuto adiposo concorre alla produzione di circa il 20-25% dei livelli circolanti di IL-6 [3]. Questa produzione, associata a quella degli altri fattori elencati, conferisce al tessuto adiposo un ruolo ormai chiaro nella risposta infiammatoria sistemica probabilmente associata ad obesità, insulino-resistenza e sindrome metabolica [4].

Già in un lavoro precedente, il nostro gruppo ha studiato il coinvolgimento del tessuto adiposo nella risposta infiammatoria con particolare interesse alla produzione negli adipociti umani oltre che di IL-6, peraltro già dimostrata, anche di un'altra importante proteina di fase acuta, la PCR. In questo studio è stata dimostrata una chiara espressione di PCR e dei recettori dell'IL-6 in adipociti umani ottenuti da frammenti di tessuto adiposo proveniente da diversi distretti (sottocutaneo e omentale di pazienti infiammati e soggetti sani). Un dato interessante emerso in questo lavoro è la modulazione e regolazione della produzione di PCR dell'adipocita da parte dell'IL-6 attraverso i

recettori presenti sulla membrana cellulare, proprio come avviene nell'epatocita. Questi dati dimostrano che l'adipocita è una cellula in grado di generare una risposta infiammatoria di per se, attraverso la produzione di proteine di fase acuta positive come IL-6 e PCR, ma, attraverso recettori di membrana per IL-6, rappresenta esso stesso un target dell'infiammazione sistemica, che in tal modo ne riesce a modulare l'attività [5].

Il tessuto adiposo è un organo di origine mesodermica costituito oltre che dagli adipociti anche da un folto stroma composto da differenti tipi cellulari, quali preadipociti, cellule staminali, fibroblasti e macrofagi. Gli adipociti maturi rappresentano solo il 40-60% dell'intera popolazione cellulare, qualunque sia la provenienza e il tipo di tessuto adiposo in esame [6]. I preadipociti sono presenti nel tessuto adiposo durante tutta la vita adulta e possono proliferare e differenziare in adipociti maturi in base al bilancio energetico dell'individuo; queste cellule condividono inoltre alcune caratteristiche con i macrofagi, come la fagocitosi in risposta a diversi stimoli [7]. Un'altra significativa popolazione cellulare presente nel tessuto adiposo è rappresentata dalle cellule staminali mesenchimali (MSC), pluripotenti, di origine non emopoietica e caratterizzate da capacità adesiva e da morfologia fibroblastoide. Queste cellule possiedono la capacità di trasformarsi in molteplici tipi cellulari, come in cellule del tessuto osseo [8,9], in cellule neuronali [10], adipose [11] ed in quelle del tessuto muscolare [12] *in vitro* e in cellule simil-epatocitiche [16]. Quindi, sia i preadipociti, con un potenziale differenziativo più ristretto, che le cellule mesenchimali multipotenti rappresentano dei precursori degli adipociti maturi.

L'albumina, normalmente prodotta dall'epatocita, è la più abbondante proteina circolante nel sangue; essa svolge un ruolo di proteina di

legame ed è coinvolta nella regolazione dell'omeostasi colloidale-osmotica del sangue [16]. E', inoltre, una proteina negativa della fase acuta dell'infiammazione. Infatti, l'ipoalbuminemia caratteristica degli stati infiammatori rappresenta il risultato combinato di citochine inibitorie (soprattutto di IL-6) e di un inadeguato intake calorico-proteico nei pazienti affetti da malattie infiammatorie croniche quali l'insufficienza renale [17], condizioni in cui l'ipoalbuminemia rappresenta un importante fattore di rischio cardiovascolare [18].

Considerati, dunque, l'ormai noto ruolo attivo dell'adipocita nella produzione di proteine infiammatorie quali la PCR e IL-6, il coinvolgimento sia diretto che indiretto del tessuto adiposo nella risposta infiammatoria sistemica, la stretta relazione tra obesità e sindrome metabolica con l'infiammazione e con l'aumentato rischio cardiovascolare associato e, infine, considerato il presunto link esistente tra adipocita ed epatocita, validato dalla comune attività di sintesi di alcune proteine infiammatorie e dalla presenza nel tessuto adiposo di cellule mesenchimali pluripotenti in grado di differenziare in entrambi i tipi cellulari, il nostro gruppo nella continua ricerca in questo campo ha supposto l'esistenza di altre attività condivise dall'epatocita e l'adipocita e ha individuato nella sintesi dell'albumina, proteina di riferimento di sintesi epatica ed importante proteina negativa di fase acuta dell'infiammazione, un'interessante argomento di indagine.

Questo lavoro è stato ideato allo scopo di studiare l'eventuale espressione genica di albumina nell'adipocita e il ruolo dell'infiammazione nella regolazione di questa espressione, come abbiamo precedentemente osservato con la PCR. Infine, abbiamo valutato il possibile contributo dell'adipocita ai livelli totali circolanti di albumina, come accade per l'IL-6, sia in soggetti sani che in pazienti infiammati affetti da insufficienza renale cronica in trattamento dialitico.

## MATERIALI E METODI

### **Quantizzazione dell'mRNA dell'Albumina e identificazione della proteina negli Adipociti e Preadipociti**

*Selezione dei pazienti e dei controlli sani e raccolta dei campioni di tessuto adiposo.* I campioni di tessuto adiposo umano sottocutaneo e omentale sono stati ottenuti da dodici soggetti suddivisi in due gruppi sulla base dei valori circolanti di PCR preliminarmente dosati. In accordo con la letteratura, abbiamo considerato un valore cut-off di PCR di 3mg/dl per distinguere i pazienti infiammati da quelli non infiammati. In tal modo, abbiamo ottenuto un gruppo di sei soggetti sani (non infiammati) senza alcun segno o sintomo d'infiammazione, che sono stati sottoposti ad interventi di chirurgia minore, ed un gruppo di sei pazienti affetti da malattie infiammatorie croniche che invece sono stati sottoposti a procedure chirurgiche d'elezione: (a) quattro pazienti per cancro e (b) due di colecistectomia.

Allo scopo di escludere un effetto confondente infiammatorio legato all'obesità o al sovrappeso, i pazienti arruolati dei due gruppi sono stati appaiati per Indice di Massa Corporea (BMI). La presenza di altre malattie infiammatorie sistemiche (intestinali o polmonari, vasculiti, artrite reumatoide, etc) è stata esclusa in tutti i pazienti arruolati (con l'eccezione della neoplasia); in particolare, prima dell'inclusione definitiva, abbiamo ricercato ed escluso la presenza di malattie immunologiche, neoplastiche (nel gruppo dei soggetti sani) e infettive. Nessun paziente era affetto da Diabete mellito o in trattamento con steroidi o terapie immunosoppressive.

I campioni di sangue sono stati raccolti prima delle procedure chirurgiche in tutti i pazienti in modo da ottenere aliquote seriche

diverse. I sieri sono stati conservati a  $-80^{\circ}\text{C}$  in attesa di eseguire i dosaggi di PCR e IL-6. Le biopsie di tessuto adiposo sono state eseguite durante le procedure chirurgiche di tutti e dodici i pazienti e per ciascun paziente è stato prelevato un campione di tessuto adiposo sottocutaneo e un campione di tessuto adiposo omentale. Dopo il prelievo, il materiale biotico è stato opportunamente lavato con soluzione fisiologica 0.9% sterile, successivamente congelato in nitrogeno liquido e conservato a  $-80^{\circ}\text{C}$  fino all'estrazione dell'RNA.

*Saggio della Proteina C Reattiva (PCR).* I livelli circolanti di PCR sono stati determinati mediante un saggio ELISA ad alta sensibilità (Bender medSystems, Vienna, Austria) sulle aliquote seriche di tutti i soggetti inclusi nello studio. Il limite inferiore di rilevamento era di 3pg/mL e il coefficiente di variazione di tutto il saggio è stato calcolato essere del 6,9%. Tutti i campioni sono stati analizzati in duplicato.

*Saggio dell'IL-6.* Le concentrazioni plasmatiche di IL-6 sono state misurate mediante un saggio ELISA in commercio (Quantikine; R&D Systems, Minneapolis, MN). Il limite inferiore di rilevamento dei saggi era  $<0,70$  pg/mL e il coefficiente di variazione del saggio era del 5%. Tutti i campioni sono stati analizzati in duplicato.

*Isolamento di adipociti, cellule stromali e preadipociti da frammenti di tessuto adiposo.* I frammenti di tessuto adiposo ottenuti da tutti i soggetti arruolati sono stati introdotti in una soluzione a  $37^{\circ}\text{C}$ , sterile, di NaCl 0,9%, glucosio 5,6 mM e HEPES Buffer 25 mM con pH corretto a 7,4 e contenente 50U di penicillina/mL e 50 mg di streptomina/mL. I frammenti di tessuto adiposo così trattati sono stati tritati in condizioni sterili e digeriti in una soluzione tampone di Krebs-Ringer bicarbonato

con aggiunta di glucosio 5.6 mM, 50 mg di streptomicina/mL, 50 U di penicillina/mL e 17 mg di collagenasi tipo I per ogni 10 gr di tessuto adiposo (Worthington Biochemical, Lakewood, NJ). La digestione è durata 75 min a 37°C con agitazione rotatoria a 40 rpm. Le cellule isolate sono state filtrate attraverso un singolo velo di chiffon e gli adipociti isolati (contenenti una frazione stromale) sono stati lasciati a galleggiare per 5 min a 37°C. Il fluido al di sotto degli adipociti galleggianti (contenente la frazione di cellule stromali) è stato trasferito in una provetta conica di propilene di 50-ml.

Per l'isolamento degli adipociti, ogni 1 ml ottenuto di sospensione di cellule adipose è stato trasferito in provette con appropriato medium specifico per adipociti (Zen-Bio, research Triangle Park, NC) e incubato in adeguate condizioni fino al processo di lisi cellulare. La frazione stromale è stata centrifugata a 800g per 10min.

Per l'isolamento dei preadipociti, il pellet cellulare è stato dapprima centrifugato a 800xg per 10 min e poi sottoposto a tre lavaggi con la soluzione Eagle modificata da Dulbecco: mistura di nutrienti F-12 (Ham) in combinazione 01 : 01 (DMEM: F12, Gibco-BRL, Carlsbad, California), con supplemento di 15-mM NaHCO<sub>3</sub>, penicillina 50-U/ mL e streptomicina 50 mg/mL. Dopo lavaggio, il pellet è stato risospeso attraverso triturazione in DMEM supplementata per pre-adipociti: F12 contenente siero fetale bovino al 10% (FBS, Gibco-BRL, Carlsbad, CA). Le cellule sono state poi piastrate e incubate in un incubatore umidificato a 37°C in un'atmosfera di CO<sub>2</sub> al 5% per 24 ore per consentire l'adesione e la proliferazione cellulare. Dopo 24 ore il mezzo di sospensione è stato rimosso, sostituito con uno specifico per pre-adipociti. (Zen-Bio, Inc., Research Triangle Park, NC) e rimesso in coltura.



*Identificazione dei primers per l'Albumina e  $\beta$ -Actina.* Le sequenze genomiche corrispondenti all'albumina e alla  $\beta$ -Actina sono state ottenute dalla GeneBank ([http:// www. ncbi. nlm.nih.gov/](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/)) al fine di identificare i primer specifici. Sono state analizzate le sequenze di esoni per ricavare una coppia di primer (senso e antisenso) in grado di generare frammenti di DNA amplificato di una lunghezza compresa tra 150 e 700 bp, con una temperatura di annealing tra i 55 e i 62 °C. I primer senso e antisenso sono stati selezionati in modo da includere almeno un introne allo scopo di evitare una contaminazione del DNA genomico durante l'amplificazione. I primer selezionati sono mostrati in Tabella 1.

*Isolamento e analisi dell'espressione dell'RNA mediante Retrotrascrizione-Reazione a catena della Polimerasi (RT-PCR).* Le cellule isolate sono state polverizzate con un omogenizzatore. L'RNA totale è stato estratto mediante il metodo della guanidina-tiocianato (Trizol). Quattro  $\mu$ g di RNA totale sono stati sottoposti alla sintesi di cDNA per 1 ora a 37 °C usando il kit "Ready to go You-Primer First-Strand Beads" (Amersham Pharmacia Biotech, Piscataway, NJ, code 27-9264-01) in una mistura di reazione contenente 0.5  $\mu$ g di oligo-dT (Amersham Pharmacia Biotech cod. 27-7610-01). L'amplificazione tramite PCR del cDNA è stata realizzata in una mistura di reazione contenente 4  $\mu$ L di cDNA e differenti set di primers (20 p/mol ognuno). L'amplificazione del gene dell'albumina e della  $\beta$ -Actina usata come controllo è stata ottenuta con 2 set di primers. Dopo una denaturazione iniziale a 94 °C per 5 min, le reazioni della PCR sono state realizzate usando 30 cicli di 94°C per 1 min, temperatura di annealing per 1 min, e successivamente a 72°C per 1 min in un cycler termico (Perkin Elmer). I prodotti della PCR sono stati separati mediante elettroforesi su gel di

agarosio al 2% colorato con etidio bromuro. Le bande ottenute sono state quantizzate con analisi densitometrica. Tutti i segnali sono stati normalizzati ai livelli di mRNA del gene housekeeping della gliceraldeide–fosfato deidrogenasi ed espressi come rapporto.

*Real-Time PCR.* L'analisi PCR quantitativa Real-time per il gene dell'albumina è stata effettuata su lisato cellulare sia di adipociti che di cellule stromali usando l'apparecchiatura ABI prism 7500 (Applied Biosystems, Foster City, CA) e il saggio della 5-esonucleasi (TaqMan technology). Il c-DNA, sintetizzato come descritto sopra, è stato utilizzato per la real-time PCR effettuata su una piastra a 96 pozzetti di reazione contenenti cDNA equivalente a 100ng di RNA in un volume di reazione di 25  $\mu$ l costituito da 1x Taqman Universal Master Mix, da quantità ottimizzate di una sonda marcata con colorante FAM, e specifici primer senso e antisenso per il gene dell'albumina. I controlli includevano RNA sottoposta a RT-PCR senza la trascrittasi inversa e PCR con acqua al posto del cDNA. I risultati sono stati analizzati usando un metodo comparativo e i valori sono stati normalizzati sull'espressione di  $\beta$ -Actina e convertiti in numero di volte in cui il gene è espresso.

*Western Blot.* Omogenizzati di adipociti e preadipociti sono stati preparati in un buffer di precipitazione radioimmune (1X PBS, 1% NP-40, 0.5% sodium deoxycholate, 0.1% SDS contenente phenylmethylsulfonyl fluoride, aprotinina, sodium orthovanadato and inibitori proteasici) (complete<sup>TM</sup> Mini, Boehringer-Mannheim) contenente antipain diidroclore (50 mg/mL), bestatina (40 mg/mL), chimostatina (60 mg/mL), E-64 (10 mg/mL), leupeptina (0.5 mg/mL), pepstatina (0.7 mg/mL), phosphoramidone (300 mg/mL), Pefabloc SC (1 mg/mL), EDTA disodico sale (0.5 mg/mL), eaprotinina (2 mg/mL)]. Le

cellule sono state centrifugate a 14000 x g [21] per 30 min a 4°C e le concentrazioni proteiche sono state determinate mediante il saggio di Bradford usando albumina serica bovina come standard.

Per l'immunoblotting, le proteine (100 µg) sono state sottoposte ad elettroforesi su gel all'8% di SDS-poliacrilamide. Le proteine così separate sono state trasferite a membrane di polyvinylidene difluoride (PVDF) ad un voltaggio costante di 200V per 16 ore. Le membrane di PVDF sono state bloccate per 1 ora in latte in polvere al 5% in tween buffer TBS-0.1%(25 mM Tris-HCl, 0.2 mM NaCl; 0.1% Tween 20 (v/v) pH 7.6) (TBST). La membrana è stata lavata due volte con TBST e poi incubata overnight a 4°C con gli anticorpi corrispondenti primari anti-albumina e anti-GAPDH. Dopo lavaggi successivi della membrana con TBST, è stata aggiunta un anticorpo secondario anti-rabbit coniugato con l'enzima perossidasi del rafano ad una diluizione di 1:5000 e incubata per 1 ora temperatura ambiente. Per l'identificazione dell'espressione proteica è stato adoperato un kit di chemiluminescenza potenziato (Amersham, NJ).

### ***Misurazione dell'Albumina e del grasso corporeo nei soggetti sani e nei pazienti infiammati affetti da Insufficienza renale cronica in trattamento dialitico***

In 63 soggetti sani (non infiammati) e 54 pazienti micro-infiammati (C-RP:  $5.24 \pm 2.26$  mg/L) affetti da Insufficienza renale in trattamento dialitico cronico sono stati dosati i livelli circolanti di Albumina (con nefelometria), peso corporeo (BW), Indice di Massa Corporea (BMI), calcolato come rapporto tra peso/altezza<sup>2</sup> (in Kg/m<sup>2</sup>), e la composizione corporea, determinata tramite analisi d'impedenza bioelettrica (BIA) e del vettore dell'impedenza bioelettrica (BIVA).

L'Analisi di Impedenza Bioelettrica (BIA) è una metodica non

invasiva e di semplice esecuzione che sfrutta le proprietà bioelettriche dei tessuti e consiste nell'iniezione di una corrente alternata di 800  $\mu$ A ad una frequenza fissa di 50 kHz per via transcutanea. La BIA permette di effettuare un'analisi di composizione corporea sulla base del modello tricompartimentale fornendo informazioni di tipo non solo quantitativo, ma anche di tipo qualitativo. Questo modello a tre compartimenti, infatti, vede una suddivisione interna della massa grassa libera (Fat Free Mass o FFM) in massa cellulare (Body Cell Mass o BCM) e massa extracellulare (Extra Cellular Mass o ECM) consentendo una reale valutazione dello stato d'idratazione e della massa proteica esistente. In questo studio la misurazione è avvenuta su pazienti in posizione supina, sul lato destro del corpo, dopo averli fatte distendere per 10' su un lettino con una superficie non conduttiva, in una stanza ad una temperatura di circa 22°C. Il soggetto è stato posizionato in modo da avere le braccia distanti dal tronco di 30°C e le gambe distanti tra loro a formare un angolo di circa 45°C. Gli elettrodi sensori sono stati posizionati in posizione mediana tra le eminenze distali del radio e dell'ulna al polso e fra i malleoli laterale e mediale della caviglia. Gli elettrodi iniettori sono stati posizionati sulla superficie dorsale della mano e del piede, in corrispondenza rispettivamente della 2°-3° articolazione metacarpo-falangea e metatarso-falangea. Gli elettrodi prossimali e distali sono stati posti ad una distanza di 5 cm. Inoltre, ciascun paziente sottoposto alla misurazione ha seguito il seguente protocollo:

- digiuno da almeno 4 ore; abolizione dell'alcol nelle 48 ore precedenti;
- assenza di attività fisica nelle 12 ore precedenti;
- svuotamento della vescica massimo 30' prima dell'esame;
- eventuale sospensione di diuretici nei 7 giorni precedenti alla

misurazione;

- 5°/15° giorno del ciclo mestruale.

Resistenza (R) e Reattanza (Xc) sono state misurate mediante un analizzatore dell'impedenza bioelettrica a frequenza fissa di 50Hz (BIA 101 RJL, Akern Bioresearch, Firenze, Italy) in accordo con la tecnica standard tetrapolare, attraverso l'applicazione di un software che incorpora equazioni predittive per il calcolo dell'acqua corporea totale (TBW), massa grassa (FM), massa grassa libera (FFM) e dell'acqua extracellulare (ECW) [23,24]. L'idratazione dei tessuti molli è stata valutata con il vettore BIA utilizzando il software BIVA. La resistenza (R) e la reattanza (Xc) ottenute con la BIA sono state normalizzate per l'altezza (H) dei soggetti (R/H e Xc/H) e i vettori risultanti sono stati riportati su di un grafico come punti sull'ellissi di tolleranza genere-specifiche al 50%, 75% e 95%, calcolata in riferimento ad una popolazione sana. Questo metodo, denominato Grafo Resistenza-Reattanza (Grafo RXc), confronta il vettore misurato del soggetto con l'intervallo di riferimento della popolazione normale, di forma ellissoidale, espresso in percentili della distribuzione normale (gaussiana) bivariata. In accordo con il metodo Grafo RXc, i vettori che cadono all'interno dell'ellissi di tolleranza al 75 % indicano una normale idratazione, i vettori corti, che cadono al di sotto del polo inferiore dell'ellissi di tolleranza al 75 %, indicano un'iperidratazione, i vettori lunghi, che cadono oltre il polo superiore dell'ellissi di tolleranza al 75 %, indicano scarsa idratazione. La posizione del vettore è stata anche paragonata con la soglia lineare che discrimina i vettori corti di soggetti obesi con edemi che cadono al di fuori del polo inferiore dell'ellissi di riferimento dai vettori di soggetti obesi senza edemi che invece cadono oltre la soglia [25]. La lunghezza del vettore è stata calcolata come:  $|Z| = \sqrt{(R/H)^2 + (Xc/H)^2}$  e l'angolo di fase del vettore come l'arcotan di  $Xc/R$ .

*Analisi Statistica.* L'analisi statistica è stata effettuata applicando il t-test per dati non appaiati e l'ANOVA (seguita dal post hoc test del Bonferroni) e l'analisi di regressione lineare. I risultati sono espressi come medie  $\pm$  SD; la significatività statistica è stata definita come  $P < 0.05$ .

## **RISULTATI**

### ***Quantizzazione dell'mRNA dell'albumina e della proteina negli adipociti e pre-adipociti***

*Selezione dei pazienti e raccolta dei campioni di tessuto adiposo.* In Tabella 2 sono riportati i dati demografici, antropometrici e biochimici basali di tutti i pazienti arruolati. Nessuna differenza significativa è stata osservata tra i due gruppi per sesso, età, peso corporeo, BMI, circonferenza vita e rapporto vita-fianchi. Al contrario, i valori plasmatici di PCR e i livelli di IL-6 erano significativamente più elevati nei pazienti con malattie infiammatorie croniche che nei soggetti sani non infiammati ( $P < 0.01$ ).

*Espressione genica dell'Albumina mediante RT-PCR negli Adipociti e Preadipociti.* La tecnica della RT-PCR ha mostrato che gli adipociti estratti da tutti i distretti del tessuto adiposo (sottocutaneo e omentale) sia dei soggetti sani non infiammati che dei pazienti infiammati esprimevano il gene dell'albumina (Figura 1); l'mRNA è stato ritrovato anche nei preadipociti di tutti i frammenti di tessuto adiposo considerati.

*Espressione genica dell'Albumina mediante Real-Time PCR negli Adipociti e Preadipociti.* Nessuna differenza statisticamente significativa è stata osservata nell'espressione genica dell'albumina tra soggetti sani e pazienti infiammati negli adipociti sia omentali che in quelli sottocutanei. Come mostra la Figura 2, è stata osservata soltanto una maggiore espressione di albumina negli adipociti omentali rispetto a quelli sottocutanei in entrambi i gruppi. Abbiamo pertanto concluso che l'infiammazione non è in grado di modulare l'espressione del gene dell'albumina negli adipociti, ma probabilmente ulteriori studi sarebbero necessari per confermare i nostri dati. Nella Figura 3 è rappresentata la diversa espressione genica dell'albumina negli adipociti e preadipociti estratti sia dal tessuto adiposo sottocutaneo che da quello omentale di pazienti non infiammati. L'espressione genica dell'albumina nei preadipociti era maggiore che negli adipociti di entrambi i distretti e questa differenza era statisticamente significativa. Abbiamo anche osservato che l'espressione del gene dell'albumina nei preadipociti estratti da frammenti di grasso omentale era significativamente più elevata di quelli estratti da frammenti di grasso sottocutaneo. Nessuna differenza è stata riscontrata tra gli adipociti dei due diversi distretti (Figura 3).

*Espressione della proteina dell'Albumina negli Adipociti e Preadipociti estratti da tipi differenti di tessuto adiposo mediante Western-Blot.* Come passaggio successivo, abbiamo voluto indagare se i preadipociti e gli adipociti fossero anche in grado di esprimere la proteina dell'albumina. Come rappresentato in Figura 4 e 5, il Western Blot mostrava un'evidente presenza di albumina, suggerendo che sia gli adipociti che i preadipociti, omentali e sottocutanei, sono in grado di sintetizzare la proteina in tutti i soggetti, infiammati e non infiammati.

***Correlazioni tra livelli circolanti di Albumina e Massa Grassa sia nei pazienti infiammati in trattamento dialitico che nei soggetti non infiammati.***

Nei 63 individui sani sottoposti a BIA è stata indagata la relazione esistente tra albuminemia e Massa Grassa corporea, dopo aver escluso dall'analisi statistica i soggetti iperidratati e ipoidratati, valutati tramite BIVA (vettore BIA posizionato al di sotto del polo inferiore o al di sopra del polo superiore dell'ellissi di confidenza del 75%). Come mostrato in Figura 5, è stata osservata una correlazione negativa statisticamente significativa tra albumina plasmatica e Massa Grassa ( $R = -0.132$ ,  $P < 0.05$  (2 code)). I livelli plasmatici di albumina erano significativamente più bassi nei pazienti con maggiore massa grassa. Inoltre, la stessa relazione è stata studiata in 54 pazienti micro-infiammati in trattamento dialitico cronico. Come mostrato in Figura 7, è stata osservata una correlazione negativa statisticamente significativa tra albuminemia e massa grassa anche in questo gruppo di pazienti ( $R = -0.391$ ,  $P < 0.01$  (2 code)). I livelli plasmatici di albumina erano significativamente inferiori nei pazienti con elevata massa grassa.

## **DISCUSSIONE**

L'albumina è la proteina più abbondante del sangue prodotta dagli epatociti. Ad oggi, non esistono dati presenti in letteratura sulla produzione di albumina da parte degli adipociti umani maturi. Nel presente studio abbiamo osservato per la prima volta una chiara espressione di albumina nelle cellule adipose umane. Inoltre, in base ai nostri risultati, possiamo anche affermare che gli adipociti differenziati sono presumibilmente in grado di sintetizzare la proteina dell'albumina.



L'espressione genica dell'albumina risultava significativamente più bassa negli adipociti che nei preadipociti; in particolare era 42 volte negli adipociti omentali (Om) e 12 in quelli sottocutanei (Sc) più bassa se paragonata coi preadipociti (Figura 3). Si può quindi considerare il preadipocita omentale la cellula più attiva nell'espressione genica dell'albumina.

La presenza di albumina nei pre-adipociti non è una novità. Infatti, Yoo e Lee, attraverso l'uso di linee cellulari di preadipociti quali 3T3-L1 [26], hanno studiato il ruolo dell'albumina nella differenziazione dell'adipocita, un processo in cui precursori cellulari indifferenziati differenziano in adipociti maturi con modifiche coordinate della morfologia cellulare e dell'espressione genica. Questi autori osservarono che l'espressione genica dell'albumina era significativamente aumentata negli stadi più tardivi del processo di differenziazione degli adipociti e la sua inibizione determinava una significativa riduzione della formazione delle gocce lipidiche [26]. L'ipotesi è che l'albumina potrebbe essere necessaria a stabilizzare l'accumulo di lipidi negli adipociti maturi, probabilmente attraverso una diretta interazione con gli acidi grassi. È importante sottolineare che questi esperimenti sono stati condotti su linee cellulari murine e che i loro risultati potrebbero non essere riproducibili in cellule umane.

In uno studio precedente, abbiamo studiato il comportamento degli adipociti nei pazienti con malattia infiammatoria cronica e abbiamo trovato che non solo l'espressione genica della Proteina C reattiva (PCR) era attiva in queste cellule, ma anche che l'espressione del gene dell'IL-6 e dei suoi recettori era aumentata nei pazienti infiammati rispetto ai controlli sani, sia nel tessuto adiposo sottocutaneo che in quello intra-addominale [5]. Considerati questi dati, abbiamo ipotizzato che anche l'espressione genica dell'albumina negli adipociti fosse

regolata dall'infiammazione in modo simile agli epatociti, con una ridotta espressione nei soggetti infiammati rispetto a quelli non infiammati. Tuttavia, i nostri risultati non hanno mostrato differenze significative nell'espressione del gene dell'albumina tra infiammati e non infiammati quando analizzata tramite Real-Time PCR (Figura 2). La figura 2 mostra anche un altro interessante risultato e cioè che l'espressione genica dell'albumina era significativamente più elevata negli adipociti omentali rispetto a quelli provenienti dal tessuto sottocutaneo.

La presenza della proteina dell'albumina assieme al riscontro della sua espressione genica negli adipociti suggerisce l'ipotesi che il tessuto adiposo contribuisca in qualche maniera a determinare i livelli circolanti di albumina serica, proprio come accade per IL-6 [3]. Per verificare quest'ipotesi abbiamo studiato la relazione tra albuminemia e massa grassa, supponendo che maggiore fosse la massa grassa maggiore fossero i livelli circolanti di albumina. Tuttavia, i nostri dati non confermano quest'affascinante ipotesi e, in contrasto con quanto atteso, abbiamo osservato una correlazione negativa statisticamente significativa tra i due parametri analizzati, sia nei soggetti sani non infiammati che nei pazienti infiammati in dialisi (Figure 6 e 7). In altre parole, maggiore era la massa grassa, minori erano i livelli circolanti di albumina serica. Noi ipotizziamo che una maggiore massa grassa determini una maggiore produzione di citochine pro-infiammatorie, principalmente di IL-6, che potrebbe sopprimere l'espressione del gene dell'albumina nell'epatocita attraverso una via endocrina, indipendentemente dall'infiammazione sistemica. Supponiamo inoltre che l'IL-6 prodotta dall'adipocita possa inibire, attraverso una via autocrina o paracrina, l'espressione genica e la sintesi di albumina nell'adipocita stesso. Questo meccanismo potrebbe spiegare sia la mancanza di modulazione dell'espressione del gene dell'albumina

nell'adipocita in presenza di infiammazione sistemica, sia la correlazione negativa tra massa grassa e albuminemia sia nei soggetti infiammati che in quelli sani. Al contrario, questo meccanismo non dovrebbe essere operante per proteine infiammatorie come la PCR [5].

Nonostante la mancanza di modulazione del gene albumina da parte dell'infiammazione, questo studio ha osservato qualcosa di veramente nuovo: gli adipociti umani, in passato ritenuti semplici cellule di deposito, possono ora essere considerati vere e proprie cellule attive, che, similmente agli epatociti, sono in grado di produrre diverse proteine, come la PCR, l'IL-6 e l'albumina.

Il perché l'adipocita manifesti un'attività simile agli epatociti non è ancora chiaro. L'ipotesi più affascinante afferma l'esistenza di un continuum cellulare tra le cellule del tessuto adiposo che va da una cellula staminale multipotente a progenitori più maturi [6], passando attraverso i pre-adipociti. Quest'ipotesi potrebbe spiegare perché l'adipocita e l'epatocita condividano l'espressione di alcuni geni, come l'albumina. Come sopra accennato, le cellule mesenchimali derivate dall'adipocita (ADMSC) presentano la capacità di differenziare in molteplici tipi cellulari (neurone, muscolare, osseo, adiposo) e in modo interessante anche in cellule simili agli epatociti [13-15]. Uno studio ha dimostrato che le ADMSC possono differenziare in epatociti funzionali attraverso il trattamento con una mistura di citochine *in vitro* [16], così da diventare una potenziale fonte per la rigenerazione degli epatociti o per il trapianto di cellule epatiche [27]. In un altro interessante lavoro, gli autori mostravano che ADMSC naive erano anche positive per l'albumina, G-6-P e  $\alpha$ 1-antitripsina (AAT), che sono proteine prevalentemente espresse dagli epatociti umani maturi [28].

La nostra idea è che esistono altri affascinanti e ancora sconosciuti meccanismi, oltre alla condivisione della stessa origine cellulare, che

possano riuscire a spiegare perché l'adipocita come l'epatocita produca una proteina così importante come l'albumina.

Concludendo, questo studio mette in luce per la prima volta una nuova attività dell'adipocita oltre a quelle già conosciute; tuttavia, nuovi e ulteriori studi sono necessari per confermare e meglio comprendere i nostri risultati.

## BIBLIOGRAFIA

- [1] A. Schäffler, U. Müller-Ladner, J. Schölmerich, C. Büchler, “Role of adipose tissue as an inflammatory organ in human diseases”, vol.27, no.5, pp. 449-67, 2006.
- [2] S. Thalmann, C.A. Meier, “Local adipose tissue depots as cardiovascular risk factors”, *Cardiovascular Research*, vol. 75, no.4, pp. 690–701, 2007.
- [3] V. Mohamed-Ali, S. Goodrick, A. Rawesh, D.R. Katz, J.M. Miles, J.S. Yudkin, S. Klein, S.W. Coppac, “Subcutaneous Adipose Tissue Releases Interleukin-6, But Not Tumor Necrosis Factor- $\alpha$ , in Vivo”, *J Clin Endocrinol Metab*, vol. 82, no.12, pp. 4196–200, 1997.
- [4] B.E. Wisse, “The Inflammatory Syndrome: The Role of Adipose Tissue Cytokines in Metabolic Disorders Linked to Obesity”, *J Am Soc Nephrol*, vol. 15, no.11, pp. 2792–2800, 2004.
- [5] B. Memoli, A. Procino, P. Calabrò, P. Esposito, G. Grandaliano, G. Pertosa, M. Del Prete, M. Andreucci, S. Di Lillo, G. Ferulano, C. Cillo, S. Savastano, A. Colao, B. Guida, “Inflammation may modulate IL-6 and C-reactive protein gene expression in the adipose tissue: the role of IL-6 cell membrane receptor”, *Am J Physiol Endocrinol Metab*, vol. 293, no.4, pp. 1030–1035, 2007.
- [6] L. Casteilla, C. Dani, “Adipose tissue-derived cells: from physiology to regenerative medicine”, *Diabetes Metab*, vol. 32 (5 Pt1), pp. 393-401, 2006.
- [7] G. Charriere, B. Cousin, E. Arnaud, “Preadipocyte conversion to macrophage. Evidence of plasticity”, *J Biol Chem*, vol. 278, no.11, pp. 9850–9855, 2003.

- [8] M. Sgodda, H. Aurich, S. Kleist, I. Aurich, S. König, M.M. Dollinger, W.E. Fleig, B. Christ, “Hepatocyte differentiation of mesenchymal stem cells from rat peritoneal adipose tissue *in vitro* and *in vivo*”, *Exp Cell Res*, vol. 313, no.13, pp. 2875-86, 2007.
- [9] P.A. Zuk, M. Zhu, P. Ashjian, D.A. De Ugarte, J.I. Huang, H. Mizuno, Z.C. Alfonso, J.K. Fraser, P. Benhaim, M.H. Hedrick, “Human adipose tissue is a source of multipotent stem cells”, *Mol Biol Cell*, vol. 13, no.12, pp. 4279–4295, 2002.
- [10] S.K. Kang, D.H. Lee, Y.C. Bae, H.K. Kim, S.Y. Baik, J.S. Jung, “Improvement of neurological deficits by intracerebral transplantation of human adipose tissue-derived stromal cells after cerebral ischemia in rats”, *Exp Neurol*, vol. 183, no.2, pp. 355–366, 2003.
- [11] A.M. Rodriguez, C. Elabd, F. Delteil, J. Astier, C. Vernochet, P. Saint-Marc, J. Guesnet, A. Guezennec, E.Z. Amri, C. Dani, G. Ailhaud, “Adipocyte differentiation of multipotent cells established from human adipose tissue”, *Biochem Biophys Res Commun*, vol. 315, no.2, pp. 255–263, 2004.
- [12] H. Mizuno, P.A. Zuk, M. Zhu, H.P. Lorenz, P. Benhaim, M.H. Hedrick, “Myogenic differentiation by human processed lipoaspirate cells”, *Plast Reconstr Surg*, vol. 109, no.1, pp. 199–209, 2002.
- [13] R.E. Schwartz, M. Reyes, L. Koodie, Y. Jiang, M. Blackstad, T. Lund, T. Lenvik, S. Johnson, W.S. Hu, C.M. Verfaillie, “Multipotent adult progenitor cells from bone marrow differentiate into functional hepatocyte-like cells”, *J Clin Invest*, vol. 109, no.10, pp. 1291–1302, 2002.
- [14] K.D. Lee, T.K. Kuo, J. Whang-Peng, Y.F. Chung, C.T. Lin, S.H. Chou, J.R. Chen, Y.P. Chen, O.K. Lee, “In vitro hepatic differentiation of human mesenchymal stem cells”, *Hepatology*, vol. 40, no.6, pp. 275–1284, 2004.

- [15] Y. Jiang, B.N. Jahagirdar, R.L. Reinhardt, R.E. Schwartz, C.D. Keene, X.R. Ortiz-Gonzalez, M. Reyes, T. Lenvik, T. Lund, M.D. Blackstad, J.S. Aldrich, A. Lisberg, W.C. Low, D.A. Largaespada, C.M. Verfaillie, "Pluripotency of mesenchymal stem cells derived from adult marrow", *Nature*, vol. 418, no.6893, pp. 41–49, 2002.
- [16] T.W. Evans, "Review article: albumin as a drug—biological effects of albumin unrelated to oncotic pressure", *Aliment Pharmacol Ther*, vol. 16 (Suppl. 5), pp. 6–11, 2002.
- [17] B.R. Don, G. Kaysen, "Serum albumin: relationship to inflammation and nutrition", *Semin Dial*, vol. 17, no. 6, pp. 432-437, 2004.
- [18] R.N. Foley, P.S. Parfrey, J.D. Harnett, G.M. Kent, D.C. Murray, P.E. Barre, "Hypoalbuminemia, cardiac morbidity, and mortality in end-stage renal disease", *J Am Soc Nephrol*, vol.7, no.5, pp.728-736, 1996.
- [19] M.B. Pepys and G.M. Hirschfield, "C-reactive protein: a critical update", *J Clin Invest* vol.111, pp.1805–1812,2003.
- [20] B. Memoli, G. Grandaliano, M. Soccio, L. Postiglione, B. Guida, V. Bisesti, P. Esposito, A. Procino, D. Marrone, A. Michael, M. Andreucci, F.P. Schena, G. Pertosa, "In Vivo Modulation of Soluble "Antagonistic" IL-6 Receptor Synthesis and Release in ESRD", *J Am Soc Nephrol*, vol.16, no. 4, pp. 1099-1107, 2005.
- [21] M.M. Bradford, "A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding", *Anal Biochem*, vol. 72, pp. 248-254, 1976.
- [22] B. Guida, L. De Nicola, P. Pecoraro, R. Trio, F. Di Paola, C. Iodice, V. Bellizzi, B. Memoli, "Abnormalities of bioimpedance measures in overweight and obese hemodialyzed patients", *Int J Obes Relat Metab Disord*, vol. 25, no. 2, pp. 265-72, 2001.
- [23] D.P. Kotler, S. Burastero, J. Wang, R.N. Jr. Pierson, "Prediction of body cell mass, fat-free mass, and total body water with bioelectrical

impedance analysis: effect of race, sex, and disease”, *Am J Clin Nutr*, vol. 64, suppl.3, pp. 489-497, 1996.

[24] R.F. Kushner, A. Kunigk, M. Alspaugh, P.T.Andronis, C.A. Leitch, D.A. Schoeller, “Validation of bioelectrical-impedance analysis as a measurement of change in body composition in obesity”, *Am J Clin Nutr*, vol. 52, no.2, pp. 219- 223, 1990.

[25] A.Piccoli, B. Rossi, L. Pillon, G. Bucciante, “A new method for monitoring body fluid variation by bioimpedance analysis: the RXc graph”, *Kidney Int*, vol.46, no.2, pp. 534-539, 1994.

[26] W. Yoo, J.Lee, S.Park, Y.S. Kim, C. Lim, E. Yoon, G. Hur, J. Oh, “Albumin expression is required for adipocyte differentiation of 3T3-L1 cells”, *Biochem Biophys Res Commun*, vol. 397, no.2, pp. 170–175, 2010.

[27] M.J. Seo, S.Y. Suh, Y.C. Bae, J.S. Jung, “Differentiation of human adipose stromal cells into hepatic lineage in vitro and in vivo”, *Biochem Biophys Res Commun*, vol. 328, no.1, pp. 258-64, 2005.

[28] R. Zemel, L. Bachmetov, D. Ad-El, A. Abraham, R. Tur-Kaspa, “Expression of liver-specific markers in naive adipose-derived mesenchymal stem cells”, *Liver International*, vol. 29, no. 9, pp. 1326-1337, 2009.



## TABELLE

**Tabella 1.**

Primers	Senso	Antisenso
ALBUMIN	CTTGAATGTGCTGATGACAGG	GCAAGTCAGCAGGCATCTCAT
$\beta$ -ACTIN	CACCATGGATGATGATATCG	TGGATAGCAACGTACATGG

Sequenza di nucleotidi disegnata per questo studio

## Tabella 2

*Caratteristiche demografiche e antropometriche di 12 soggetti sottoposti a biopsia del tessuto adiposo*

	Soggetti Non Infiammati	Pazienti infiammati cronici	Valore della P
N	6	6	NS
Sesso (M/F)	4/2	3/3	NS
Età, anni (range)	43.2±4.0 (39-48)	42.9±3.9 (34-49)	NS
Peso Corporeo, kg (range)	74.8±10.6 (62.9-88.2)	75.3±11.1 (63.2-90.7)	NS
BMI, kg/m <sup>2</sup> (range)	25.8±1.6 (24.8-28.1)	26.3±1.2 (24.6-28.7)	NS
Circonf. Vita, cm(range)	90.9±4.6 (83-106)	92.1±6.1 (79-108)	NS
Rapp.Vita Fianchi (range)	0.82±0.11 (0.53-1.21)	0.88±0.15 (0.65±1.28)	NS
PCR, mg/l (range)	2.18±0.54 (1.6-3.0)	7.26±3.26 (4.1-14.6)	p<0.01
IL-6, pg/ml (range)	2.79±1.26 (1.3-4.9)	25.19±11.85 (10.3-40.3)	p<0.01

I valori sono espressi come medie ±SD; M, maschi; F, femmine; NS, non significativo; PCR, Proteina C Reattiva.

## FIGURE

Figura 1

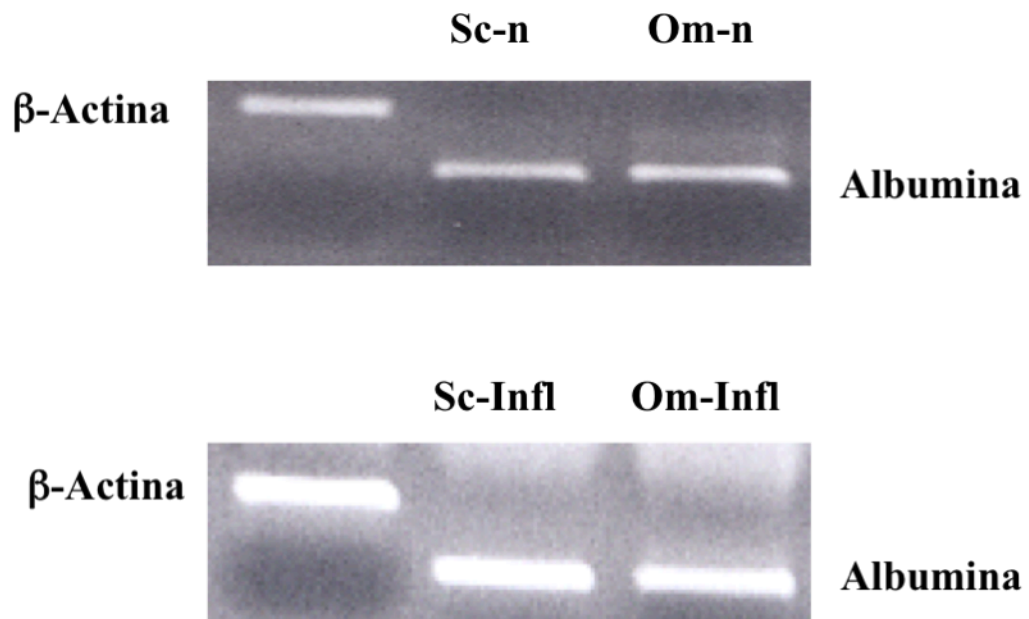


Fig.1 Espressione genica dell'Albumina ottenuta mediante RT-PCR negli adipociti sottocutanei (Sc) ed Omentali (Om) di soggetti sani (Sc-n e Om-n, rispettivamente) e pazienti infiammati (Sc-infl e Om-infl, rispettivamente). E' riportata anche l'espressione del gene della  $\beta$ -Actina come controllo.

**Figura 2**

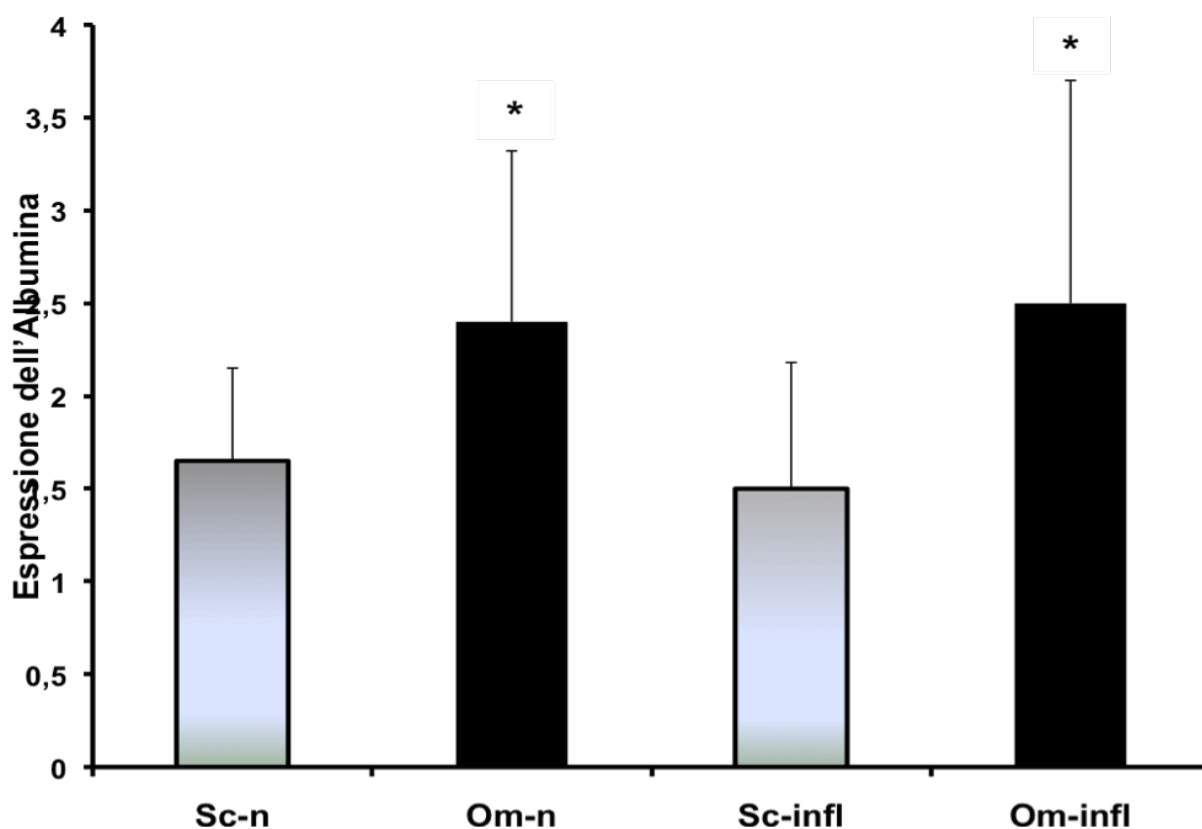


Fig.2. Espressione genica dell'Albumina negli adipociti estratti da diversi siti di tessuto adiposo, ottenuta tramite analisi Real-Time PCR. Le colonne mostrano l'espressione relativa dell'mRNA dell'albumina negli adipociti provenienti da frammenti di tessuto adiposo sottocutaneo (Sc, barre grigie) ed omentale (Om, barre nere) di soggetti sani non infiammati (Sc-n e Om-n rispettivamente) confrontati con quella osservata negli adipociti provenienti da frammenti di tessuto adiposo Sc ed Om di pazienti infiammati (Sc-Inf e Om-Inf, rispettivamente). I valori sull'asse delle Y rappresentano unità arbitrarie derivate da valori di espressione media del gene dell'albumina. I valori sono espressi in unità arbitrarie come medie  $\pm$  DS di 12 esperimenti.

\*  $p < 0.05$  confrontato con Sc-Inf e Sc-n.

**Figura 3**

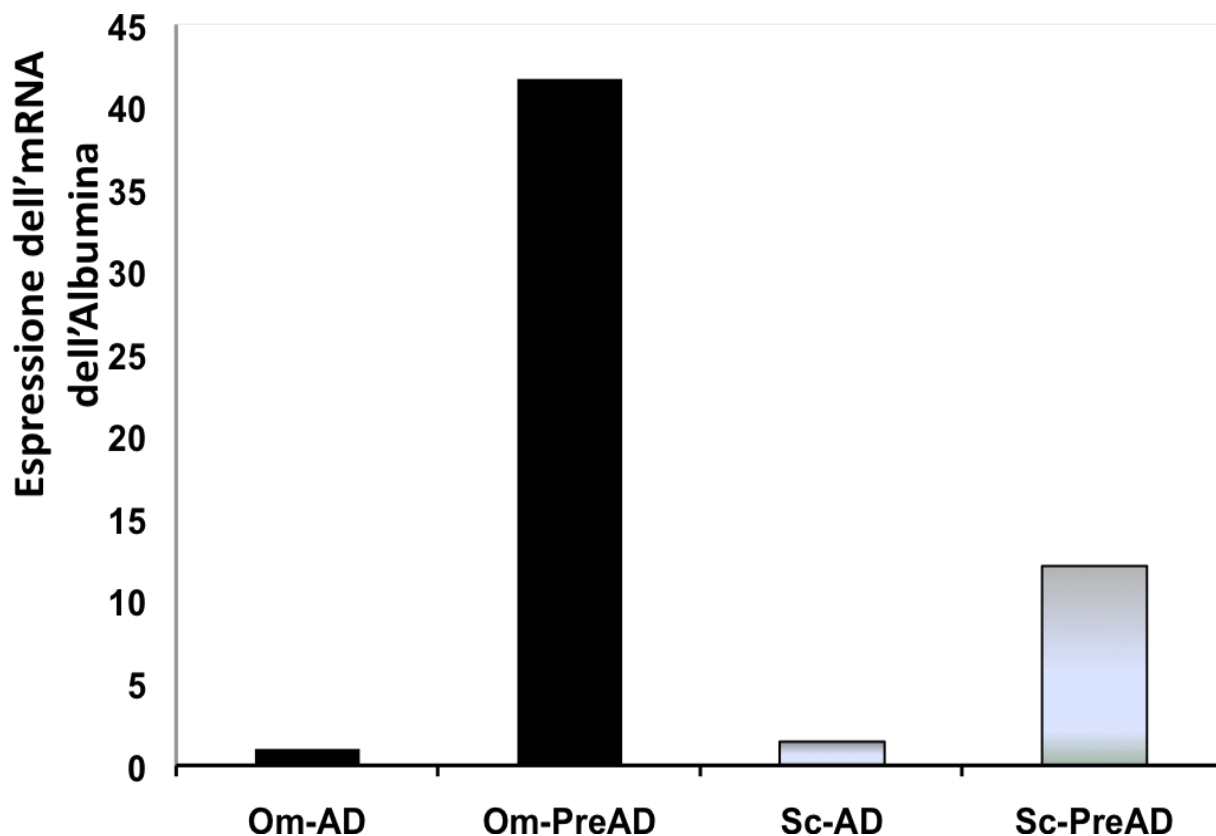


Fig.3 Espressione del gene dell'Albumina negli adipociti e preadipociti estratti da diversi siti di tessuto adiposo di un solo soggetto sano non infiammato, rappresentativo di sei esperimenti per tutti i soggetti arruolati, ottenuto mediante analisi Real-Time PCR. Le colonne mostrano l'espressione relativa dell'mRNA dell'albumina negli adipociti (AD) e preadipociti (PreAD) sottocutanei (Sc, barre grigie) ed omentali (Om, barre nere) di un singolo soggetto sano, come rappresentativo. I valori sull'asse delle Y rappresentano unità arbitrarie derivate dal valore medio di espressione del gene dell'albumina.

**Figura 4**

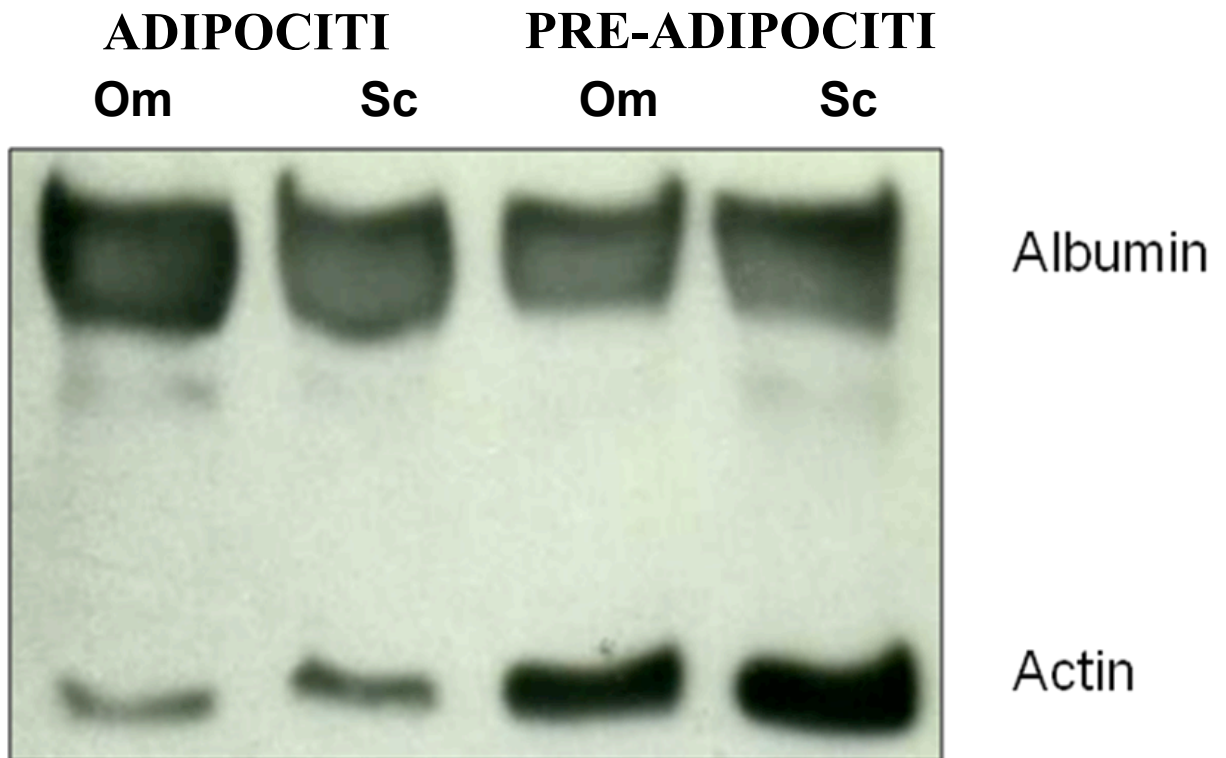


Fig.4. Immunoblot rappresentativo dell'espressione proteica dell'albumina negli adipociti e preadipociti isolati da un controllo sano non infiammato. L'actina è la proteina controllo.

**Figura 5**

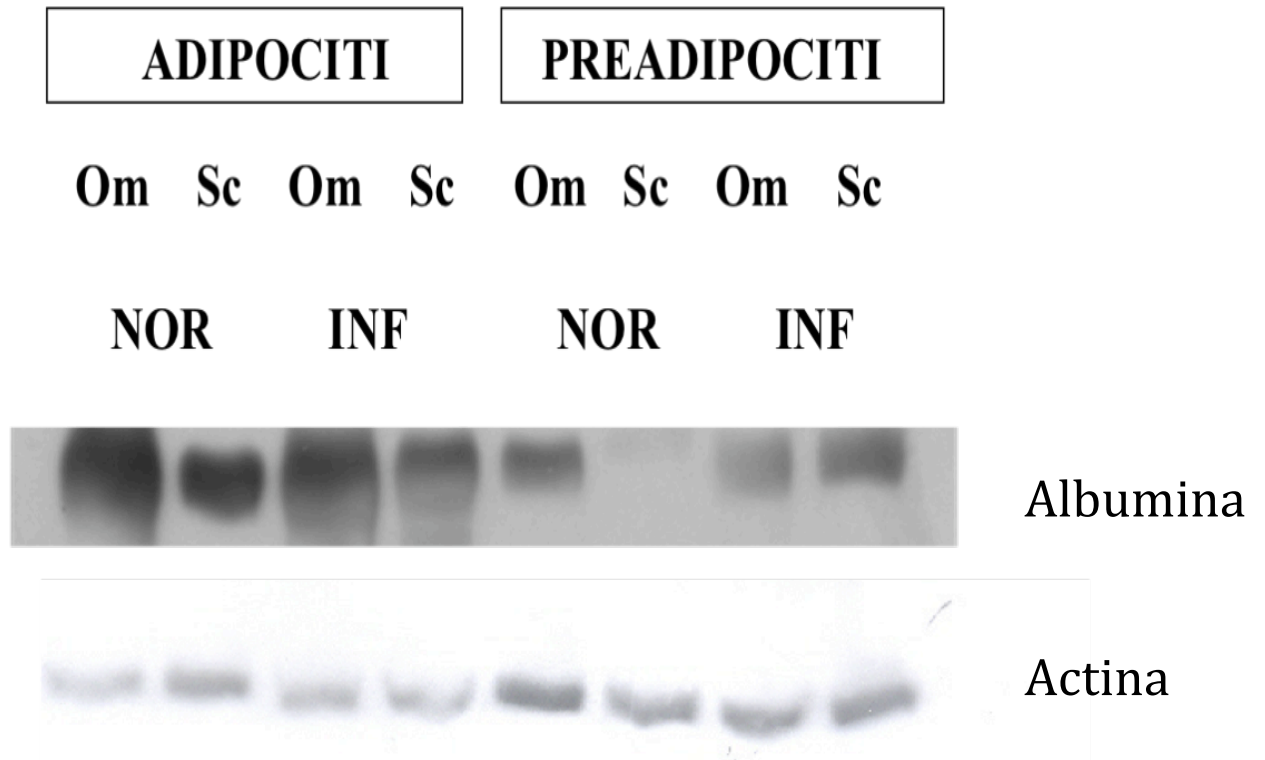


Fig.5. Immunoblot rappresentativo dell'espressione proteica dell'albumina negli adipociti e preadipociti Om e Sc isolati da pazienti infiammati (INF) e controlli non infiammati (NOR). L'Actina è stata usata come proteina controllo.

Figura 6

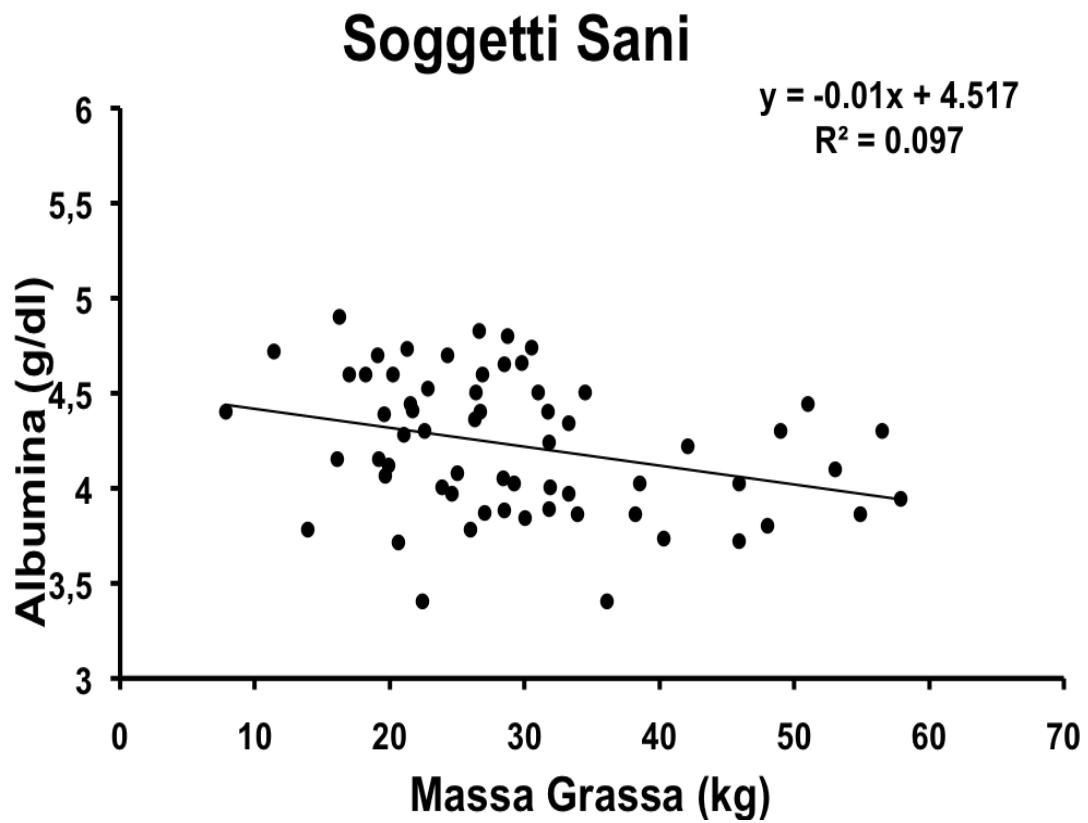


Fig.6. Associazione negativa tra livelli circolanti di Albumina e Massa grassa. I livelli circolanti di Albumina e la massa grassa sono stati misurati in 63 soggetti sani non infiammati. La correlazione è significativa a 0.05 (2 code).  $R = -0.312$ .



Figura 7

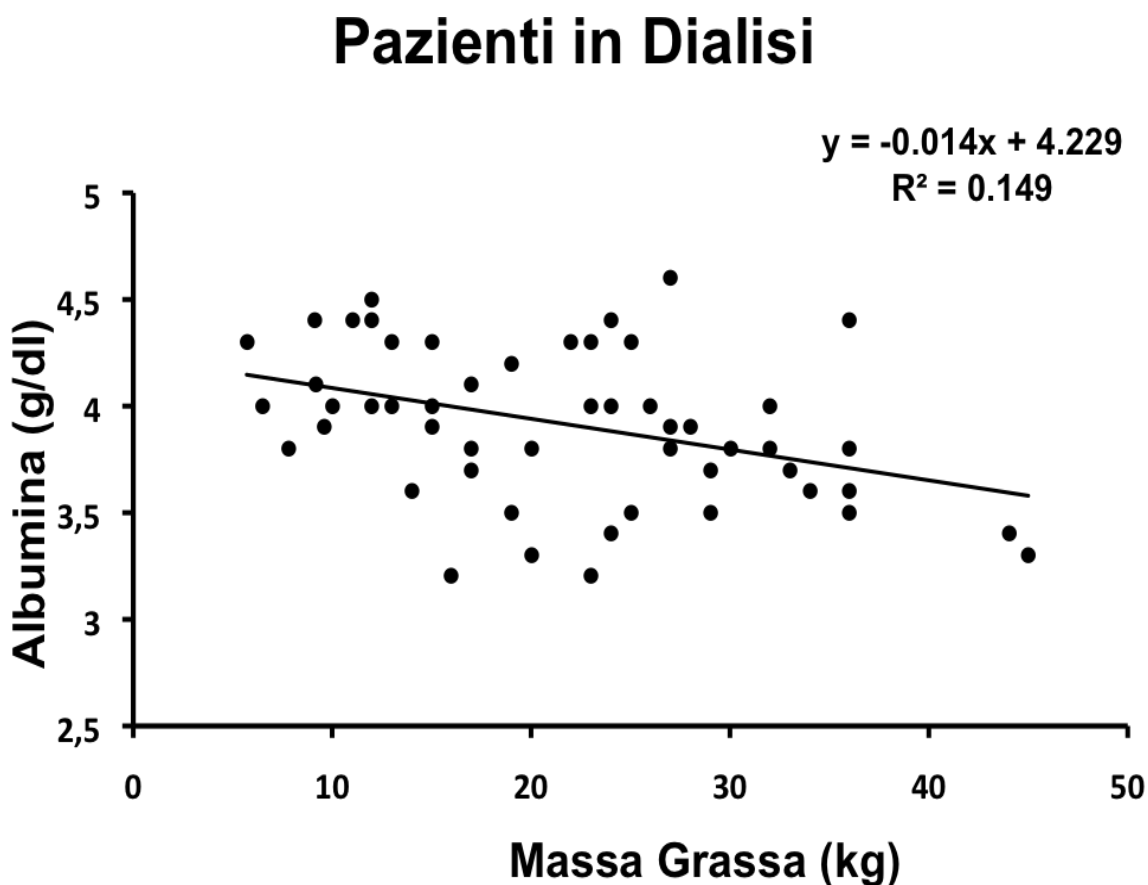


Fig.7. Associazione negativa tra Albumina circolante e Massa Grassa. I livelli circolanti di Albumina e la massa grassa sono stati misurati in 54 pazienti dializzati infiammati. La correlazione è significativa a 0.01 (2-code).  $R=-0.391$ .

