

**UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI MILANO-BICOCCA**

**Scuola di Medicina e Chirurgia**

**Dipartimento di Chirurgia e Medicina Traslazionale**

**Dottorato di Ricerca in Neuroscienze**

**- Ciclo XXVI -**



**EFFETTO DI DIVERSE SOSTANZE SUL  
DIFFERENZIAMENTO MESENGENICO DI CELLULE  
STAMINALI MESENCHIMALI UMANE**

Coordinatore: Chiar.mo Prof. Guido CAVALETTI

Tutor: Dott.ssa Mariarosaria MILOSO

Tesi di Dottorato di:

Dott.ssa Cristina CALDARA

Matricola 059008

Anno Accademico 2012-2013

# INDICE

RIASSUNTO E SCOPO DEL LAVORO.....	5
INTRODUZIONE.....	9
1. CELLULE STAMINALI MESENCHIMALI .....	9
1.1 Caratteristiche delle cellule staminali mesenchimali <i>in vitro</i> .....	10
1.2 Differenziamento nei lineages mesengeni da parte delle MSC.....	12
1.2.1 Differenziamento condrogenico .....	12
1.2.2 Differenziamento osteogeno .....	12
1.2.3 Differenziamento adipogenico .....	16
2. MITOGEN ACTIVATED PROTEIN KINASES (MAPKs) .....	23
2.1 Meccanismo di attivazione delle MAPKs.....	24
2.2 ERK1/2 .....	24
2.2.1 Ruolo di ERK1/2 nel differenziamento adipogenico .....	25
2.2.2 Ruolo di ERK1/2 nel differenziamento osteogenico .....	27
3. WNT SIGNALING .....	28
3.1 Canonical Wnt signaling pathway .....	28
3.2 Noncanonical Wnt signaling pathway .....	30
4. OBESITA' .....	34
4.1 Diagnosi .....	34
4.2 Epidemiologia .....	34
4.3 Obesità come fattore di rischio .....	35
4.4 Eziopatogenesi .....	36
4.6 Terapie .....	37
5. OSTEOPOROSI .....	40
5.1 La diagnosi .....	40
5.2 Fattori di rischio .....	41
5.3 Le terapie .....	41
5.3.1 Terapia non farmacologica .....	41
5.3.2 Terapia farmacologica .....	41
6. CORRELAZIONI TRA OBESITA' E OSTEOPOROSI .....	43
6.1 Citochine pro-infiammatorie nell'obesità .....	44
6.2 Citochine pro-infiammatorie aumentano il riassorbimento osseo .....	46
6.3 Fattori che regolano la selezione tra osteoblastogenesi e adipogenesi .....	46

6.3.1 PPAR $\gamma$ PATHWAY .....	46
6.3.2 C/EBP- $\beta$ PATHWAY .....	46
6.3.3 WNT SIGNALING PATHWAY .....	46
7. VALPROICO e VALPROMIDE .....	49
8. BERBERINA .....	52
9. HIBISCUS SABDARIFFA .....	55
10. RESVERATROLO .....	58
MATERIALI E METODI	
1. COLTURA E DIFFERENZIAMENTO DI MSCs UMANE (hMSCs) .....	61
1.1 Estrazione e coltura di hMSCs da midollo osseo umano .....	61
1.2 Congelamento e scongelamento delle hMSC .....	62
1.3 Caratterizzazione immunofenotipica attraverso l'analisi citofluorimetrica ...	62
1.4 Induzione del differenziamento adipogenico di hMSC .....	63
1.5 Introduzione del differenziamento osteogenico di hMSC .....	64
1.6 Induzione del differenziamento condrogenico di hMSC .....	64
1.7 Trattamento con Acido valproico, Valpromide, Berberina, Hibiscus Sabdariffa e Resveratrolo nel differenziamento adipogenico e osteogenico .....	65
2. VALUTAZIONE MORFOLOGICA DEI DIFFERENZIAMENTI .....	66
2.1 Colorazione con Oil Red O .....	66
2.2 Quantizzazione di Oil Red O .....	66
2.3 Colorazione con Alizarin Red S .....	67
2.4 Quantizzazione di Alizarin Red S .....	67
2.5 Processamento dei pellet e colorazione di Safranin O .....	67
3. MTT ASSAY .....	68
4. SRB ASSAY .....	69
5. ANALISI DELL'ESPRESSIONE PROTEICA DI hMSCs .....	69
5.1 Preparazione di estratti proteici totali .....	69
5.2 Elettroforesi su gel di poliacrilammide (SDS-PAGE) e trasferimento su filtro di nitrocellulosa .....	70
5.3 Immunoblotting .....	71
5.4 Reazione di chemiluminescenza .....	73
6. ANALISI DELL'ESPRESSIONE GENICA DI hMSCs .....	73
6.1 Preparazione di estratti di RNA totale .....	73
6.2 Retrotrascrizione e real time PCR .....	74

7. ANALISI DEL DIFFERENZIAMENTO ADIPOGENICO	
MEDIANTE CITOFLUORIMETRIA .....	75
8. ANALISI STATISTICA .....	76
9. MATERIALI UTILIZZATI .....	77
RISULTATI .....	78
1.1 ESTRAZIONE E COLTURA DI CELLULE STAMINALI MESENCHIMALI	
UMANE .....	78
1.2 Caratterizzazione immunofenotipica delle hMSC .....	79
1.3 Differenziamento delle MSC lineage mesengenci .....	82
1.3.1 Differenziamento adipogenico .....	82
1.3.2 Differenziamento osteogenico .....	83
1.3.3 Differenziamento condrogenico .....	84
2. VALUTAZIONE DELLA TOSSICITA' .....	86
2.1 Test di vitalità su hMSC indifferenziate .....	86
2.1.1 MTT assay .....	87
2.1.2 SRB assay .....	88
2.2 Test di vitalità su hMSC differenziate in senso adipogenico .....	90
2.2.1 MTT assay .....	91
2.2.2 SRB assay .....	92
2.3 Test di vitalità su hMSC differenziate in senso osteogenico .....	94
2.3.1 MTT assay .....	94
2.3.2 SRB assay .....	96
3. EFFETTO DI AVP, VPM, BRB, HIB E RESV	
SUL DIFFERENZIAMENTO ADIPOGENICO DI hMSC .....	99
4. VALUTAZIONE DEL DIFFERENZIAMENTO ADIPOGENICO	
MEDIANTE NILE RED .....	104
5. EFFETTO DELLE SOSTANZE SUL DIFFERENZIAMENTO ADIPOGENICO	
AGGIUNTE A TEMPI DIVERSI .....	108
5.1 Acido valproico .....	108
5.2 Valpromide .....	108
5.3 Hibiscus sabdariffa .....	109
6. EFFETTO DI AVP, VPM, BRB, HIB E RESV	
SUL DIFFERENZIAMENTO OSTEOGENICO DI hMSC .....	110

7. EFFETTO DELLE SOSTANZE SUL DIFFERENZIAMENTO OSTEOGENICO	
AGGIUNTE A DIVERSI TEMPI .....	115
7.1 Acido valproico .....	115
7.2 Valpromide .....	116
7.3 Hibiscus Sabdariffa .....	116
8. STUDIO DEL LIVELLO DI FOSFORILAZIONE DI ERK1/2 .....	118
8.1 Differenziamento adipogenico .....	118
8.2 Differenziamento osteogenico .....	121
9. STUDIO DEL LIVELLO DI FOSFORILAZIONE DI GSK-3 $\beta$ .....	124
9.1 Differenziamento adipogenico .....	124
9.2 Differenziamento osteogenico .....	126
10. STUDIO DEL LIVELLO DI ESPRESSIONE DI $\beta$ -CATENINA .....	128
10.1 Differenziamento adipogenico .....	128
10.2 Differenziamento osteogenico .....	129
11. ANALISI qPCR - DIFFERENZIAMENTO ADIPOGENICO .....	132
12. ANALISI RT-PCR - DIFFERENZIAMENTO OSTEOGENICO .....	134
DISCUSSIONE .....	138
BIBLIOGRAFIA .....	146
PRESENTAZIONI A CONGRESSI .....	161

# **RIASSUNTO E**

## **SCOPO DEL LAVORO**

Esiste una stretta correlazione tra obesità e osteoporosi: nell'obesità si riscontra una maggiore fragilità ossea ed un ridotto assorbimento di calcio a livello intestinale, mentre l'osteoporosi è spesso accompagnata da un aumento dell'adipogenesi midollare. In questi ultimi anni un'area della ricerca scientifica si è concentrata sullo studio di nuovi farmaci/sostanze in grado di agire sull'adipogenesi o sull'osteoblastogenesi in quanto è fondamentale trovare nuove terapie che prevenivano tali patologie. Conoscendo la stretta relazione tra il differenziamento adipogenico e osteogenico, un farmaco contro l'obesità non dovrebbe avere effetti sul metabolismo osseo, mentre contro l'osteoporosi non dovrebbe avere effetti sull'adipogenesi.

A tale proposito gli studi *in vitro* rappresentano un punto importante sia per valutare l'effetto di tali sostanze che per comprendere i meccanismi alla base delle loro azioni. La maggior parte degli studi condotti sul differenziamento adipocitico, e sulla sua inibizione, sono stati condotti su linee di preadipociti murini (3T3-L1) o umani, mentre sono state utilizzate linee murine MC3T3-E1 e C3H10T1/2 per il differenziamento osteogenico.

Nonostante la rilevanza dei dati ottenuti grazie a questi modelli cellulari, i risultati sono spesso controversi, anche in considerazione del fatto che i processi differenziativi nell'uomo e nei roditori possono essere regolati a livello molecolare in modo significativamente diverso. Inoltre questi modelli sono basati su cellule già indirizzate verso il differenziamento adipocitico o osteogenico, e quindi non prendono in considerazione il processo di determinazione che porta la cellula progenitrice ed indifferenziata verso un lineage mesengenic. Le cellule staminali mesenchimali (MSC) in questo contesto rappresentano un modello cellulare particolarmente utile in quanto possono essere efficacemente indotte da uno stato indifferenziato allo stato di adipociti o osteoblasti, di cui peraltro rappresentano fisiologicamente i precursori biologici.

Lo scopo di questa tesi è stato quello di valutare l'effetto di Acido Valproico (AVP), Valpromide (VPM), Berberina (BRB), Hibiscus Sabdariffa (HIB) e Resveratrolo (RESV) sul differenziamento adipogenico e osteogenico di cellule staminali mesenchimali umane (hMSC).

Le hMSC utilizzate in questo studio sono state caratterizzate e corrispondono ai criteri minimi stabiliti dalla letteratura (*Dominici et al., 2006*) per poterle definire MSC. Tre le condizioni necessarie: capacità di aderire alla plastica assumendo una morfologia simil-fibroblastica; negatività per i marker ematopoietici CD34 e CD45 e positività per i marker CD29, CD90, CD105 e

CD73; capacità, sotto opportune condizioni di coltura, di differenziare nei *lineage* mesengenicici ovvero in osteoblasti, condroblasti ed adipociti.

Questo lavoro si è articolato in 5 fasi:

### **1) Valutazione della tossicità delle diverse sostanze.**

Per valutare la tossicità delle sostanze precedentemente elencate, le hMSC indifferenziate e le MSC differenziate in senso adipogenico e osteogenico sono state trattate con ciascuna delle diverse sostanze a differenti concentrazioni e sono stati effettuati saggi di vitalità. Sono stati condotti due tipi di test: MTT assay, che valuta l'attività mitocondriale come indicatore della vitalità cellulare e SRB assay, che valuta il contenuto proteico per stimare il numero delle cellule vitali. Sulla base dei risultati ottenuti sono state individuate le concentrazioni non tossiche dei diversi composti da utilizzare negli esperimenti successivi.

### **2) Effetto delle diverse sostanze sul differenziamento adipogenico e osteogenico.**

A partire da hMSC indifferenziate è possibile studiare l'intero processo adipogenico trattando le cellule con un terreno (DMEM high glucose) di induzione contenente fattori adipogenici (desametasone 1 $\mu$ M, indometacina/isobutilmetilxantina 100 $\mu$ M/500 $\mu$ M, insulina 10 $\mu$ g/ml) per i primi 10 giorni e successivamente, fino al 28° giorno, con un terreno di mantenimento (contenente insulina 10 $\mu$ g/ml) per la maturazione in senso adipogenico.

Le diverse sostanze sono state somministrate alle hMSC sin dal momento dell'induzione e portate fino al 28° giorno di differenziamento adipogenico. L'effetto anti-adipogenico è stato valutato mediante colorazioni istologiche specifiche per i trigliceridi presenti nei depositi lipidici degli adipociti: la colorazione con Oil Red O per osservare la morfologia cellulare mentre la colorazione Nile Red, esaminata mediante citofluorimetro a flusso, per determinare il numero di cellule differenziate. I risultati dimostrano che AVP, BRB, HIB e RESV presentano un effetto anti-adipogenico, mentre VPM non ha dimostrato avere effetto sul differenziamento adipogenico. Successivamente è stato valutato l'effetto di AVP, VPM e HIB aggiunte dopo 3, 7, 10, 14 e 21 giorni dall'induzione adipogenica e analizzate tutte al 28°giorno. Con questi dati abbiamo dimostrato che solo AVP ha un effetto anti-adipogenico, anche quando viene aggiunto dopo 3 o 7 giorni dall'induzione. L'aggiunta di VPM e HIB a tempi diversi dall'induzione non ha portato a delle variazioni significative rispetto alle hMSC indotte con solo il terreno adipogenico.

Per il differenziamento osteogenico le hMSC sono state trattate con uno specifico terreno (DMEM low glucose) contenente fattori osteogenici (desametasone 100nM, acido ascorbico 2-fosfato 50 $\mu$ M e  $\beta$ glicerolo 2-fosfato10mM) fino al 28° giorno. La valutazione del differenziamento osteogenico è stata effettuata mediante la colorazione istologica Alizarin red S, che evidenzia la deposizione di calcio mineralizzato.

Le diverse sostanze, alle dosi precedentemente scelte, sono state aggiunte inizialmente al terreno osteogenico delle hMSC e portate fino al 28°giorno di trattamento. Da questi esperimenti abbiamo ottenuto risultati differenti per le diverse sostanze valutate. AVP e VPM determinano un precoce differenziamento osteogenico delle hMSC rispetto alle cellule trattate con solo il terreno di differenziamento. Infatti in presenza di AVP e VPM il differenziamento si osserva già dopo 10gg rispetto alle cellule trattate con solo terreno osteogenico. BRB e HIB presentano invece un effetto anti-osteogenico, poichè con l'aggiunta di queste sostanze nel terreno non si osserva deposito di matrice mineralizzata e la colorazione istologica risulta negativa. Le cellule trattate con RESV non mostrano differenze significative rispetto alle cellule trattate con solo terreno osteogenico. Successivamente per AVP, VPM e HIB è stato valutato l'effetto della sostanza aggiunta dopo 3, 7, 10, 14 e 21 giorni dall'induzione osteogenica e analizzate tutte al 28°giorno. Da questi dati abbiamo dimostrato che HIB ha un effetto anti-osteogenico anche quando aggiunta dopo 3, 7, 10 e 14 giorni dall'induzione. L'aggiunta di AVP e VPM a tempi diversi dall'induzione non ha portato variazioni significative rispetto alle hMSC indotte con solo il terreno osteogenico.

### **3) Valutazione dell'effetto delle sostanze sulla fosforilazione di ERK1/2 durante il differenziamento adipogenico e osteogenico.**

Mediante esperimenti di immunoblotting abbiamo studiato la fosforilazione (forma attiva) di ERK1/2 per poter capire i meccanismi molecolari alla base delle azioni di tali sostanze nei due diversi differenziamenti.

Nelle hMSC, trattate per il differenziamento adipogenico con l'aggiunta di AVP, VPM, BRB, HIB e RESV non si sono osservate variazioni significative nella fosforilazione di ERK1/2 rispetto alle hMSC indotte con solo il terreno adipogenico.

Nel differenziamento osteogenico abbiamo osservato a 10giorni una riduzione significativa della forma fosforilata di ERK1 nelle cellule trattate con VPM o BRB rispetto alle cellule trattate con solo terreno osteogenico; la forma fosforilata di ERK2 non varia. A 14giorni solo le cellule trattate con terreno osteogenico e BRB presentano una riduzione significativa di entrambe le forme pERK1/2 rispetto alle cellule trattate con solo terreno osteogenico.

### **4) Valutazione dell'effetto di Acido Valproico, Valpromide e Hibiscus Sabdariffa sui livelli di fosforilazione di GSK3 $\beta$ e di espressione di $\beta$ catenina.**

Per comprendere meglio il meccanismo d'azione di AVP, VPM e HIB abbiamo studiato, mediante esperimenti di immunoblotting, i livelli di fosforilazione (forma inattiva) di GSK3 $\beta$  e i livelli di espressione di  $\beta$ catenina nelle hMSC trattate per il differenziamento adipogenico e osteogenico con l'aggiunta delle tre sostanze.

Per quanto riguarda il differenziamento adipogenico solo a 3giorni di induzione abbiamo osservato nelle hMSC indotte al differenziamento con l'aggiunta di AVP un aumento significativo di pGSK3 $\beta$ , rispetto alle hMSC trattate con solo il terreno adipogenico. Analizzando i livelli di  $\beta$ catenina a 12ore, 1, 3giorni non abbiamo rilevato variazioni significative tra le hMSC indotte al differenziamento adipogenico sia in presenza che in assenza delle sostanze.

Analizzando i dati relativi al confronto tra le hMSC indotte al differenziamento osteogenico, in presenza o assenza delle sostanze, non abbiamo riscontrato differenze significative nei livelli di pGSK3 $\beta$  per tutti i tempi analizzati. Abbiamo osservato una riduzione significativa nei livelli di  $\beta$ catenina a 3, 10 e 14giorni in hMSC trattate per il differenziamento osteogenico con l'aggiunta di AVP, mentre solo a 10giorni si osserva una riduzione significativa di  $\beta$ catenina anche per le hMSC trattate con VPM rispetto alle hMSC indotte con solo terreno osteogenico.

#### **5) Valutazione dell'effetto di Acido Valproico, Valpromide e Hibiscus Sabdariffa sull'espressione genica di C/EBP $\beta$ , PPAR $\gamma$ , RUNX2 e OSTERIX.**

Infine è stato valutato, mediante qPCR, l'effetto di AVP, VPM e HIB sull'espressione genica di C/EBP $\beta$ , PPAR $\gamma$ , RUNX2 e OSTERIX (importanti fattori trascrizionali adipogenici e osteogenici) durante il differenziamento adipogenico e osteogenico di hMSC. Dai risultati ottenuti si osserva che le hMSC indotte al differenziamento adipogenico con l'aggiunta di AVP hanno dei livelli di espressione significativamente maggiori per C/EBP $\beta$  e significativamente minori per PPAR $\gamma$  rispetto alle hMSC indotte con solo terreno adipogenico.

Durante il differenziamento osteogenico si osserva un aumento significativo di Runx2 nelle hMSC trattate con AVP rispetto alle hMSC indotte con solo terreno osteogenico.

L'analisi dei nostri risultati ha evidenziato che la sostanza più promettente per un eventuale uso terapeutico sembra essere l'Acido Valproico perché, oltre ad inibire il differenziamento adipogenico, sembra avere un effetto pro-osteogenico sulle hMSC indotte al differenziamento osteogenico anche se saranno necessari ulteriori studi per comprendere a pieno il meccanismo d'azione di tale sostanza.

# ***INTRODUZIONE***

## **1. CELLULE STAMINALI MESENCHIMALI**

Le cellule staminali adulte (Adult Stem Cells, ASCs) sono cellule staminali multipotenti residenti in specifici compartimenti tissutali, in grado di rinnovarsi e di differenziare in specifici tipi cellulari. Possiedono la capacità di mantenere l'omeostasi cellulare dei tessuti di origine, sia in condizioni fisiologiche che patologiche e sono fondamentali per il normale *turnover* cellulare. L'attività proliferativa può presentare variazioni quantitative da tessuto a tessuto: in tessuti a rapido rinnovamento (come le cellule ematopoietiche e gli epitelii) è più intensa, mentre in altri tessuti più stabili (osso, muscolo) essa è meno frequente e spesso legata a fenomeni di riparazione o rigenerazione post-traumatica (*Weissman et al., 2001*).

Le cellule staminali mesenchimali (Mesenchymal Stem Cells, MSC) sono cellule staminali adulte multipotenti presenti a livello del tessuto osseo e che sono capaci di autorinnovarsi e differenziarsi in cellule specializzate del *lineage* mesenchimale (Fig1) come osteoblasti, condroblasti e adipociti (*DiMarino et al., 2013*). Le MSC svolgono inoltre un importante ruolo come cellule di supporto della nicchia ematopoietica. Infatti garantiscono un supporto meccanico e trofico al sistema cellulare ematopoietico secernendo proteine della matrice extracellulare come fibronectina, laminina, collagene ed proteoglicani e producendo fattori di crescita ematopoietici tra cui chemochine e citochine (*Devine and Hoffman 2000*). Le MSC regolano il *self-renewal*, l'*homing*, la proliferazione e il differenziamento delle cellule staminali ematopoietiche (Hematopoietic Stem Cells, HSC).

La necessità dell'organismo delle MSC quindi cambia drammaticamente in dipendenza di fattori come l'età dell'individuo (*Caplan, 2004*). Dalla nascita al decimo anno di età, l'aumento delle dimensioni delle diverse parti del corpo coinvolge la diretta conversione delle MSC in fenotipi differenziati. A differenza delle HSC, che mantengono dei titoli ed una potenza relativamente costanti dalla nascita alla tarda età, la quantità di MSC diminuisce di uno o due ordini di grandezza nel corso della vita dell'individuo, sottolineando così la diversa definizione e biologia funzionale delle MSC rispetto alle HSC (*Bonyadi et al., 2003*). Infatti, le MSC vengono mobilizzate dal midollo osseo in caso di danno tissutale, al fine di garantire la rigenerazione dei tessuti lesi; le HSC invece vengono continuamente mobilizzate dal midollo osseo in condizioni fisiologiche per rinnovare il pool di cellule ematiche circolanti.

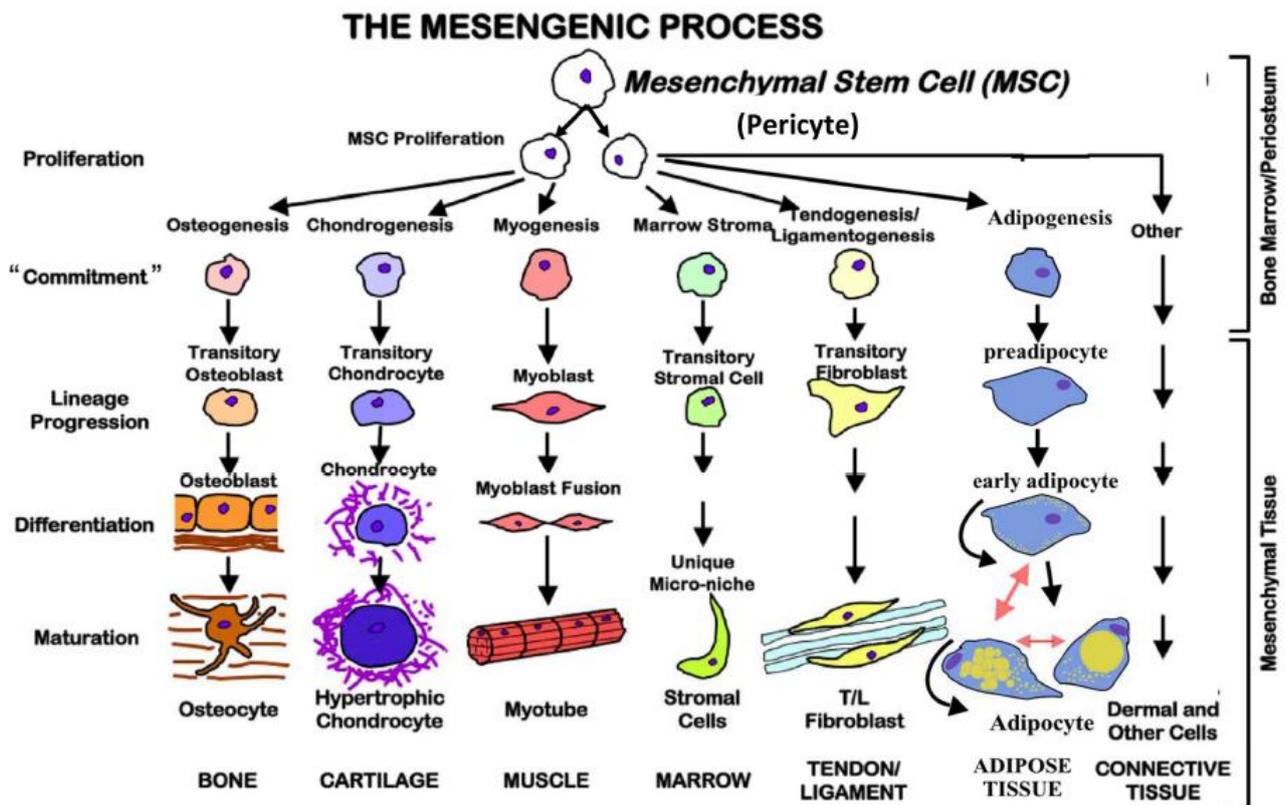


Fig1 Il processo mesengenico contribuisce all'entrata delle cellule mesenchimali progenitrici in distinti lineage pathways (DiMarino et al., 2013)

## 1. 1 Caratteristiche delle cellule staminali mesenchimali *in vitro*

Le cellule staminali mesenchimali sono contenute all'interno dello stroma midollare. Uno dei problemi che si incontrano nell'utilizzo in campo clinico di queste cellule è la loro scarsa presenza nel midollo (0.001%-0.01%) (Tondreau et al., 2005). Quindi, per poter essere utilizzate, devono essere prelevate ed espanse *in vitro* per raggiungere un numero clinicamente rilevante. Le MSC sono caratterizzate da una morfologia simil-fibroblastica, con un aspetto fusiforme ed un grosso nucleo tondeggiante.

Le MSC possono essere caratterizzate sulla base dell'espressione di *marker* di superficie, ma non sono stati ancora identificati uno o più marker che in maniera univoca definiscano le MSC. Per questo motivo, recentemente sono stati stabiliti da un'apposita commissione internazionale tre criteri ai quali le cellule devono rispondere per essere definite MSC (Dominici et al., 2006):

1. in condizioni standard di coltura, devono aderire alla plastica assumendo una morfologia simil-fibroblastica e devono essere dotate di un'estesa capacità proliferativa;
2. in opportune condizioni di coltura, le MSC devono essere in grado di differenziare nei lineage mesengenici ovvero in osteoblasti, condroblasti ed adipociti;

3. le MSC devono essere negative per i *marker* delle staminali ematopoietiche CD11b, CD33, CD34, CD45, CD133 e positive per CD29, CD44, CD73, CD90, CD105, CD106, CD117, CD166.

Con i successivi passaggi *in vitro* e a lungo termine, le cellule subiscono un arresto della crescita associato alla senescenza, noto come “senescenza replicativa” (Baxter *et al.*, 2004). La senescenza replicativa è una caratteristica delle MSC coltivate *in vitro*, che limita la loro capacità di generare un ampio numero di cellule richieste per la terapia. Tale processo è legato a diversi fattori, tra cui il progressivo accorciamento dei telomeri durante continue subculture *in vitro* (Baxter *et al.*, 2004), o l’assenza di attività telomerasica (Zimmermann *et al.*, 2003). Non è ancora chiaro se l’assenza di attività telomerasica in cellule staminali mesenchimali dipenda dalla natura delle cellule stesse, dalle condizioni di coltura o dal metodo di isolamento (Jiang *et al.*, 2002).

## **1.2 Differenziamento nei lineages mesengenicici da parte delle MSC**

In opportune condizioni di coltura le MSC sono in grado di differenziare nei *lineage* mesengenicici cioè di differenziare in senso adipogenico, osteogenico e condrogenico.

### **1.2.1 Differenziamento condrogenico**

La cartilagine è costituita da cellule denominate condroblasti e condrociti, immerse in un'abbondante matrice extracellulare semi rigida contenente la sostanza fondamentale che conferisce le caratteristiche di resistenza meccanica ed elasticità, tipiche del tessuto cartilagineo.

I condroblasti sono i precursori della cartilagine, e sono in grado di sintetizzare le componenti della matrice extra-cellulare. Questa è costituita da una componente amorfa, la sostanza fondamentale, e da una componente fibrillare, costituita da fibre collagene, fibre elastiche, proteoglicani, glicosaminoglicani e glicoproteine strutturali. I condroblasti vengono avvolti ed isolati dalla sostanza fondamentale (lacune) e, in seguito a una o due divisioni mitotiche, maturano in condrociti che rappresentano le unità morfologiche e funzionali del tessuto cartilagineo.

Per promuovere il differenziamento condrogenico, le MSC vengono coltivate in micromassa, cioè centrifugate in modo da formare un pellet e trattate in assenza di siero ma in presenza di acido ascorbico e di Trasforming Growth Factor- $\beta$ 3 o  $\beta$ 1 (TG $\beta$ 3-1) (*Bruder et al., 1997*) che permette lo sviluppo di una matrice che risulta ricca di proteoglicano. Il TGF-  $\beta$  attiva alcune Mitogen Activated Protein kinases (MAPKs) tra cui ERK-1, p38 e altre molecole come la protein Kinasi C (PKC) e c-Jun (*Sekiya et al., 2002*). Tale attivazione porta all'espressione di specifici fattori di trascrizione quali Sox9, Msx2 e Brachury che attivano a loro volta i geni specifici per il differenziamento condrogenico. Per verificare l'avvenuto differenziamento in senso condrogenico è possibile effettuare delle colorazioni istologiche e delle indagini molecolari. Il safranin O è tra le colorazioni istologiche più utilizzate, in quanto va a legarsi alle componenti che costituiscono la sostanza fondamentale tra cui i glicosaminoglicani e i proteoglicani. Le valutazioni molecolari comprendono l'analisi dell'espressione di markers come il collagene di tipo II e di tipo IX e gli aggreganti (*Minguell et al., 2001*).

### **1.2.2 Differenziamento osteogenico**

L'osso è composto da una componente cellulare e da una matrice extracellulare che viene mineralizzata per deposizione di cristalli di calcio e fosfato. Le cellule del tessuto osseo sono gli osteoblasti, osteociti ed osteoclasti. I primi due tipi cellulari derivano dalle cellule osteoprogenitrici originate a partire dalle cellule mesenchimali, mentre gli osteoclasti sono cellule multi-nucleate derivate dai macrofagi-monociti. Gli osteoblasti risiedono lungo le superfici ossee e la loro funzione

è quella di sintetizzare la matrice extracellulare e di mediare la sua mineralizzazione. Gli osteociti rappresentano le forme inattive degli osteoblasti, sono presenti all'interno della matrice ossea (lacune ossee) e contribuiscono al continuo rinnovamento della stessa. Gli osteoclasti sono cellule fagocitiche che regolano il continuo rimodellamento osseo (*Lippuner et al., 2012*).

Diversi studi hanno messo in evidenza che le cellule staminali mesenchimali possiedono potenziale osteogenico e che vanno incontro al differenziamento in tal senso quando coltivate in presenza di citochine attive sul tessuto osseo. Il processo di osteogenesi comprende diverse fasi che vedono il commitment delle MSCs verso il lineage osteogenico ed il passaggio a cellule osteoprogenitrici, pre-osteoblasti ed infine agli osteoblasti (*Long et al., 2001*) (Fig2).

Per poter ottenere il differenziamento osteogenico delle MSCs *in vitro* queste cellule vengono coltivate in un medium, in presenza di fetal bovine serum (FBS), contenente i seguenti supplementi osteogenici (*Zhang et al., 2012*):

1. desametasone: è un potente stimolatore del differenziamento osteogenico ed induce l'espressione di runt-related transcription factor 2 (RUNX2), Osterix (Osx), e proteine della matrice ossea;
2.  $\beta$ -glicerolfosfato: donatore di gruppi fosfato, porta ad un aumento della secrezione del collagene di tipo I;
3. acido ascorbico: utilizzato come antiossidante (vitamina C), funziona come cofattore nella idrossilazione dei residui di prolina e lisina nelle molecole di collagene, promuovendo la formazione della matrice extracellulare, la maturazione e la deposizione di collagene; induce l'attività della fosfatasi alcalina della membrana plasmatica degli osteoprogenitori.

La valutazione del differenziamento osteogenico può essere effettuata mediante differenti metodiche (*Gregory et al., 2004*):

- colorazioni istologiche quali Alizarin Red S e Von Kossa in grado di evidenziare la deposizione della matrice mineralizzata;
- dosaggio dell'attività della fosfatasi alcalina necessaria per il processo di mineralizzazione;
- valutazione dell'espressione dei markers di superficie tra cui l'osteocalcina (proteina secreta dagli osteoblasti nella matrice mineralizzata), l'osteopontina (fosfoglicoproteina secreta dagli osteoblasti prima della mineralizzazione), il collagene di tipo I, il core-binding factor-1 (Cbfa-1 o Runx2) e la sialoproteina.

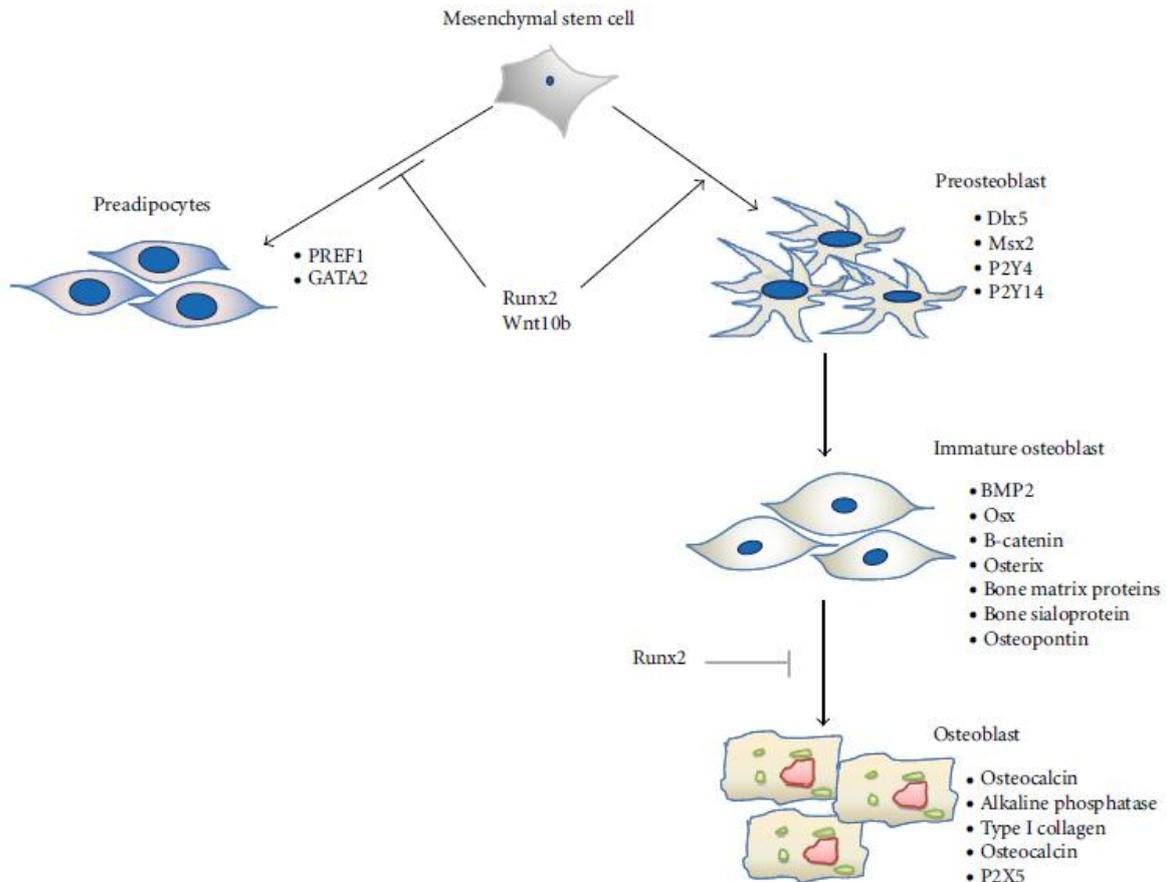


Fig2 Differenziamento osteogenico delle hMSC (Zhang *et al.*, 2012).

### Aspetti molecolari dell'osteogenesi

Il commitment ed il differenziamento delle MSCs verso il lineage osteogenico è regolato da più fattori, tra i quali il più importante risulta essere RUNX2. RUNX2 attiva e regola il differenziamento osteogenico attraverso due pathways indipendenti: transforming growth factor-beta 1 (TGFβ1) e bone morphogenetic protein 2 (BMP2) (Lee *et al.*, 2003; Lee *et al.*, 2000). Il TGFβ ha un ruolo bifasico nel differenziamento osteogenico *in vitro* poiché inibisce le fasi iniziali di sviluppo dei progenitori mentre stimola la produzione della matrice ossea da parte delle cellule agli stadi avanzati di differenziamento. Durante lo sviluppo embrionale l'espressione del fattore di trascrizione RUNX2 precede il differenziamento osteogenico ed è ristretta alle MSCs destinate a diventare condroblasti od osteoblasti. In seguito l'espressione di RUNX2 diviene limitata agli osteoblasti. BMP2, viene sintetizzata dagli osteoblasti e viene accumulata nella matrice extracellulare (Javed *et al.*, 2010) (Fig3).

Inoltre, insieme a RUNX2 e BMP2, anche distal-less homeobox 5 (Dlx5) porta le MSCs verso il commitment osteogenico. Oltre a indirizzare le MSC verso un lineage specifico, RUNX2 inibisce

il differenziamento adipogenico delle MSCs (*Enomoto et al., 2004*), mentre BMP2 induce l'espressione di *Osx* indipendentemente da RUNX2 (*Matsubara et al., 2008*).

In seguito al commitment, le MSCs differenziano in preosteoblasti (Fig3), cellule con una forma ellittica, un nucleo allungato e in grado di proliferare. Queste cellule esprimono RUNX2, *Dlx5*, *msh* homeobox omologo 2 (*Msx2*), *P2Y4*, e *P2Y14* (*Zippel et al., 2012, Harada et al., 2003*), e markers degli osteoblasti come ALP, collagene di tipo I e osteopontina (OPN).  $\beta$ -catenina, RUNX2 e Osterix differenziano i preosteoblasti in osteoblasti immaturi (*Komori 2006*). Queste cellule hanno una forma affusolata ed esprimono BMP, sialoproteina e OPN.

Nelle fasi successive, RUNX2 inibisce la maturazione degli osteoblasti (*Liu et al., 2001*) e Osterix porta alla maturazione finale degli osteoblasti ed induce l'espressione di osteocalcina (*Nakashima et al., 2002*). Una volta raggiunto il completo differenziamento, gli osteoblasti diventano cuboidali ed iniziano a produrre una matrice organica mineralizzata (*Zhang et al., 2012*). L'apparato del Golgi ed il reticolo endoplasmatico rugoso sono ben sviluppati negli osteoblasti maturi in quanto hanno una maggiore necessità di produrre proteine. L'espressione di OPN è ridotta negli osteoblasti maturi; mentre aumenta l'espressione di altre proteine come *P2X5* (*Zippel et al., 2012*), la fosfatasi alcalina, il collagene di tipo I e l'osteocalcina (*Pavlin et al., 2001; Pavlin et al., 2000*).

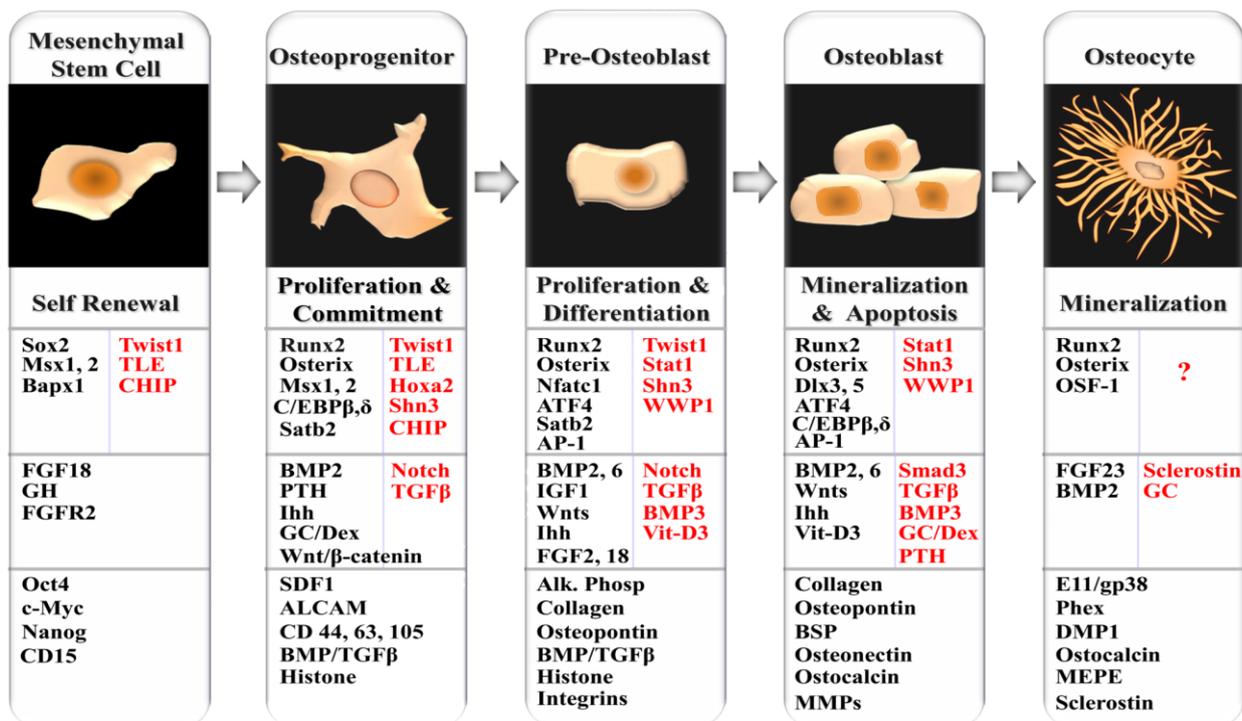


Fig3 Fattori che regolano la progressione del differenziamento osteogenico e le caratteristiche fenotipiche. (*Javed et al., 2010*)

### 1.2.3 Differenziamento adipogenico

#### Caratteristiche del tessuto adiposo

Nel tessuto connettivo vi sono cellule che svolgono il ruolo di deposito di lipidi. Queste cellule derivano dal mesenchima primitivo dove si sviluppano come lipoblasti e sono chiamate adipociti. Gli adipociti costituiscono il principale tipo cellulare nel tessuto adiposo. Il tessuto adiposo comprende il tessuto adiposo bianco (White Adipose Tissue, WAT) e il tessuto adiposo bruno (Brown Adipose Tissue, BAT). Il BAT è costituito da cellule adipose multiloculari, contenenti numerose gocce lipidiche. È scarso nell'adulto e appare bruno se osservato al microscopio ottico, sia per la presenza massiccia di mitocondri che per l'elevata vascolarizzazione. Il WAT è costituito da cellule adipose uniloculari contenenti una grande goccia lipidica, povere di citosol e con nucleo ed organelli schiacciati sulla membrana cellulare. Il tessuto adiposo è molto diffuso nell'organismo e svolge una funzione meccanica, termoisolante e di riserva. Il WAT svolge un importante ruolo nella regolazione del metabolismo energetico infatti è considerato un organo endocrino, capace di secernere adipochine. Alterazioni a suo carico sono spesso riconducibili all'insorgenza di patologie quali l'obesità, motivo per cui la maggior parte degli studi si è concentrata su di esso.

I grassi immagazzinati negli adipociti del WAT derivano da tre fonti principali: grassi derivati dalla dieta che circolano nel sangue sotto forma di chilomicroni; trigliceridi sintetizzati dal fegato e trasportati nel sangue; trigliceridi sintetizzati a partire dal glucosio negli adipociti. L'accumulo dei lipidi nell'adipocita prende la forma di una goccia sferica che riduce il citoplasma ad un sottile orletto periferico, tale accumulo dà all'adipocita la classica forma detta ad anello a castone. Gli adipociti giocano un ruolo fondamentale nell'omeostasi dell'energia, andando a costituire una importante riserva energetica sotto forma di depositi di trigliceridi. Questa riserva si trova in uno stato dinamico, si espande quando l'apporto calorico oltrepassa il consumo e si mobilita quando il consumo oltrepassa l'apporto calorico. Questi processi sono controllati da alcuni ormoni, tra cui l'insulina che promuove l'immagazzinamento energetico e il glucagone che promuove la mobilitazione dei trigliceridi in caso di carenza energetica. Il tessuto adiposo svolge un ruolo importante anche nella regolazione dell'appetito e nella regolazione della risposta immunitaria dell'organismo. Tra gli ormoni secreti dagli adipociti vi è la leptina, un ormone peptidico che regola l'assunzione di cibo e conseguentemente la massa grassa corporea agendo sul proprio recettore a livello ipotalamico (Friedman *et al.*, 1998). Inoltre sono stati individuati recettori per la leptina anche in altri organi suggerendo un ruolo aggiuntivo dell'ormone nel modulare l'azione dell'insulina nel fegato (Choen *et al.*, 1996), la produzione di steroidi nell'ovaio (Zachow *et al.*,

1997) e la steroidogenesi adrenocorticale (Bornstein et al., 1997). Il tessuto adiposo è inoltre coinvolto nella modulazione della risposta immunitaria grazie alla secrezione di adiposina, la proteina che stimola l'acilazione (ASP), del fattore di necrosi tumorale- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) ed del fattore che inibisce la migrazione macrofagica (MIF).

### L'adipogenesi

L'incremento dell'obesità e delle patologie ad essa associate quali il diabete mellito di tipo II, l'ipertensione e le malattie coronariche, ha aumentato l'interesse sugli aspetti biologici dell'adipogenesi (Rosen 2002).

Lo studio del processo dell'adipogenesi si avvale dell'utilizzo di diversi tipi cellulari che possono essere indotti a differenziare in adipociti. Il modello di adipogenesi *in vitro* più studiato e meglio caratterizzato, è rappresentato dalle linee cellulari di pre-adipociti 3T3-L1 e 3T3-442A (Green and Kehinde 1974). Se sottoposte ad opportuno protocollo di differenziamento, queste linee cellulari adottano un fenotipo tondeggianti e accumulano lipidi a livello intracellulare sotto forma di *lipid droplets*. La maggior parte delle nostre conoscenze a riguardo del meccanismo cellulare e molecolare coinvolto nell'adipogenesi deriva dagli studi condotti su linee cellulari di pre-adipociti. Sebbene le colture di pre-adipociti rappresentino un utile modello per lo studio delle basi molecolari che regolano l'adipogenesi, la loro scarsa capacità replicativa ed il rapido declino del potenziale differenziativo *in vitro*, rappresenta un limite al loro utilizzo (Fevè 2005).

Di recente le cellule staminali mesenchimali sono state riconosciute come altro modello cellulare utile per lo studio dell'adipogenesi in quanto sono i precursori fisiologici degli adipociti (Zhang et al., 2012).

In letteratura esistono diversi protocolli per il differenziamento *in vitro* delle MSCs; alcuni utilizzano desametasone e isobutilmethylxantina (Nuttall et al., 1998), altri aggiungono anche insulina e indometacina (Minguell et al., 2001) e altri ancora utilizzano solo desametasone e insulina (Muraglia et al., 2000). Sono stati proposti alcuni possibili meccanismi d'azione per queste sostanze che si suppone agiscano a livello dei principali fattori di trascrizione coinvolti nell'adipogenesi:

- l'insulina esercita il suo effetto attraverso il recettore IGF-1 ed induce il differenziamento adipogenico solamente a concentrazioni elevate determinando l'attivazione di PI3K e Akt;
- il desametasone si lega al recettore dei glucocorticoidi, che appartiene alla famiglia dei recettori ormonali nucleari, determinando così l'espressione dei fattori di trascrizione C/EBP $\delta$  (Cao et al., 1991) e PPAR $\gamma$  (Wu et al., 1996);

- l'isobutilmetilxantina è in grado di aumentare i livelli intracellulari di cAMP che media la rapida induzione di C/EBP $\beta$  e C/EBP $\delta$  attraverso la prostaglandina PGI<sub>2</sub> (Elks, Manganello 1985);
- l'indometacina lega e attiva PPAR $\gamma$  (Neubauer et al., 2004).

La valutazione del differenziamento *in vitro* può essere condotta sia a livello morfologico che a livello molecolare. A livello intracellulare si ha la comparsa di goccioline lipidiche che possono essere individuate all'analisi istologica mediante colorazione con *Oil Red O*, comunemente utilizzato per identificare depositi di trigliceridi, o mediante *Nile Red*, colorante fluorescente anch'esso in grado di marcare i depositi lipidici. Tra i markers molecolari più utilizzati per valutare il differenziamento adipocitico si ricordano PPAR $\gamma$ , C/EBP $\beta$ , adiposina, leptina, lipoproteinlipasi (LPL) e fatty acid-binding protein-2 (aP2).

### Aspetti cellulari dell'adipogenesi

Il processo adipogenico può essere diviso in due fasi: la determinazione ed il differenziamento (Fevè 2005):

- durante la fase di determinazione le MSCs raggiungono la confluenza, bloccano la replicazione cellulare e si indirizzano verso il lineage adipocitico prendendo il nome di adipoblasti. A livello morfologico non è possibile distinguere gli adipoblasti dai propri precursori, tuttavia queste cellule perdono la capacità di differenziare in tipi cellulari non appartenenti al lineage adipogenico.
- durante la fase di differenziamento gli adipoblasti vanno incontro ad un'iniziale proliferazione esponenziale cui segue il raggiungimento della confluenza e l'arresto della crescita. In questa fase le cellule vengono definite "committed" al differenziamento e subiscono un cambiamento morfologico che vede la riorganizzazione della matrice extracellulare e delle proteine del citoscheletro al fine di garantire il trasporto, la sintesi lipidica e la secrezione di proteine specifiche del tessuto adiposo. Le cellule con queste caratteristiche vengono definite pre-adipociti; esse vanno incontro ad una fase di espansione clonale che consente di aumentare il numero di cellule che andranno incontro alle fasi di differenziamento terminale. I pre-adipociti esprimono i due fattori di trascrizione necessari alle fasi terminali del differenziamento: PPAR $\gamma$  e C/EBP $\alpha$ . Per giungere alle fasi finali del differenziamento, i pre-adipociti vanno incontro all'arresto permanente della proliferazione che consente loro di esprimere tutte le caratteristiche molecolari e fenotipiche dell'adipocita maturo (Fig4.) (Fève 2005).

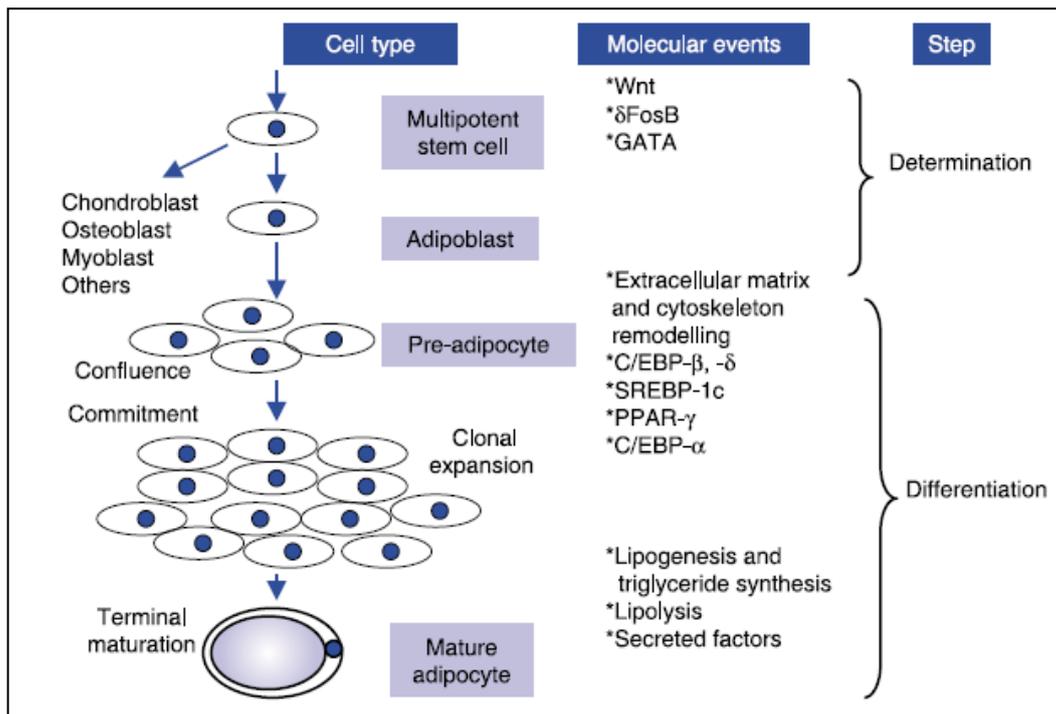


Fig4 Modello di differenziamento adipocitico: determinazione e differenziamento (Fevè 2005)

La maggior parte degli studi condotti sull'adipogenesi si basa sull'utilizzo di linee cellulari murine allo stadio di pre-adipociti; tali modelli rappresentano un utile strumento per approfondire gli aspetti molecolari che regolano la fase di differenziamento ma non consentono di indagare la precedente fase di determinazione. Le cellule staminali mesenchimali (MSC) in questo contesto rappresentano un modello cellulare particolarmente utile in quanto possono essere efficacemente indotte, da uno stato indifferenziato, allo stato di adipociti, di cui peraltro rappresentano fisiologicamente i precursori biologici.

### Aspetti molecolari dell'adipogenesi

Il differenziamento adipocitico è determinato da una serie di fattori trascrizionali la cui espressione ed attivazione viene finemente regolata durante tutte le fasi del differenziamento.

Gli studi condotti su modelli di pre-adipociti hanno permesso di identificare tre classi di fattori trascrizionali coinvolti attivamente nel differenziamento (Rosen *et al.*, 2005):

- CCAAT-enhancer binding proteins (C/EBPs)
- Peroxisome proliferator-activated receptor (PPAR- $\gamma$ /- $\beta$ /- $\delta$ )
- Sterol responsive element-binding protein-1 c (SREBP-1c)

### CCAAT/enhancer binding proteins (C/EBPs)

Le C/EBPs sono membri della classe dei fattori di trascrizione basic-leucine zipper chiamata CCAAT/enhancer binding proteins. Studi condotti sull'adipogenesi hanno evidenziato una

modulazione dell'espressione di alcuni membri appartenenti alla famiglia delle C/EBPs e lavori basati sull'impiego di mutanti gain-of function e loss-of function delle C/EBPs, indicano che queste proteine rivestono un ruolo fondamentale nello sviluppo delle cellule adipose. Sono state descritte sei diverse isoforme e il tessuto adiposo esprime C/EBP $\alpha$ , C/EBP $\beta$ , C/EBP $\delta$  (Rangwala and Lazar 2000).

C/EBP $\beta$  è il primo fattore trascrizionale ad essere attivato in seguito all'aggiunta dei fattori adipogenici nel medium di coltura e la sua funzione consiste nell'indurre l'espressione di PPAR $\gamma$  e di C/EBP $\alpha$  (Elberg et al., 2000). C/EBP $\alpha$  è espresso tardivamente nel programma di differenziamento ed è responsabile dell'espressione di molti geni specifici degli adipociti (Darlington et al., 1998).

Uno studio condotto da Tanaka e collaboratori ha consentito di approfondire il ruolo svolto da C/EBP $\beta$  e C/EBP $\delta$  nel processo di adipogenesi. La mancata espressione di entrambe le isoforme determina una notevole riduzione nel potenziale differenziativo di fibroblasti embrionali indotti verso l'adipogenesi; esperimenti *in vivo* condotti su topi transgenici il silenziamento dei geni per C/EBP $\beta$  e C/EBP $\delta$  conduce a morte l'85% degli animali mentre nei topi che sopravvivono si evidenzia una riduzione nella formazione di tessuto adiposo bianco e bruno (Tanaka et al., 1997).

Numerosi studi condotti *in vitro* indicano che l'espressione di C/EBP $\alpha$  è critica per il programma adipogenico, infatti l'inibizione mediante mRNA antisense blocca l'accumulo lipidico e l'espressione di geni considerati *markers* specifici per gli adipociti, indicando quindi che questo fattore è necessario per la conversione adipogenica dei pre-adipociti 3T3-L1 (Lin and Lane 1992).

C/EBP $\beta$  viene attivato tramite fosforilazione di un dominio localizzato tra la regione leucine-zipper di legame al DNA e il dominio di trans attivazione all'N-terminale. Questa regione contiene numerosi residui di serina e treonina ed in particolare il sito comprendente la treonina 188 che è una regione consensus per ERK1/2 e GSK3. Per valutare l'importanza della fosforilazione nel regolare l'attività di C/EBP $\beta$ , è stato condotto uno studio su fibroblasti esprimenti una forma mutata di C/EBP $\beta$  in cui il residuo di treonina 188 viene sostituito con un residuo di alanina (Park et al., 2004). Le cellule mutanti per C/EBP $\beta$  esposte a desametasone, isobutilmetilxantina, insulina e in presenza di siero, esprimono comunque PPAR $\gamma$  ma sono in grado di attivare solo parte del programma adipogenico e non raggiungono gli stadi terminali del differenziamento come dimostrato dall'assenza di espressione dell'adiponectina. Inoltre l'assenza di adiponectina correla con una riduzione significativa nella quantità di C/EBP $\alpha$ . Queste osservazioni dimostrano che la fosforilazione di C/EBP $\beta$  a livello della regione consensus ERK/GSK3, è richiesta per l'espressione di C/EBP $\alpha$  e di numerosi geni target di C/EBP $\alpha$  tra cui il gene per l'adiponectina (Park et al., 2004).

### Peroxisome proliferator-activated receptors (PPARs)

I Peroxisome proliferator-activated receptors (PPARs) sono membri della superfamiglia dei recettori ormonali nucleari e sono fattori di trascrizione che regolano differenti processi biologici. I PPARs svolgono un ruolo chiave nella regolazione dell'adipogenesi, del metabolismo lipidico e della sensibilità all'insulina. Esistono tre diverse isoforme: PPAR-  $\alpha$ , - $\beta$ , - $\gamma$  (Siersbaek et al., 2010). PPAR $\gamma$  è in grado di formare un eterodimero con un altro recettore ormonale, il *retinoid X receptor* (RXR), in modo da permettere il legame con il DNA ed essere trascrizionalmente attivo. PPAR $\gamma$  esiste in due isoforme proteiche, PPAR $\gamma$ 1 e PPAR $\gamma$ 2, derivanti dalla trascrizione del gene a partire da due diversi promotori e da eventi di splicing alternativo. PPAR $\gamma$ 2 è l'isoforma prevalente presente nelle cellule adipose (Tontonoz et al. 1995).

PPAR $\gamma$  è in grado di attivare i promotori di geni specifici delle cellule adipose e la sua attività viene regolata mediante fosforilazione e attraverso l'associazione con ligandi lipofilici che mediano il reclutamento di co-attivatori o co-repressori. (Rosen, Spiegelman 2001).

Sono stati identificati alcuni ligandi naturali di PPAR $\gamma$  tra cui la prostaglandina J<sub>2</sub> (PGJ<sub>2</sub>) che risulta in grado di promuovere l'adipogenesi quando aggiunta a fibroblasti in coltura; inoltre altri acidi grassi naturali, incluso l'acido linoleico, possono legare ed attivare PPAR $\gamma$ . Studi condotti da Kim e collaboratori hanno suggerito un ruolo di SREBP-1c nella produzione di molecole lipofiliche con una potente affinità di legame per PPAR $\gamma$  (Kim et al., 1998).

I primi esperimenti di *gain of function*, che hanno consentito di trovare una connessione tra l'espressione di PPAR $\gamma$  e l'adipogenesi, hanno utilizzato cellule fibroblastiche non-adipogeniche esprimenti l'isoforma  $\gamma$  di origine retrovirale. Utilizzando i ligandi disponibili, l'attivazione di PPAR $\gamma$  ha evidenziato una potente induzione dell'adipogenesi (Tontonoz et al., 1994).

L'attività di PPAR $\gamma$  può essere regolata tramite fosforilazione da parte delle MAPK ERK1/2 e JNK di una sequenza consensus localizzata all'N-terminale (Adams et al., 1997). Tale fosforilazione riduce l'attività trascrizionale di PPAR $\gamma$  e conseguentemente anche il corretto differenziamento adipocitico. La fosforilazione a livello della serina 84 di PPAR $\gamma$ 1 umana, inibisce sia la sua attività trascrizionale ligando-dipendente sia quella ligando-indipendente. Il mutante S84A mostra un aumento nell'attività trascrizionale di PPAR $\gamma$ 1 (Adams et al., 1997). Mutazioni a livello del sito di fosforilazione per le MAPKs su PPAR $\gamma$ 2, determinano una ridotta affinità del fattore di trascrizione per i suoi ligandi (Shao et al., 1998). Questo aspetto suggerisce che esista una comunicazione interdominio tra la tasca di legame per i ligandi e il dominio di fosforilazione. In particolare è stato dimostrato che lo stato di fosforilazione della serina 112 gioca un ruolo nella conformazione del recettore che regola l'affinità di PPAR $\gamma$  per i suoi ligandi ed influenza la capacità di reclutare i suoi coattivatori (Shao et al., 1998).

### **Regolazione trascrizionale dell'adipogenesi**

I diversi lavori condotti al fine di studiare i meccanismi molecolari alla base dell'adipogenesi, hanno consentito di proporre un possibile modello di cascata trascrizionale. Durante il processo di adipogenesi, si avrebbe l'iniziale espressione di C/EBP $\beta$  e di C/EBP $\delta$  seguita da quella di PPAR $\gamma$  e C/EBP $\alpha$  (Morrison, Farmer 2000).

Il ruolo di C/EBP $\beta$  consiste nell'indurre la trascrizione di PPAR $\gamma$  e C/EBP $\alpha$  (Elberg *et al.*, 2000). Uno studio condotto su un modello di pre-adipociti 3T3-L1 indotti al differenziamento adipogenico, ha messo in evidenza la rapida induzione di C/EBP $\beta$  e di C/EBP $\delta$  a cui segue l'espressione di PPAR $\gamma$  e C/EBP $\alpha$  (Farmer 2005). A sua volta, l'aumento dell'espressione di PPAR $\gamma$ , ed in particolare dell'isoforma- $\gamma$ 2, sembra regolare l'espressione di C/EBP $\alpha$ . A sostegno di questa tesi vi è la sequenzialità temporale d'espressione di PPAR $\gamma$ 2 e di C/EBP $\alpha$  durante l'adipogenesi; inoltre esperimenti di "gain of function" hanno evidenziato che l'espressione ectopica di PPAR $\gamma$  o l'applicazione di suoi specifici ligandi, induce la trascrizione di C/EBP $\alpha$  (Rosen and Spiegelman 2000). Il ruolo chiave nel processo differenziativo in senso adipogenico è però appannaggio di PPAR $\gamma$  e l'importanza di C/EBP $\alpha$  risiederebbe probabilmente nel mantenimento dell'espressione di PPAR $\gamma$ . Oltre a controllare l'espressione di PPAR $\gamma$ , C/EBP $\beta$  sembra essere coinvolto anche nella regolazione dell'attività di PPAR $\gamma$  agendo sull'espressione dei suoi specifici ligandi (Hamm *et al.*, 2001).

## 2. MITOGEN ACTIVATED PROTEIN KINASES (MAPKs)

Le Mitogen Activated Protein Kinases (MAPKs) sono una superfamiglia proteica di serin-treonin chinasi coinvolta in un vasto numero di processi cellulari quali la proliferazione, il differenziamento, la risposta a stress, l'apoptosi, lo sviluppo neoplastico e le malattie legate a fenomeni d'infiammazione cronica (*Zarubin and Han 2005*). All'interno della superfamiglia delle MAPKs possono essere distinti tre principali gruppi: le extracellular signal-regulated kinases (ERK1/2), le stress activated protein kinases (SAPK)/c-Jun N-terminal kinases (JNK) e le p38 MAPKs.

Le MAPKs hanno il compito di trasmettere un segnale extracellulare ai rispettivi e specifici targets intracellulari tramite un processo di fosforilazione a livello di specifici residui di serina e treonina. L'attivazione delle MAPKs avviene mediante una cascata enzimatica costituita da tre protein-chinasi: le MAPK chinasi chinasi (MAPKKKs), le MAPK chinasi (MAPKKs), e le MAPKs. Questa cascata prende inizio non appena uno dei membri appartenenti alla famiglia delle MAPKKKs viene attivato. L'attivazione delle MAPKKKs può essere mediata da una GTP-binding protein appartenente alla famiglia Ras/Rho, oppure può avvenire mediante fosforilazione da parte di una proteina kinasi mediatrice (MAPKKKK) che viene a sua volta attivata da una proteina adattatrice (*Cavaletti et al., 2007*).

Il segnale viene quindi trasferito, tramite fosforilazione, ai livelli successivi della cascata che sono appunto occupati dalle MAPK kinasi (MAPKKs) e dalle MAPKs (Fig5).

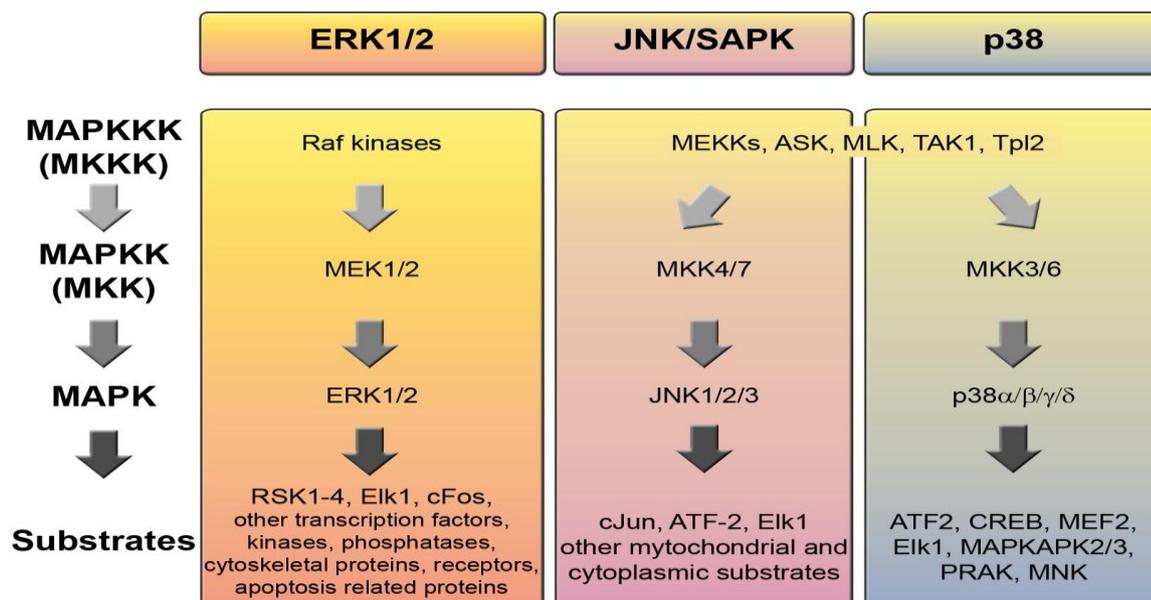


Fig5 Cascata delle MAPKs (*Cavaletti et al., 2007*)

## **2.1 Meccanismo di attivazione delle MAPKs**

Le MAPKs possiedono un sito di fosforilazione detto loop di attivazione, costituito da una sequenza consensus (Thr-Xaa-Tyr) che viene riconosciuta in modo specifico dalle MAPKKs. Le MAPKKs riconoscono i residui di Thr e Tyr localizzati nel loop di attivazione e li fosforilano. Ogni classe di MAPKs si distingue per l'identità dell'amminoacido localizzato nel sito di fosforilazione tra i due residui di Thr e Tyr; questo consente la fosforilazione specifica per ogni classe di MAPKs: Thr-Glu-Tyr per ERK1-2; Thr-Pro-Tyr per JNK; Thr-Gly-Tyr per p38. Una volta fosforilate, le MAPKs risultano attive e possono a loro volta attivare specifici targets intracellulari mediante la fosforilazione a livello di residui di serina o di treonina. I targets delle MAPKs comprendono altre proteine chinasi, proteine del citoscheletro oppure fattori di trascrizione e proteine nucleari che vengono attivati in seguito a traslocazione delle MAPKs dal citoplasma al nucleo (*Cavaletti et al., 2007*).

L'attività delle MAPKs può essere regolata a livello spazio-temporale. La regolazione temporale si basa sull'equilibrio tra fosforilazione/attivazione e defosforilazione/inattivazione. Il processo di defosforilazione è regolato da MAPK fosfatasi (MKPs) la cui espressione viene indotta da fattori di crescita e stress cellulari e la cui attivazione è modulata dalla diretta associazione con le MAPKs (*Cavaletti et al., 2007; Farooq and Zhou 2004*).

## **2.2 ERK1/2**

ERK1 ed ERK2 sono proteine rispettivamente di 44 e 42 kDa che condividono l'83% di identità amminoacidica. Tali MAPKs sono coinvolte in processi di proliferazione, differenziamento, trasformazione ed apoptosi. Le due chinasi sono attivate da fattori di crescita, dal siero, da ormoni, da fattori di differenziamento, dalle citochine e dallo *stress* osmotico. Tali stimoli agiscono attraverso recettori di superficie come i recettori tirosin chinasi ed i recettori legati alle G-proteine determinando il reclutamento di *SOS* che attiva la small GTP-binding protein *Ras* mediante scambio tra molecole di GDP e GTP; la proteina *Ras* così attivata è libera di legare *Raf-1* (MAPKKK) determinando la sua traslocazione a livello della membrana plasmatica e la sua attivazione. A sua volta *Raf-1* lega e fosforila le MAPKKs *MEK1/2* le quali a loro volta fosforilano ed attivano *ERK1/2*.

La forma fosforilata e attiva di ERK1/2 può restare localizzata a livello citoplasmatico ed agire su specifici targets tra cui proteine del citoscheletro, proteine di segnale, proteine connesse al processo apoptotico, fosfatasi e chinasi; alternativamente l'attivazione di ERK1/2 può determinare la sua traslocazione nel nucleo. Tra i substrati nucleari di ERK1/2, i più studiati sono Elk-1 e c-Fos (*Yoon and Seger 2006*).

Il *signaling* di ERK1/2 è considerato un regolatore chiave della proliferazione cellulare e per questa ragione gli inibitori del *pathway* di ERK vengono utilizzati nei *trials* clinici come potenziali agenti antitumorali (Kohn and Pouyssegur 2003).

### **2.2.1 Ruolo di ERK1/2 nel differenziamento adipogenico**

Il ruolo di ERK1 e di ERK2 nel differenziamento adipocitico è stato analizzato utilizzando linee cellulari di pre-adipociti o modelli basati su cellule staminali mesenchimali ma i risultati ottenuti sono controversi.

Benito M. e collaboratori (1991) posero l'attenzione sull'esistenza di una correlazione tra l'attività di ERK1/2 ed il differenziamento adipocitico. In questo lavoro la transfezione di cellule pre-adipocitiche 3T3-L1 con un vettore esprimente la proteina Ras attivata, conduceva all'arresto della crescita e al differenziamento adipocitico terminale. Poiché la proteina Ras è un'attivatrice del *pathway* di ERK1/2, questi risultati suggerirono un ruolo positivo di ERK1/2 nell'adipogenesi (Benito *et al.*, 1991). Un lavoro condotto successivamente su fibroblasti 3T3-L1 ha dimostrato che l'utilizzo di un oligonucleotide antisense contro ERK1/2 determina il blocco del corretto differenziamento adipocitico (Sale *et al.*, 1995). A sostegno del ruolo positivo svolto da ERK1/2 nel processo di adipogenesi, una ricerca condotta nel 1999 dal gruppo di Aubert J., ha messo in evidenza che l'azione di PD98059, inibitore specifico del *pathway* di ERK1/2, blocca l'adipogenesi in cellule 3T3-L1 (Aubert *et al.*, 1999).

Altri studi condotti utilizzando come modello cellule staminali mesenchimali umane (hMSCs) sembrano invece indicare un ruolo negativo di ERK1/2 nel differenziamento adipogenico ad es. inibendo l'attività di MEK1/2 tramite PD98059 o U0126, si promuove il differenziamento adipocitico delle hMSCs (Janderová *et al.*, 2003; Tominaga *et al.*, 2005). Anche altri studi indicano che l'attivazione di ERK non sia richiesta per l'adipogenesi o che blocchi il differenziamento adipocitico (Kim *et al.*, 2002).

Le due ipotesi contraddittorie trovano un punto di accordo in alcuni lavori in cui viene evidenziato un ruolo differente di ERK1/2 a seconda delle fasi del differenziamento in senso adipocitico di hMSCs. Alcuni autori, infatti, valutando il livello di fosforilazione di ERK1/2 a partire da pochi minuti dopo la somministrazione del medium di differenziamento hanno rilevato un aumento della forma fosforilata di ERK1/2 nelle prime ore del differenziamento, seguito da una down-regolazione a tempi più lunghi (Prusty *et al.*, 2002; Qi-Qun Tang *et al.*, 2003). Questa diversa modulazione temporale viene spiegata con l'ipotesi che l'attivazione di ERK1/2 nelle prime fasi del differenziamento vada ad attivare tramite fosforilazione C/EBP $\beta$  il quale induce l'aumento della trascrizione di PPAR $\gamma$  e di C/EBP $\alpha$ ; successivamente la regolazione negativa sulla fosforilazione di

ERK1/2 permetterebbe l'attivazione di PPAR $\gamma$  nelle fasi tardive del differenziamento e la conseguente espressione di geni tipici dell'adipocita maturo (*Prusty et al., 2002*). Uno studio condotto da Qi-Qun Tang e collaboratori (2005) ha permesso di chiarire il meccanismo che regola la fosforilazione e la conseguente attivazione di C/EBP $\beta$ . L'induzione al differenziamento di pre-adipociti in fase di arresto mitotico, determina la precoce espressione di C/EBP $\beta$  che risulta inizialmente privo di attività trascrizionale. C/EBP $\beta$  viene sequenzialmente fosforilato da ERK1/2 a livello del residuo di Thr-188 e da GSK3 $\beta$  a livello di Ser-184 e Thr-179. Queste modificazioni determinano l'acquisizione della capacità di legare il DNA da parte di C/EBP $\beta$  e correlano con l'entrata dei pre-adipociti nella fase di espansione clonale, a cui segue l'espressione di PPAR $\gamma$  e di C/EBP $\alpha$  con conseguente arresto della crescita cellulare (*Qi-Qun Tang et al., 2005*). Come precedentemente detto anche l'attività di PPAR $\gamma$  può essere regolata mediante fosforilazione ed in particolare è stata individuata una sequenza consensus per la sua fosforilazione da parte di ERK1/2. Diversi studi hanno dimostrato che lo stato fosforilato riduce l'attività trascrizionale di PPAR $\gamma$ . La co-trasfezione di adipociti con un vettore esprimente una forma costitutivamente attiva di MEK, porta ad una riduzione dell'attività trascrizionale di PPAR $\gamma$ .

In un recente studio effettuato presso i nostri laboratori, si è dimostrato che la modulazione dell'espressione e della fosforilazione sia di ERK1 che di ERK2 svolgono un possibile ruolo nel processo differenziativo. Nel complesso, a fronte di un'iniziale attivazione di ERK1/2, con il procedere del differenziamento si evidenzia una down-regolazione della fosforilazione che interessa entrambe le isoforme di ERK e un successivo aumento della fosforilazione sia per ERK1 che per ERK2 dal 10gg di induzione; a 14gg e 28gg la forma fosforilata di ERK1 ed ERK2 ritorna ad un livello paragonabile alle hMSC non trattate. Per verificare il potenziale ruolo di ERK1/2 nel differenziamento adipocitico, le hMSCs indotte in senso adipogenico sono state trattate in fasi diverse con U0126, un inibitore specifico e irreversibile del pathway di MEK/ERK. I risultati ottenuti mostrano che, inibendo l'attivazione di ERK1/2 per tutto il periodo di differenziamento, si ottiene un blocco quasi completo del processo differenziativo ma, anche limitando il trattamento con U0126 alle fasi precoci del differenziamento, il numero di cellule reclutate verso il lineage adipocitico si riduce drasticamente. Il trattamento con U0126 durante una fase più avanzata del differenziamento altera invece il processo di maturazione degli adipociti. Si è dimostrato quindi che una modulazione della fosforilazione di ERK1/2 sia necessaria per il corretto differenziamento adipocitico e che la sua precoce inibizione riduce la capacità differenziativa delle hMSCs (*Donzelli et al., 2011*).

### 2.2.2 Ruolo di ERK1/2 nel differenziamento osteogenico

Come per il differenziamento adipogenico, anche per il differenziamento osteogenico è stato valutato il ruolo di ERK, ed anche in questo caso sono riportati in letteratura dati discordanti.

Jaiswal e collaboratori (2000) hanno osservato sulle hMSC, durante il differenziamento osteogenico, un incremento della fosforilazione di ERK tra il settimo e l'undicesimo giorno dall'inizio del trattamento. Questa aumentata fosforilazione correla con l'aumento dell'espressione di alcuni markers del differenziamento osteogenico come l'osteopontina e con l'inizio della deposizione della matrice extracellulare. L'inibitore PD98059 durante il processo differenziativo blocca l'osteogenesi di hMSCs in modo dose dipendente. L'ipotesi postulata dal gruppo vede ERK implicato nello sviluppo di un signaling loop che contribuisce all'accumulo dei fattori responsabili del differenziamento di hMSCs. Risultati analoghi sono stati evidenziati attraverso indagini su colture cellulari di pre-osteoblasti MC3T3-E1 in cui viene attribuito ad ERK il ruolo di attivatore, tramite fosforilazione, del fattore trascrizionale Cfba-1 (Xiao et al., 2000). Al contrario il gruppo di Higuchi (Higuchi et al., 2002) riporta un aumentata mineralizzazione della matrice extracellulare in seguito al trattamento delle colture cellulari di mioblasti murini C2C12 e pre-osteoblasti MC3T3-E1 con il medium di differenziamento osteoblastico al quale è aggiunto l'inibitore PD98059. L'ipotesi postulata dal gruppo, per spiegare l'incremento dell'attività della fosfatasi alcalina e dell'espressione del collagene di tipo I evidenziate con il trattamento delle colture con l'inibitore di MEK-1, è che tale inibizione promuova la produzione delle BMP e queste andrebbero poi ad indurre l'espressione dei geni implicati nel differenziamento osteocitico.

In uno studio condotto su MC3T3-E1 è stato dimostrato che ERK1 fosforilato a sua volta fosforili ed attivi il fattore trascrizionale RUNX2. Tale attivazione porta ad un incremento del differenziamento osteogenico (GE et al., 2012).

Si è cercato di riassumere questo ambiguo effetto delle MAPK sul differenziamento osteogenico ed una sintesi logica sarebbe essere che la fosforilazione di Runx2 da parte del MAPK pathway promuove il differenziamento osteogenico mentre la fosforilazione di Smad sempre da parte del MAPK pathway lo inibisce (Schindeler et al., 2006).

### **3. Wnt signaling**

La cascata del segnale di Wnt è stata scoperta per la prima volta nel 1980 nel tumore alla mammella di topo indotto da virus tumorale mammario murino (*Nusse and Varmus, 1982*). Da allora, il pathway di Wnt è stato studiato ampiamente ed è considerato come uno dei pathway più importante nei processi biologici. Il pathway di Wnt gioca un ruolo cruciale nello sviluppo embrionale, postnatale e nell'omeostasi tissutale adulta. Infatti Wnt regola la proliferazione cellulare, la determinazione cellulare, il differenziamento e la polarità cellulare (*Logan and Nusse, 2004*). Un maggiore interesse per Wnt è sorto quando si è visto che  $\beta$ catenina (proteina intracellulare) era coinvolta nella sindrome della poliposi adenomatosa familiare (FAP) (*Rubinfeld et al 1993*). L'associazione della  $\beta$ catenina nella FAP ha portato poi ad evidenziare che Wnt era coinvolto in altre patologie umane, che vanno dai tumori a disordini metabolici e difetti nello sviluppo (*Clevers and Nusse, 2012*).

La via di trasduzione del segnale denominata Wnt rappresenta un meccanismo centrale di regolazione dell'espressione genica altamente conservato sia nei vertebrati sia negli invertebrati. Esso comprende un'ampia famiglia di ligandi e svolge un ruolo fondamentale in molteplici processi cellulari, che vanno dalla regolazione dell'embriogenesi ai processi di controllo della proliferazione delle cellule mature. In particolare, sembra coinvolto in modo cruciale nei processi di differenziazione e proliferazione delle cellule staminali (*Kato et al 2007*). Al centro di tali meccanismi, vi è il processo di regolazione di espressione della  $\beta$ -catenina, proteina intracellulare capace di dialogare alla superficie della cellula con il sistema delle caderine, ma anche di agire come fattore di trascrizione nucleare.

I ligandi Wnt sono un gruppo di 19 glicoproteine secrete che attivano recettori di superficie cellulari inducendo specifiche cascate di trasduzione del segnale intracellulare. Il pathway di Wnt può essere diviso in:

1. canonical pathway: porta alla stabilizzazione della  $\beta$ catenina (Fig6)
2. noncanonical pathway: lavora indipendentemente dalla  $\beta$ catenina (Fig7).

#### **3.1 Canonical Wnt signaling pathway**

Il Wnt/ $\beta$ -catenina o via canonica è particolarmente importante per la formazione dell'osso e il suo rimodellamento (*Galli et al, 2010; Bennett 2007*). Studi recenti suggeriscono che il percorso canonico Wnt /  $\beta$  catenina sia coinvolto nello sviluppo precoce delle ossa attraverso la promozione del differenziamento delle cellule osteoprogenitrici (*Hill 2005*) e il controllo del differenziamento e del destino degli osteoblasti.

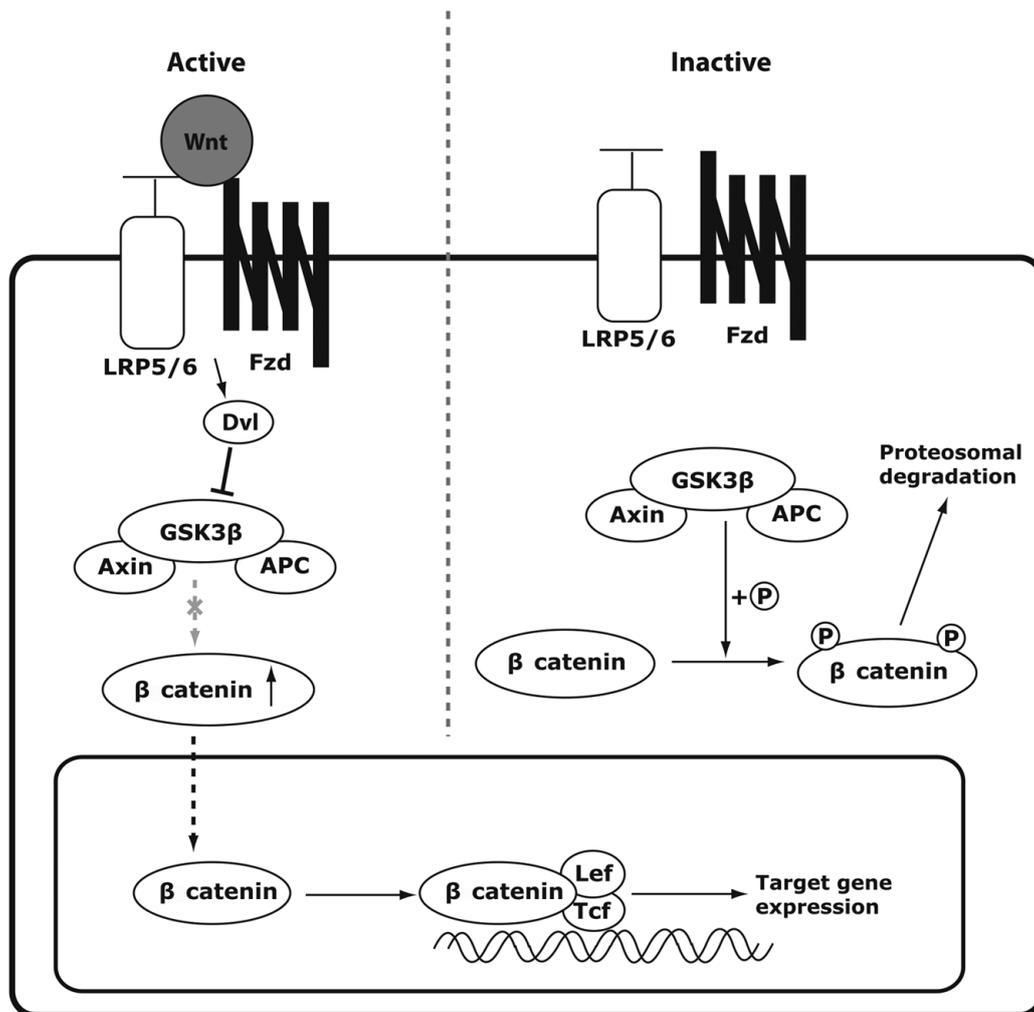


Fig6 Diagramma rappresentativo del pathway canonico del signaling di Wnt (Kim et al., 2013).

La caratteristica del signaling canonico di Wnt è la stabilizzazione della  $\beta$ catenina nel citoplasma subito dopo l'attivazione. Senza i ligandi di Wnt, la  $\beta$ catenina citoplasmatica viene fosforilata da un complesso di degradazione proteico composto da glycogen synthase kinase 3 $\beta$  (GSK3 $\beta$ ), axin e APC. GSK3 $\beta$  fosforila la  $\beta$ catenina che viene in seguito ubiquitinata e degradata dal proteasoma (Rao and Kuhl 2010). Quando invece sono presenti i ligandi canonici come Wnt 1, Wnt 3a e Wnt 8, questi si legano al recettore frizzled (Fzd) e ad un co-recettore low-density lipoprotein receptor-related protein-5 o 6 (LRP5 o LRP6), causando la fosforilazione della proteina intracellulare disheveled (Dvl). La fosforilazione di Dvl inibisce GSK3 $\beta$  mediante fosforilazione e aumenta così la  $\beta$ catenina nel citoplasma. Nel citoplasma la  $\beta$ catenina viene stabilizzata e trasloca nel nucleo.  $\beta$ catenina forma un complesso trascrizionale con T-cell factor (Tcf)/lymphoid enhancer-binding factor (Lef) e regola l'espressione di geni target come ciclina D1 e c-Myc (protooncogeni protagonisti della cancerogenesi) e PPAR $\delta$  (Loganand Nusse 2004; Rao and Kuhl 2010).

### 3.2 Noncanonical Wnt signaling pathway

La via non canonica comprende i percorsi calcio-dipendenti e Wnt / cAMP , così come la via mediata dal DSH e da c-Jun NH2-terminal kinase (JNK).

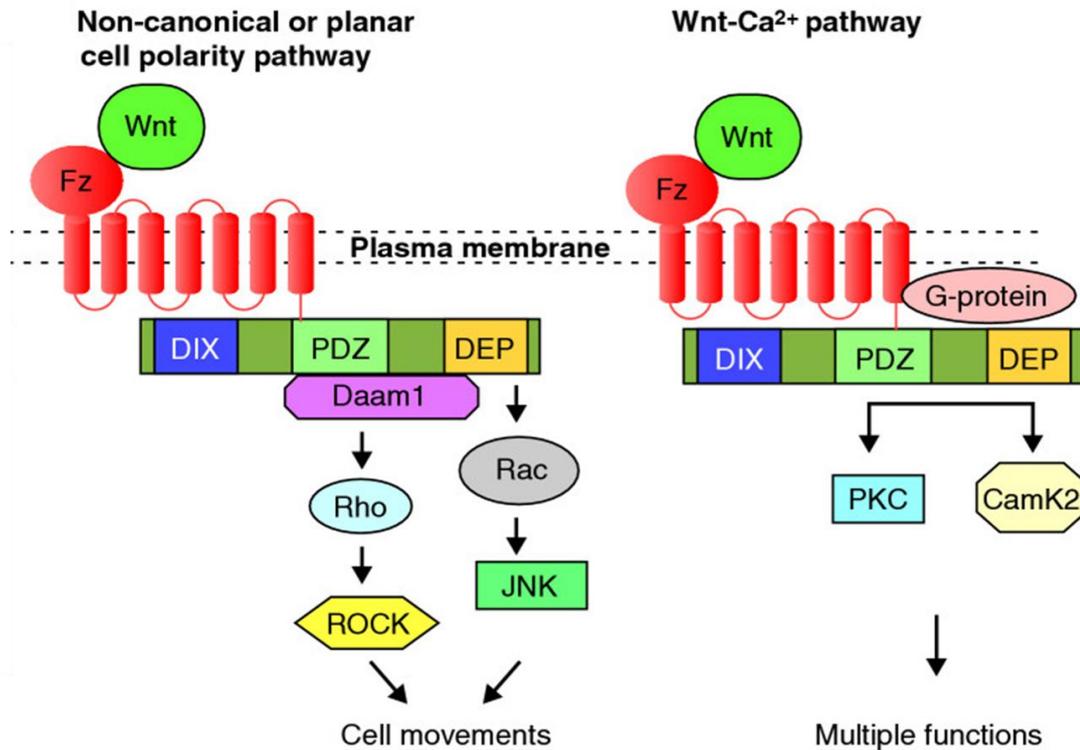


Fig7 Diagramma rappresentativo del pathway non-cononico del signaling di Wnt (Habas and Dawid 2005).

La via calcio-dipendente è importante nello sviluppo embrionale, nella migrazione cellulare e nella progressione tumorale. (De 2011). Tale pathway ha inizio quando i ligandi Wnt si legano al recettore Fzd e portano all'attivazione della proteina G ed ad una cascata del segnale che porta al rilascio intracellulare di calcio dal reticolo endoplasmatico. Tale rilascio di calcio attiva mediatori a valle, come la protein kinasi C (PKC), la calcineurina e la calcium calmodulin-dependent protein kinase II (CamK2), che a loro volta attivano fattori di trascrizione come nuclear factor kB (NFkB), nuclear factor of activated t cells (NFAT) e cAMP response element binding protein (CREB) (De 2011; Rao and Khul 2010). L'altro pathway non canonico che coinvolge la polarità cellulare è importante nella migrazione, motilità, divisione e polarità cellulare (Vladar et al 2009). Questa via regola il citoscheletro attivando delle GTPasi quali Rho, Rac e cdc42 attraverso il recettore Fzl e porta all'attivazione di chinasi come JNK (Rao e Khul 210; Sugimura and Li 2010). Tuttavia i dettagli del pathway noncanonico non sono stati ancora ben caratterizzati.

### **Il segnale Wnt/ $\beta$ -catenina nel differenziamento osteogenico**

Negli ultimi anni patologie specifiche umane dell'osso come l'osteoporosi-pseudoglioma, la sclerosteosi e la malattia van Buchem sono state associate ad un aberrante segnale di Wnt determinando così un aumentato interesse nello studio del segnale di Wnt nella biologia dell'osso (Monroe et al., 2012).

Il ruolo del pathway di Wnt nel regolare la formazione ossea trabecolare e la massa ossea è stato confermato da numerosi studi effettuati sull'uomo e in diversi modelli animali. Infatti, mutazioni genetiche che comportano una perdita o un guadagno nella funzione di LRP5, portano rispettivamente alla sindrome di osteoporosi-pseudoglioma (Gong et al., 2001) o all'aumento dell'ossificazione (LM Boyden et al., 2002). Questi risultati sono stati ulteriormente confermati in topi con deficit al recettore di Wnt, LRP5 che mostrano una riduzione nella formazione ossea e una diminuzione della proliferazione degli osteoblasti (Kato et al., 2002), mentre topi transgenici che esprimono una mutazione che attiva LRP5 negli osteoblasti, presentano un aumento della formazione ossea e un'elevata massa ossea (Babij 2003). Uno studio condotto su topi transgenici hanno dimostrato che una up-regolazione della via di Wnt porta ad un aumento della massa ossea (Bennett et al., 2007). Allo stesso modo, la deplezione degli antagonisti del segnale Wnt come SFRP-1, Dkk1, o dell'adenomatosis polyposi coli, porta a un accumulo dell'osso trabecolare in topi adulti (Manolagas, Almeida et al., 2007). Tutti questi risultati nel loro insieme, dimostrano che il pathway di Wnt agisce come regolatore centrale della massa ossea.

Comprendere il ruolo del signaling di Wnt nelle malattie dell'osso non solo ha aiutato a chiarire la patogenesi di alcune malattie, ma ha portato anche allo sviluppo di potenziali vie terapeutiche per trattare alcune patologie (Hoeppner et al., 2009; Wagner et al., 2011). In particolare, lo sviluppo di anticorpi neutralizzanti antagonisti di Wnt endogeno, come le proteine sclerostina e Dickkopf (DKK), si sono dimostrate molto promettenti nelle fasi iniziali di alcuni trials clinici. Altri potenziali target terapeutici sono in fase di indagine preclinica (Rachner et al., 2011).

E' nota l'importanza del pathway di Wnt nel promuovere il differenziamento osteogenico delle MSC. E' stato dimostrato che  $\beta$ catenina promuove la progressione delle MSC verso precursori osteoblastici e questi in osteoblasti maturi mentre sopprime il differenziamento verso i lineages adipogenico e condrogenico (Case and Rubin 2010; Glass et al., 2005). In maniera specifica, il pathway canonico di Wnt inibisce l'espressione di PPAR $\gamma$  e CEBP $\alpha$  portando alla soppressione del differenziamento adipogenico mentre up-regola regolatori osteogenici come RUNX2, Dlx5 e Osterix (Bennett et al., 2005; Kang et al., 2007). Inoltre, la  $\beta$  catenina regola il rimodellamento osseo aumentando l'espressione di osteoprotegerina (OPG) (Glass et al., 2005) un gene target del complesso  $\beta$ -catenina/TCF, e del recettore di RANKL, portando quindi all'osteoclastogenesi e al

riassorbimento osseo. La deplezione di  $\beta$ -catenina è associata a un aumento dell'osteoclastogenesi, del riassorbimento osseo e ad una ridotta espressione di osteoprotegerina.

La via di segnalazione Wnt/ $\beta$ -catenina aumenta la massa ossea attraverso la stimolazione dell'osteoblastogenesi e la soppressione dell'apoptosi degli osteoblasti, dell'adipogenesi e dell'osteoclastogenesi.

In aggiunta il pathway noncanonico di Wnt induce il differenziamento osteogenico seppur con un meccanismo diverso, in quanto il ligando Wnt5a sopprime PPAR $\gamma$  attraverso l'inattivazione della cromatina piuttosto che attraverso l'azione della  $\beta$ catenina (Takada *et al.*, 2007).

Sebbene l'interazione tra i due meccanismi indipendenti indotti dai ligandi Wnt non è ancora stato chiarito, è evidente che il signaling di Wnt regola il differenziamento delle MSC.

### **Il segnale Wnt/ $\beta$ -catenina nel differenziamento adipogenico**

Il primo studio che dimostra l'implicazione del pathway di Wnt nell'adipogenesi è stato pubblicato da Ross e collaboratori (2000). In questo articolo, è stato dimostrato che Wnt10b mantiene i preadipociti in uno stato indifferenziato attraverso l'inibizione di C/EBP $\alpha$  e PPAR $\gamma$ . Questo effetto inibitorio è stato confermato da altri gruppi (Bennet *et al.*, 2003; Kawai *et al.*, 2007). Inoltre quando il signaling di Wnt è stato bloccato con una over-espressione di TCF4 dominante-negativo, i preadipociti vanno incontro ad un maggiore differenziamento, dimostrando che l'effetto inibitorio di Wnt10b sull'adipogenesi è mediato dal pathway canonico. In aggiunta, il blocco del pathway di Wnt ha indotto il transdifferenziamento dei miociti in adipociti (Ross *et al.*, 2000), dimostrando che il signaling di Wnt è essenziale nella fase di determinazione.

A livello molecolare, è stato dimostrato che nella via canonica si ha l'attivazione di COUP-TFII, che recluta il silenziamento di SMRT complesso co-repressore dei primi introni di PPAR $\gamma$  (Okamura *et al.*, 2009). Questo mantiene la cromatina in uno stato ipoacetilato, che reprime l'espressione dei fattori trascrizionali adipogenici. Inoltre PPAR $\gamma$  può anche essere influenzato dalla via non-canonica. Per esempio, Wnt5a può attivare la cascata del segnale CAMKII-dipendente e indurre Nemo-like kinase (NLK), il quale fosforila una istone metil-transferasi. Questo porta alla formazione di un complesso co-repressore che inattiva la funzione di PPAR $\gamma$  attraverso la metilazione dell'istone H3-K9 (Takada *et al.*, 2007).

Il ruolo del signaling di Wnt nell'adipogenesi è stato esaminato anche *in vivo*. Topi transgenici che over-esprimevano Wnt10b nel promotore specifico degli adipociti FABP4 hanno meno tessuto adiposo quando nutriti con una normale dieta e sono resistenti all'obesità indotta con la dieta (Wright *et al.*, 2007). Inoltre, i topi *ob/ob* non hanno un aumento significativo del peso corporeo. Sorprendentemente, paragonati con i topi normali *ob/ob*, che sono iperfagici in seguito alla

manca di leptina e che quindi diventano obesi, i topi FABP4-Wnt10b/*ob/ob* a otto settimane di età hanno mostrato una riduzione del 70% della massa del tessuto adiposo sottocutaneo (*Wright et al., 2007*). Oltre a questi dati sul Wnt10b canonico, variazioni genetiche nel Wnt5a non-canonico sono state associate con lo sviluppo dell'obesità in modelli animali (*Almind and Kahn 2004*), suggerendo che entrambi i pathway di Wnt siano importanti per la formazione del tessuto adiposo *in vivo*. È stato dimostrato nell'uomo un ruolo fisiopatologico del signaling canonico di Wnt10b. Sequenziando il gene Wnt10b in due popolazioni indipendenti con più di 200 individui obesi, è stata trovata in questi soggetti, una mutazione nel gene Wnt10b, che annulla la capacità di Wnt10b di attivare il pathway canonico. Tale mutazione non è stata trovata nei 600 soggetti sani (*Christoulides et al., 2006*).

In questi ultimi anni è stato chiarito che il signaling di Wnt ha un ruolo unico nel controllare l'adipogenesi nelle MSC. Come dimostrato l'osteogenesi e la condrogenesi sono promosse dal pathway di Wnt, mentre l'adipogenesi è l'unico processo mesenchimale che è inibito dalle molecole Wnt (*Zhou et al., 2004, Akimoto et al., 2005*). Inoltre il promotore dell'osteopontina è up-regolato da Wnt5a, suggerendo che il signaling di Wnt esercita un effetto pro-osteogenico (*Bilkovski et al., 2009*). Infine, il signaling canonico di Wnt favorisce la condrogenesi nelle colture di periciti in presenza di TGF $\beta$ 3 come dimostrato dall'espressione di SOX9 e l'accumulo di glicosaminoglicani nella matrice (*Kirton et al., 2007*).

Negli ultimi dieci anni, è diventato sempre più evidente che il signaling di Wnt svolge un importante ruolo regolatorio nel differenziamento delle MSC in pre-adipociti. Inoltre, è stato dimostrato che negli stadi tardivi dell'adipogenesi sono necessari inibitori di Wnt per mantenere lo stato inattivo del signaling di Wnt. Questi effetti a livello cellulare e molecolare sono cruciali nella patogenesi dell'obesità e del diabete di tipo 2 come dimostrato sia nei modelli animali sia in diversi studi genetici sull'uomo.

## **4. OBESITA'**

L'obesità è una malattia cronica e multifattoriale, che ha ormai raggiunto le proporzioni di un'epidemia globale (Tedesco et al., 2008). Si tratta di una condizione caratterizzata da un eccesso di massa corporea, dovuto essenzialmente all'accumulo di grasso nel tessuto adiposo, che porta all'insorgenza di patologie correlate. L'aumento della massa adiposa è causato dalla combinazione dell'aumento di dimensioni degli adipociti (ipertrofia) e dalla produzione di nuovi adipociti (iperplasia) (Tsai et al., 2013).

### **4.1 Diagnosi**

Il parametro più utilizzato per definire il grado di obesità è l'Indice di Massa Corporea (o IMC o BMI Body mass index) (Tab.1) che si ricava dalla formula:

$$\text{BMI} = \text{peso (in kg)} / \text{quadrato dell'altezza (in metri)}$$

GRADO DI OBESITA'	BMI
- Sottopeso	<18,5
- Normopeso	18,5-24,9
- Sovrappeso	25-29,9
- Obesità moderata	30-34,9
- Obesità severa	35-39,9
- Obesità grave	>40

Tab.1 Classificazione del grado di obesità in base all'indice di massa corporea (BMI)

A questo indice si può associare la misura della *circonferenza addominale* (che consente di predire il grasso addominale), la *bioimpedenza* (è la tecnica più immediata e misura l'impedenza del corpo al passaggio di una corrente elettrica a bassa potenza e frequenza) e la metodica della *plicometria* (valuta la massa grassa, costituita da tutti i lipidi corporei distribuiti nel tessuto sottocutaneo e viscerale, e la massa magra, costituita dalle masse muscolari, dall'osso e dai tessuti inter ed intra - parenchimali non adiposi).

### **4.2 Epidemiologia**

L'obesità è in aumento in tutti i paesi occidentali, al punto da essere definita come un'epidemia. In USA questa patologia causa circa 300.000 morti/anno, diventando così la 2° causa di morte dopo il fumo.

Circa 200 milioni di adulti in tutto il mondo sono considerati obesi, e dati presi dalla National Health and Nutrition Examination Survey (NHANES) hanno mostrato che il 65% della popolazione adulta americana è sovrappeso (*Kopelman 2000*). Tale dato è aumentato considerevolmente in questi ultimi anni.

Secondo i dati raccolti nel periodo 2008-2011 dal pool delle Asl che partecipano al sistema di sorveglianza Passi (Progressi delle Aziende Sanitarie per la Salute in Italia), più di tre adulti su dieci (32%) risultano in sovrappeso ( $BMI \geq 25$  e  $< 30$ ), mentre uno su dieci è obeso ( $BMI \geq 30$ ): in tutto, più di quattro adulti su dieci (42%) sono in eccesso ponderale ( $BMI \geq 25$ ). Si tratta di una condizione più frequente negli uomini, e che cresce con l'aumentare dell'età: superati i 50 anni, infatti, più di una persona su due è in sovrappeso. Sulla base dei dati Passi relativi al 2008-2010, si stima che nella ASL Milano una quota rilevante (30%) degli adulti 18-69enni presenti un eccesso ponderale: in particolare il 23% risulta essere in sovrappeso e il 7% è obeso.

### 4.3 Obesità come fattore di rischio

Obesità e sovrappeso sono condizioni associate a morte prematura e riconosciute come fattori di rischio per le principali malattie croniche come malattie cardiovascolari, ictus, diabete, alcuni tumori (endometriale, coloretale, renale, della colecisti e della mammella in post-menopausa), malattie della colecisti, osteoartriti. Altri problemi di salute associati a un eccesso di peso corporeo sono: ipertensione, ipercolesterolemia, apnea notturna e problemi respiratori, asma, aumento del rischio chirurgico, complicanze in gravidanza, irsutismo e irregolarità mestruali. Un problema particolarmente grave è quello dell'insorgenza dell'obesità in bambini e adolescenti, esposti fin dall'età infantile a difficoltà respiratorie, problemi articolari, mobilità ridotta, ma anche disturbi dell'apparato digerente e di carattere psicologico. Inoltre, chi è obeso in età infantile lo è spesso anche da adulto: aumenta quindi il rischio di sviluppare precocemente fattori di rischio di natura cardiovascolare (ipertensione, malattie coronariche, tendenza all'infarto) e condizioni di alterato metabolismo, come il diabete di tipo 2 o l'ipercolesterolemia (epicentro, portale dell'epidemiologia per la sanità pubblica).

### 4.4 Eziopatogenesi

L'obesità può essere di due tipi: essenziale o secondaria.

Per obesità essenziale si intendono quelle forme di obesità per le quali non è stata ancora identificata l'esatta patogenesi; le ipotesi a riguardo coinvolgono fattori genetici, metabolici,

nutrizionali, sociali e culturali. Può dipendere dal ridotto consumo energetico e/o aumentato introito alimentare.

Per obesità secondaria si intendono quelle forme di obesità dovute ad alterazioni genetiche, endocrinopatie, malattie neurologiche e psichiatriche, uso dei farmaci. Tale obesità risulta molto meno frequente dell'obesità essenziale.

I fattori che determinano l'obesità possono essere distinti in genetici, ambientali e regolatori.

#### 1. Fattori genetici:

L'obesità essenziale ha una forte tendenza familiare, infatti genitori obesi tendono ad avere figli obesi: dal 41% se uno dei genitori è obeso, si arriva al 73% se entrambi i genitori lo sono. Mentre è solo del 9% se i genitori sono normopeso (*Stunkard et al 1986*).

L'obesità secondaria si associa ad altre alterazioni e/o dismorfismi, costituendo sindromi complesse di raro riscontro nella popolazione come paralipodistrofie e lipomatosi, caratterizzate da una forte predominanza della massa adiposa nella parte inferiore del corpo come nell'obesità ginoide; sindrome di Prader-Willi dovuta ad alterazione del cromosoma 15; sindrome di Laurence-Monn-Biedl autosomica recessiva, che comporta lesioni neurologiche della gliosi dei nuclei ipotalamici e ipogonadismo; sindrome di Down; ecc.

#### 2. Fattori ambientali:

L'abbondante assunzione di cibo è associata con l'obesità essenziale. Nei paesi occidentali c'è stato uno spostamento verso una dieta ad elevato contenuto di grassi. I grassi hanno la caratteristica di aumentare l'introito dei cibi poichè stimolano meno il senso di sazietà rispetto a carboidrati e proteine, e rendono i cibi più appetibili.

Uno stile di vita sedentario, come quello prevalente nelle società occidentali, è un altro importante fattore ambientale che favorisce l'obesità. L'attività fisica non solo richiede un dispendio di energia, ma anche aiuta a controllare l'assunzione del cibo

#### 3. Fattori regolatori:

L'ipotalamo e i nuclei ipotalamici regolano il comportamento alimentare grazie alla sintesi di neuroregolatori (serotonina, catecolamine, oppioidi, endogeni, ecc.) che attuano un meccanismo di controllo centrale sulla sensazione di fame e di sazietà, pertanto si intuisce come tumori, emorragie o danni da interventi chirurgici in area ipotalamica o in aree che influenzano l'attività di controllo sullo stato nutrizionale possano condurre all'obesità.

Recentemente i farmaci sono stati aggiunti all'elenco dei fattori che causano l'obesità. I farmaci più frequentemente responsabili nell'indurre un aumento di peso sono: antidepressivi, litio (stimola la deposizione di grasso nelle singole cellule adipose), antipsicotici, benzodiazepine, antistaminici (azione inibitoria sui recettori per l'istamina a livello delle aree dell'ipotalamo coinvolte nel

controllo della sensazione della sazietà), cortisonici (stimolano moderatamente l'accumulo di trigliceridi e inducono una redistribuzione del grasso corporeo), insulina (stimola la sintesi di trigliceridi e la loro deposizione a livello del tessuto adiposo, inoltre riduce la glicemia e stimola l'aumento dell'appetito), antidiabetici orali (inibiscono l'assorbimento dei carboidrati). Anche gli steroidi sessuali femminili, estrogeni e progestinici, impiegati principalmente a scopo anticoncezionale o come terapia sostitutiva della postmenopausa, inducono un aumento di peso perché provocano ritenzione idrosalina, aumento della produzione di angiotensinogeno e conseguente attivazione dell'asse renina-angiotensina-aldosterone; il progesterone poi stimola l'appetito.

Fanno parte dei fattori regolatori anche il disturbo da alimentazione incontrollata e i disturbi del tono dell'umore.

## 4.5 Terapie

- *Diete ipocaloriche ed interventi psico-comportamentali*

La restrizione calorica, o il controllo dell'alimentazione, rappresenta ancora oggi il punto centrale per la riduzione del peso corporeo. Essa mira soprattutto a correggere le errate abitudini alimentari. L'obiettivo di tale tipo di dieta è quello di ridurre l'apporto energetico giornaliero garantendo però il fabbisogno di proteine, vitamine e minerali. Per tecniche psico-comportamentali si intendono una serie di esercizi psicologici il cui scopo è quello di normalizzare il comportamento alimentare al fine di ridurre l'introito calorico e facilitare la perdita di peso.

- *Esercizio muscolare*

L'esercizio muscolare richiede un notevole impegno per una categoria di pazienti piuttosto sedentari. L'esercizio muscolare, oltre a determinare un dispendio energetico, è benefico per le funzioni cardiovascolare, respiratoria e motoria.

- *Terapia chirurgica*

Per i casi di obesità di alto grado, resistente a qualsiasi tipo di trattamento medico, è sempre più frequente e diffuso il ricorso alla terapia chirurgica bariatrica. Tale approccio terapeutico ha sollevato nel nostro paese questioni riguardo alla sicurezza del paziente obeso, in quanto è ad altissimo rischio di morte precoce ed improvvisa per le frequenti complicanze cliniche associate all'eccessivo accumulo di tessuto adiposo. Gli interventi che possono essere eseguiti sono la divisione bilio-pancreatica, il bypass gastrico e la restrizione gastrica (*Bermudez et al., 2013*).

- Terapia farmacologica:

Il farmaco ideale per la terapia dell'obesità dovrebbe essere in grado di indurre perdita esclusiva di grasso corporeo senza causare effetti collaterali. L'orientamento generale della ricerca farmacologica è indirizzato alla ricerca di farmaci che possano agire sul dispendio energetico e/o sull'assunzione dei nutrienti con effetti selettivi sulla lipolisi (scissione dei grassi) e sull'assunzione di grassi e/o carboidrati. Le principali categorie di farmaci utilizzate sono (Holes-Lewis et al., 2013):

**Anoressizzanti adrenergici**, come i preparati anfetamino-simili e non vi è alcuna indicazione all'uso di questi farmaci.

**Serotoninergici** Agiscono inducendo anoressia tramite la stimolazione del senso di sazietà. Generalmente non inducono effetti collaterali di rilievo. La dexfenfluramina rappresenta, a tutt'oggi, l'unico farmaco in commercio nel nostro Paese che ha un'indicazione elettiva per la terapia dell'obesità ma che presenta come effetto collaterale un'ipertensione polmonare.

**Peptidi** Neuropeptidi, glucagone, GH. anche se fino ad ora non è stato riconosciuto alcuna utilità di queste molecole nella pratica clinica per la terapia dell'obesità.

**Ormoni** Il loro impiego è da bandire definitivamente per due considerazioni:

1. gli ormoni tiroidei inducono perdita di peso anche per una significativa perdita di massa magra, causando quindi un bilancio azotato negativo;
2. la gonadotropina corionica ha solo effetto placebo.

In conclusione possiamo affermare che non esiste ancora un farmaco che possa essere utilizzato a lungo termine, senza effetti collaterali e con un persistente effetto sul peso corporeo. Attualmente i risultati migliori si ottengono dall'integrazione dei farmaci con la terapia dietetica-cognitivo-comportamentale.

Siccome non esiste ancora un farmaco ideale, in questi ultimi anni sono aumentati gli studi su farmaci basati su sostanze atte ad ottenere risultati senza o con sostanziale diminuzione degli effetti collaterali.

Per questo sarebbe opportuno avere a disposizione sostanze che agiscano in modo specifico sui meccanismi che determinano l'aumento della massa grassa, ossia che siano in grado di limitare la formazione di nuovi adipociti o di ridurre numero e dimensioni di quelli presenti, ovvero che siano in grado di inibire il processo adipogenico.

## **5. OSTEOPOROSI**

L'osteoporosi è un disordine scheletrico caratterizzato da una riduzione della resistenza ossea che predispone l'individuo ad un aumentato rischio di fratture. La resistenza ossea riflette principalmente l'integrazione di due proprietà fondamentali: densità ossea e qualità ossea (NIH Consensus Development Panel on Osteoporosis JAMA 285:785-95; 2001).

La fisiologica morfologia dell'osso può essere modificata da numerose patologie che portano all'alterazione delle cellule dell'osso e/o delle loro attività, come per esempio alterazioni nella componente minerale o nel rimodellamento osseo. Molte di queste condizioni portano profonde modifiche dell'attività e del metabolismo cellulare e vengono definite con il termine generico osteopatie metaboliche. L'osteoporosi è l'osteopatia metabolica più diffusa che si classifica in osteoporosi primaria (95%) e secondaria (5%).

Nelle osteopatie primarie troviamo:

- osteoporosi idiopatica del giovane adulto, dove la causa è sconosciuta;
- osteoporosi primaria o post-menopausale: dovuta alla riduzione della produzione ormonale;
- osteoporosi secondaria o senile: dovuta a varie cause, tra cui immobilizzazione, ridotto apporto di testosterone, calcio, magnesio, vitamina D, vitamina K e altri importanti micronutrienti, ridotta funzione dell'enzima 1 $\alpha$ -idrossilasi che produce l'ormone attivo della vitamina D (il calcitriolo).

Nelle osteoporosi secondarie si trovano osteopatie causate da malattie come: artrite reumatoide, malattie endocrine (iperparatiroidismo, ipertiroidismo, ipopituitarismo), malattie neoplastiche (mieloma multiplo, mastocitosi), malattie congenite (osteogenesi imperfetta, omocistinuria, malattia di Gaucher) e da immobilità (allettamento prolungato, fratture, paralisi) e da farmaci (eparina, corticosteroidi, ormoni tiroidei, anticonvulsivanti).

La riduzione della massa ossea è asintomatica pertanto il quadro clinico dell'osteoporosi dipende:

- dalla sua eziopatogenesi (osteoporosi primaria o secondaria)
- dalla sua complicità (frattura)
- dalle sequenze cliniche della frattura.

### **5.1 LA DIAGNOSI**

La World Health Organization (WHO) ha definito i vari gradi di osteoporosi e il rischio di fratture patologiche in base alla densità minerale ossea (BMD). La BMD è la quantità di materia minerale presente per centimetro quadro di osso e viene calcolata in seguito all'esame di densitometria ossea, conosciuta anche come MOC (Mineralometria Ossea Computerizzata). I metodi utilizzati per misurare la BMD sono:

1. la DXA (Dual Energy X-ray Absorptiometry) si basa sulla misurazione dell'assorbimento di raggi x da parte dell'osso in base alla sua diversa densità.

2. la densitometria ad ultrasuoni (QUS) misura la diversa intensità con cui vengono arrestati gli ultrasuoni.

La densità minerale, ottenuta grazie a questi esami, viene confrontata con quella normale per età, sesso e razza del paziente. La WHO ha definito normali i valori di densità ossea che sono entro una deviazione standard (SD). La SD è una misura statistica che valuta quanto il risultato del paziente si discosti dalla media. Si definisce osteopenia una BMD che è compresa tra 1 and 2.5 DS al di sotto della media ed osteoporosi una BMD al di sotto di 2.5 DS della media.

Il rimodellamento osseo può essere valutato attraverso l'analisi del sangue e dell'urina. Vengono analizzati markers della formazione ossea come la fosfatasi alcalina e l'osteocalcina nel sangue e i livelli di piridinolina e desossipiridinolina nelle urine mentre per il riassorbimento osseo vengono analizzati nel siero e nelle urine i livelli di collagene di tipo I (il telopeptide C-terminale e N-terminale). I livelli di questi markers non sono predittivi della massa ossea o del rischio di frattura, ma permettono di verificare una variazione dalla massa ossea.

## 5.2 FATTORI DI RISCHIO

I fattori di rischio per l'osteoporosi sono rappresentati dall'età, dal sesso femminile, dalla comparsa di una menopausa precoce (prima dei 45anni), dallo scarso introito di calcio nella dieta, dalla malnutrizione e/o malassorbimento intestinale. I soggetti di razza caucasica sono più soggetti a fratture osteoporotiche di quelli di razza nera e la presenza di familiarità aumenta il rischio di osteoporosi. L'uso prolungato di cortisonici o altri farmaci che influenzano negativamente il metabolismo osseo, il fumo di sigaretta, l'abuso di alcool ed alcune malattie endocrine della tiroide, delle paratiroidi e dei surreni sono sicuramente fattori che possono aumentare il rischio di osteoporosi e di fratture.

## 5.3 LE TERAPIE

### 5.3.1 TERAPIA NON FARMACOLOGICA

La terapia non farmacologica si basa sull'esercizio fisico, sull'astensione dal fumo e dall'alcool e da una corretta alimentazione. Deve essere quindi assunto giornalmente un adeguato apporto di calcio e di vitamina D fondamentali per il metabolismo osseo.

### 5.3.2 TERAPIA FARMACOLOGICA

L'obiettivo della terapia è quello di ridurre il rischio di fratture e questo è possibile solo se si riduce il riassorbimento osseo e/o si stimola la neoformazione ossea (Warriner et al., 2013).

I *bifosfonati* inibiscono il riassorbimento osseo e portano ad un incremento del BMD e riducono il rischio di fratture in pazienti in menopausa, maschi e pazienti con osteoporosi indotta da glucocorticosteroidi. Possono essere assunti per via orale causando, a volte, irritazioni all'esofago, oppure per via intravenosa esponendo però il paziente al rischio di una reazione di fase acuta. I bifosfonati sono capaci di ridurre il rischio di fratture vertebrali e di quelle non vertebrali come l'anca. Altri farmaci disponibili che riducono il riassorbimento osseo sono i modulatori selettivi per il recettore dell'estrogeno (*SERM*), raloxifene e basedoxifene somministrato per via orale e il denosumab (anticorpo monoclonale che inibisce RANKL) per via sottocutanea. In passato era ritenuto il trattamento migliore per la prevenzione e la terapia dell'osteoporosi mentre ora non è più raccomandato in quanto aumenta il rischio di neoplasia mammaria, di ictus e di formazione di trombi (*Calaf Alsina et al., 2013*). Il paratormone prodotto dalle ghiandole paratiroidi stimola sia il riassorbimento, sia la formazione di nuovo osso. Nelle donne in menopausa con osteoporosi, l'iniezione giornaliera sottocutanea di paratormone (1-84 PTH) e teriparatide (1-34 frammento N-terminale di PTH) ha mostrato un aumento di BMD accompagnato da una importante riduzione del rischio di nuove fratture vertebrali. La somministrazione intermittente stimola maggiormente la formazione ossea ed è stata dimostrata efficace nella prevenzione e nel trattamento dell'osteoporosi, inoltre la somministrazione giornaliera appare più efficace nell'aumentare la densità ossea vertebrale di altre terapie. L'uso di teriparatide ha ridotto il rischio di fratture vertebrali e non-vertebrali tranne che dell'anca in soggetti con menopausa e pazienti con osteoporosi indotta da glucocoidi (*Lippuner 2012*).

In questi ultimi anni sono stati identificati nuovi targets per poter intervenire e portare allo sviluppo di molecole con un potenziale terapeutico. Sono state identificate molecole capaci di stimolare la formazione ossea come degli analoghi del paratormone, calcilitici (antagonizzano il recettore del calcio sulle cellule paratiroidi, stimolando il rilascio dell'ormone paratiroideo) e antagonisti degli inibitori di Wnt (sclerostina e dickkopf-1 (*dkk1*)) e molecole capaci di inibire il riassorbimento osseo come gli inibitori di RANKL e gli inibitori di catepsina K (*Papapoulos 2011*).

In conclusione, l'osteoporosi insieme alle sue complicanze, la fragilità ossea, appartiene alle malattie croniche dei paesi industrializzati ed è diventata una delle principali voci di spesa per i servizi sanitari. Siccome la vita media si è allungata, ci si aspetta nei prossimi anni un aumento di persone colpite da osteoporosi ed è quindi importante cercare di prevenire e contrastare questa malattia. Ed è per questo motivo che in questi ultimi anni un'area della ricerca scientifica si è concentrata su questi studi, in quanto è fondamentale trovare una terapia che prevenga tale patologia e dei nuovi farmaci con effetti mirati solo sul metabolismo dell'osso e privi di effetti collaterali.

## **6. CORRELAZIONI TRA OBESITA' E OSTEOPOROSI**

Uomini e donne accumulano progressivamente massa ossea durante tutta l'infanzia, l'adolescenza e nella loro terza decade, raggiungendo il picco di densità minerale ossea ai 30 anni di età (*Gimble 1990*). Questo livello è mantenuto fino al momento della menopausa o climaterio, dopo il quale l'osso viene progressivamente riassorbito.

Oltre alle cellule mesenchimali, cellule osteoprogenitrici ed agli osteoblasti maturi, la cavità midollare è popolata da altri tipi cellulari che includono le cellule ematopoietiche e gli adipociti maturi (*Rosen et al., 2009*). Gli adipociti del midollo osseo condividono molte caratteristiche con gli adipociti extra midollari che risiedono nel tessuto adiposo. Inoltre i fattori che modulano le funzioni metaboliche e le cellule grasse del tessuto adiposo spesso hanno effetti sugli adipociti midollari. Storicamente gli adipociti del midollo erano considerati come cellule "passive" che servivano solo come riempimento delle cavità midollari. E' stato riconosciuto che queste cellule giocano un ruolo attivo nel midollo perchè sono una fonte di fattori paracrini e fonte di energia (*Gimble et al., 1996*). Gli adipociti del midollo secernono direttamente nel micro ambiente adipochine attive sull'osso come la leptina e l'adiponectina che influenzano la funzione degli osteoblasti e modulano il commitment delle cellule progenitrici mesenchimali. Gli adipociti del midollo condividono alcune caratteristiche con gli adipociti del tessuto bruno che sono coinvolti principalmente nella termogenesi e nella dissipazione dell'energia (*Krings et al., 2012*). Durante la pubertà si ha il picco della maturazione ossea e dell'adiposità midollare che è considerata come risorsa energetica. Questa adiposità midollare potrebbe anche portare ad una riduzione della formazione ossea e della BMD e, più tardivamente, essere un forte segnale premonitore del rischio di frattura.

Ci sono diverse evidenze che suggeriscono che l'obesità ed il metabolismo dell'osso siano correlate:

1. Sia gli osteoblasti che gli adipociti derivano entrambe dalle cellule staminali mesenchimali. Spesso sostanze che inibiscono l'adipogenesi stimolano l'osteoblastogenesi e viceversa, inibendo l'osteoblastogenesi si ha un aumento dell'adipogenesi.
2. La diminuzione dell'osteoblastogenesi del midollo osseo, che avviene con l'avanzare dell'età, è spesso accompagnata da un aumento dell'adipogenesi midollare (*Sadie-Van Gijzen et al., 2013*).
3. L'uso cronico di ormoni steroidei (come i glucocorticoidi) portano all'obesità, accompagnata da una rapida perdita della massa ossea (*Mussing et al., 2010*).
4. Sia l'obesità che l'osteoporosi sono associate ad un elevato stress ossidativo e portano ad un aumento della produzione di citochine pro-infiammatorie (*Wellen et al., 2003, Mundy et al., 2007*).

5. Una dieta ricca di grassi, spesso causa dell'obesità, interferisce con l'assorbimento intestinale del calcio in quanto quest'ultimo forma con gli acidi grassi dei saponi insolubili portando ad un ridotto assorbimento di calcio (*Lucas et al., 1997*).
6. Il rimodellamento osseo e l'adipogenesi sono entrambe regolate dall'ipotalamo e dal sistema nervoso simpatico (*Rosen 2006*);

La relazione pato-fisiologica tra l'obesità e la massa ossea è complessa e continua ad essere un'area di ricerca attiva. Infatti numerosi studi rivelano che le persone obese hanno elevati livelli di grasso nel fegato, nei tessuti muscolari, nel sangue e nel midollo osseo, caratteristica che aumenta l'incidenza di osteoporosi. Infatti un aumento della massa grassa nel midollo osseo porta ad un maggior rischio di fratture, indipendentemente dall'indice di massa corporea, dall'attività fisica e dall'età. Dati recenti ottenuti da studi epidemiologici e su animali, sostengono che l'accumulo di grasso sia dannoso per la massa ossea in quanto l'obesità colpisce il metabolismo osseo attraverso diversi meccanismi (*Sadie-Van Gijsen et al., 2013*).

#### 6.1 Citochine pro-infiammatorie nell'obesità

L'obesità è associata ad uno stato di infiammazione cronica che porta ad un elevato rilascio di citochine pro-infiammatorie come il TNF- $\alpha$ , interleuchina 6 (IL-6) e la proteina C reattiva (CRP) che portano allo sviluppo o alla progressione di numerose patologie tra cui quelle muscolo-scheletriche come l'osteoartrite o l'osteoporosi. Individui obesi hanno anormali livelli di TNF- $\alpha$ , IL-6, CRP, adiponectina e leptina. La leptina, aumentata nell'obesità, stimola una risposta infiammatoria nell'uomo (*van Dielen et al., 2001*). Al contrario, i livelli nel plasma di adiponectina (citochina anti-infiammatoria), che sopprime TNF- $\alpha$  indotto dall'attivazione di NF-kB, sono più bassi nei soggetti obesi rispetto agli individui non-obesi (*Arita et al., 1999*).

#### 6.2 Citochine pro-infiammatorie aumentano il riassorbimento osseo

E' noto che gli osteoblasti regolano il reclutamento e l'attività degli osteoclasti attraverso l'espressione di due proteine: RANKL e di osteoprotegerina (OPG).

1. La proteina RANKL è espressa sulla superficie cellulare degli osteoblasti e viene riconosciuta dai precursori ematopoietici (M-CSF) che possiedono il recettore specifico RANK. Tale legame porta al differenziamento e alla maturazione dei precursori in osteoclasti.
2. OPG è una glicoproteina inibitrice del riassorbimento osseo, che si lega a RANKL e ne diminuisce la disponibilità per il recettore RANK.

L'equilibrio fra la produzione di RANKL, M-CSF e OPG stabilisce il livello di osteoclastogenesi.

E' stato dimostrato che l'aumento dell'attività osteoclastica e l'aumento del riassorbimento osseo nelle donne in menopausa è correlato positivamente con l'up-regolazione di RANKL (*Eghbali-Fatourechi et al., 2003*).

Citochine pro-infiammatorie, tra cui TNF- $\alpha$ , IL-1 e IL-6 sono mediatori chiave nel processo di differenziamento osteoclastico e di riassorbimento dell'osso. L'infiammazione cronica e l'aumento delle citochine pro-infiammatorie inducono il riassorbimento osseo e una perdita ossea in pazienti con parodontite, pancreatite e artrite reumatoide. E' stato inoltre stabilito che l'up-regolazione di citochine pro-infiammatorie sono mediatori primari di osteopenia e osteoporosi. L'accelerata perdita dell'osso durante la menopausa è collegata all'aumento della produzione di citochine pro-infiammatorie come TNF- $\alpha$ , IL 1 e IL-6 (*Mundy 2007*). Queste citochine sono capaci di stimolare l'attività osteoclastica attraverso la regolazione del pathway di RANKL/RANK/OPG.

Il significativo aumento nello sviluppo dell'osteoartrite in pazienti obesi è un'altra evidenza che l'infiammazione cronica possa influenzare il metabolismo dell'osso (*Anandacoomarasamy et al., 2008*).

Mentre la ricerca su modelli animali obesi ha stabilito l'effetto negativo dell'adiposità sul metabolismo dell'osso, studi sui pazienti obesi continuano ad essere controversi. L'obesità umana è una patologia complessa caratterizzata da un eccessivo consumo di numerosi nutrienti come proteine, minerali e grassi che possono influenzare il metabolismo osseo (*Palactos 2006*). Il vantaggio di usare modelli animali obesi è quello di capire e selezionare i meccanismi attraverso i quali l'eccessivo accumulo di grasso va ad agire sul metabolismo dell'osso. Da questi studi sui modelli animali obesi, si è dimostrato che l'aumento dell'adiposità midollare è accompagnata da una riduzione del BMD e da una up-regolazione di PPAR $\gamma$ , catepsina k, IL-6 e TNF- $\alpha$  (*Halade et al., 2010*) che stimolano l'osteoclastogenesi attivando il pathway di RANKL/RANK/OPG.

La diminuzione della massa ossea con l'obesità potrebbe essere causata da:

- un aumento dell'adipogenesi midollare a discapito dell'osteoblastogenesi,
- un aumento dell'osteoclastogenesi dato da una up-regolazione della produzione delle citochine pro-infiammatorie,
- da una eccessiva secrezione di leptina o una riduzione della produzione dell'adiponectina,
- una riduzione dell'assorbimento di calcio dato da un aumentato introito di acidi grassi.

Capire la relazione tra l'obesità e il metabolismo osseo potrebbe aiutare ad identificare nuovi target molecolari che potrebbero agire aumentando l'osteoblastogenesi ed inibendo l'adipogenesi e/o diminuendo l'osteoclastogenesi. In definitiva, questa conoscenza potrebbe portare a nuovi approcci terapeutici per prevenire l'obesità e l'osteoporosi.

### 6.3 Fattori che regolano la selezione tra osteoblastogenesi e adipogenesi

#### 6.3.1. PPAR $\gamma$ PATHWAY

Il pathway di PPAR $\gamma$  gioca un ruolo chiave nel regolare l'adipogenesi (Gimble et al., 1996). Il gene per PPAR $\gamma$  (espresso nell'uomo e nei roditori) codifica per due isoforme: PPAR- $\gamma$ 1 espresso in differenti tipi cellulari, mentre l'espressione di PPAR- $\gamma$ 2 è limitata agli adipociti e alle cellule stromali del midollo osseo (Shockley et al., 2009, Tontonoz et al., 1994). PPAR- $\gamma$ 2 è riconosciuto come un regolatore trascrizionale essenziale sia per il differenziamento adipogenico, sia per lo stoccaggio lipidico degli adipociti maturi. Infatti le cellule staminali embrionali depletate di PPAR $\gamma$ 2 non riescono a differenziarsi in adipociti (Akune et al., 2004), mentre l'over-espressione di PPAR $\gamma$ 2 in fibroblasti stimola l'adipogenesi (Tontonoz et al., 2008). L'aumento dell'espressione di PPAR $\gamma$ 2 nei progenitori stromali del midollo osseo, porta ad un aumento dell'adiposità midollare e l'inibizione dell'osteoblastogenesi, dovuto molto probabilmente alla soppressione di fattori trascrizionali pro-osteogenici come Runx2 (Liu et al., 2010).

#### 6.3.2 C/EBP- $\beta$ PATHWAY

C/EBP- $\beta$  svolge un ruolo importante nell'adipogenesi, osteogenesi e condrogenesi. E' stato dimostrato che C/EBP- $\beta$  previene l'irregolare differenziamento delle MSC in cellule progenitrici e le mantiene in uno stato indifferenziato in assenza di segnali di differenziamento, mentre fa rispettare il commitment in presenza di segnali e/o stimoli differenziativi (Dingwall et al., 2011). C/EBP- $\beta$  è necessario per PPAR- $\gamma$ 2 al fine di up-regolare l'espressione del fattore di trascrizione C/EBP- $\alpha$  e stimolare l'adipogenesi (Zuo et al., 2006). Inoltre C/EBP- $\beta$  sopprime l'espressione di Runx2 nelle cellule mesenchimali naive ma questa soppressione viene eliminata in presenza di segnali osteogenici, attraverso Smad3 che provoca lo spostamento di C/EBP- $\beta$  dal promotore di Runx2 (Dingwall et al., 2011).

#### 6.3.3. WNT SIGNALING PATHWAY

Recenti studi hanno indicato che il pathway di Wnt svolge un ruolo importante nell'inibire l'adipogenesi e stimolare l'osteogenesi. L'effetto inibitorio sul differenziamento adipogenico è mediato, in parte, attraverso  $\beta$ -catenina, la quale inibisce l'espressione del gene target PPAR $\gamma$  (Liu et al., 2004). La lipoproteina LRP5 agisce come co-recettore di Wnt e questo influisce sulla formazione ossea. Studi clinici e studi in modelli animali indicano che mutazioni in LRP5 portano a dei cambiamenti nel BMD. Topi knock-out per LRP5 hanno un fenotipo osteopenico e osteoporotico mentre pazienti con mutazioni in LRP5 hanno la sindrome osteoporosi-pseudoglioma, una malattia autosomica recessiva (Mark Johnson 2012). Al contrario, studi genetici hanno

dimostrato che mutazioni puntiformi nel gene LRP5 portano ad un aumento della massa ossea nell'uomo (*Little et al., 2002*) e tale fenotipo è visibile anche in topi trasgenici con le stesse mutazioni (*Babij et al., 2003, Bodine et al., 2006*). Studi *in vitro* hanno dimostrato che Wnt10b e Wnt3a up-regolano l'espressione dei fattori di trascrizione osteogenici, come Runx2 e osterix, mentre down-regolano PPAR- $\gamma$ 2 e C/EBP- $\alpha$  (*Bennet et al., 2005*). Inoltre Wnt5a induce l'espressione di Runx2 promuovendo l'osteoblastogenesi nelle cellule staminali mesenchimali in quanto forma un complesso co-repressorio che inibisce l'attività trascrizionale di PPAR- $\gamma$ 2 (*Takada et al., 2007*) (Fig8).

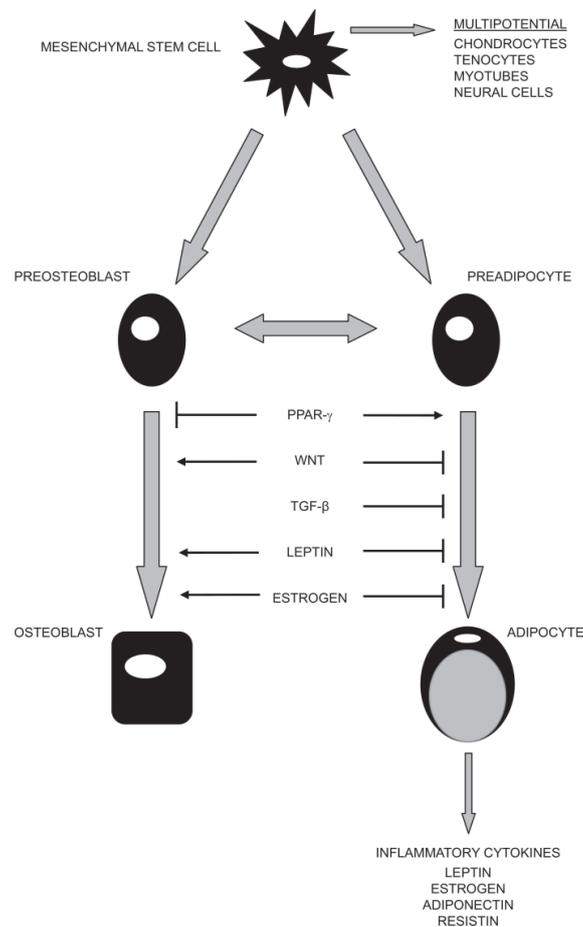


Fig8 Fattori comuni condivisi nel differenziamento adipogenico e osteogenico (*Zhao et al., 2008*). Dai lavori in letteratura si evince che esiste una relazione tra la massa grassa e la massa ossea. Per esempio, PPAR $\gamma$  favorisce il differenziamento delle hMSC verso il lineages adipogenico rispetto all'osteogenico (*Pai et al., 2004*). Al contrario, il pathway di Wnt inibisce l'adipogenesi (*Bennett et al., 2002*) mentre promuove l'osteogenesi (*Gimble et al., 2006*). Questa relazione inversa è stata chiamata "paradigma see-saw" che descrive la relazione tra la massa grassa e la massa ossea nel midollo osseo (*Sadie-Van Gijsen et al., 2013*).

L'obesità e l'osteoporosi rappresentano un problema socialmente e clinicamente rilevante. Le terapie per queste due patologie sono innumerevoli e non prive di effetti collaterali. Per questo motivo in questi ultimi anni, sono in crescita gli studi volti a sviluppare nuovi e più efficaci farmaci anti-obesità e pro-osteogenici. Per ottenere questo sarebbe opportuno avere a disposizione sostanze che agiscano in modo specifico sui meccanismi che determinano le variazioni della massa grassa e della massa ossea. Il farmaco ideale infatti dovrebbe:

- inibire il processo adipogenico limitando la formazione di nuovi adipociti e/o riducendo numero e dimensioni di quelli presenti;
- stimolare il differenziamento osteogenico ed inibire l'osteoclastogenesi.

A tale proposito gli studi *in vitro* rappresentano un punto importante sia per valutare l'effetto di tali sostanze che per comprendere i meccanismi alla base delle loro azioni. La maggior parte degli studi condotti sul differenziamento adipocitico e sulla sua inibizione sono stati condotti su linee di preadipociti murini (3T3-L1) o umani mentre sono state utilizzate linee murine MC3T3-E1 e C3H10T1/2 per il differenziamento osteogenico.

Nonostante la rilevanza dei dati ottenuti grazie a questi modelli cellulari, i risultati sono spesso controversi, anche in considerazione del fatto che i processi differenziativi nell'uomo e nei roditori possono essere regolati a livello molecolare in modo significativamente diverso. Inoltre questi modelli sono basati su cellule già indirizzate verso il differenziamento adipocitico o osteogenico, e quindi non prendono in considerazione il processo di determinazione che porta la cellula progenitrice ed indifferenziata verso un lineage mesengenic. Le cellule staminali mesenchimali (MSC) in questo contesto rappresentano un modello cellulare particolarmente utile in quanto possono essere efficacemente indotte, da uno stato indifferenziato, allo stato di adipociti o osteoblasti, di cui peraltro rappresentano fisiologicamente i precursori biologici.

## 7. ACIDO VALPROICO e VALPROMIDE

L'Acido Valproico è un acido grasso a catena ramificata a 8 atomi di carbonio (Fig9) mentre la valpromide (Fig10) è un amide primario dell'acido valproico.

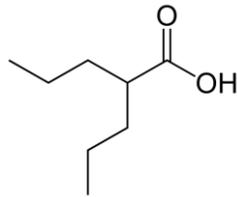


Fig9 Struttura chimica dell'acido valproico

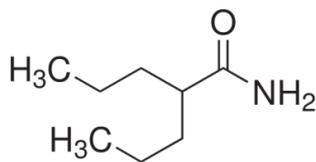


Fig10 Struttura chimica del valpromide

L'acido valproico (AVP) e la valpromide (VPM) sono indicati come farmaci nel trattamento di alcune forme di epilessia, in caso di disordini bipolari ed emicranie.

L'AVP, inibitore delle istoni deacetilasi (HDAC), agisce attraverso molteplici meccanismi d'azione: inibisce i canali del sodio a voltaggio dipendenti, rafforza la via GABAergica e inibisce la trasmissione eccitatoria del glutammato (*Loscher, 1999; Owens & Nemeroff, 2003*).

La VPM è considerata un profarmaco dell'AVP in quanto deve subire biotrasformazioni prima di poter esercitare un effetto farmacologico. Nonostante la loro somiglianza chimica, la farmacocinetica dei due farmaci nell'uomo è ben diversa. Confrontato con l'AVP, la VPM ha una breve emivita (media +/- SD: 0.84 +/- 0.33h), un valore di clearance elevata ed un ampio volume di distribuzione. Nonostante la sua rapida biotrasformazione ad AVP, la VPM ha caratteristiche diverse, infatti non è un inibitore delle HDAC ed inibisce l'enzima epossido-idrolasi (*Bialer 1991*).

Le HDACs catalizzano la rimozione dei gruppi acetile dai residui di lisina nelle code ammino-terminali degli istoni del nucleosoma. Questo processo di alterazione della struttura terziaria del DNA che controlla la trascrizione, porta ad una modulazione dell'accessibilità dei fattori trascrizionali alle loro sequenze target di DNA. In uno stato ipoacetilato, i nucleosomi sono compattati e risultano non permissivi alla trascrizione, mentre l'acetilazione degli istoni porta ad un rilassamento della struttura con una maggiore accessibilità ai fattori trascrizionali (*Pazin et al., 1997*). Ci sono tre classi di HDACs:

- classe I (HDACs 1, 2, 3 e 8),
- classe II (HDACs 4, 5, 6, 7, 9 e 10)

- classe III (è strutturalmente distante rispetto alle altre due e non è inibita dai normali inibitori delle HDACs di classe I/II).

L'AVP inibisce le HDACs di classe I e II, con un effetto maggiore per la classe I.

In questi ultimi anni, studi sull'AVP hanno dimostrato la sua attività come agente antineoplastico (*Blaheta et al., 2002*) e per il trattamento del dolore neuropatico (*Johannessen et al., 2003*). L'AVP è ben tollerato (*Jallon et al., 2001*) ma presenta effetti collaterali quali tremori, sedazione, alopecia e variazioni nel peso corporeo. Il meccanismo di tali effetti collaterali non è ancora stato chiarito. Uno studio ha riportato che il 37% dei pazienti di sesso femminile con epilessia, trattati con VPA per un anno, ha subito un aumento dell'indice di massa corporea (*Verrotti et al., 1999*). Sono stati condotti numerosi studi sull'effetto dell'AVP sul peso di donne adulte in quanto questa sostanza può indurre alterazioni endocrine che includono iperandrogenismo, disturbi mestruali e/o ovaie policistiche. Allo scopo di comprendere perché l'acido valproico determini una variazione nel peso sono stati fatti numerosi esperimenti in diversi modelli animali. Tali studi hanno dimostrato che l'acido valproico causa perdita di peso sia nei topi (*Chapman et al., 1984*) che nei ratti (*Wolden-Hanson et al., 1998*). Tuttavia l'acido valproico in scimmie femmine porta ad un aumento di peso (*Ferin et al., 2003*). Quindi tale effetto collaterale può essere diverso a seconda della specie esaminata.

Dati di letteratura indicano che le HDAC svolgono un ruolo importante nei diversi tipi di differenziamento mesengenicico (*Cho et al., 2005; Lagace et al., 2004*). Il ruolo delle HDAC nel differenziamento adipocitico non è ancora chiaro, ma recenti studi *in vitro* hanno evidenziato una riduzione dell'attività delle HDAC per l'attivazione trascrizionale di geni adipogenici.

Per analizzare l'effetto sul differenziamento adipogenico di AVP sono stati effettuati studi *in vitro* su preadipociti murini 3T3-L1 e su preadipociti umani. L'inibizione del differenziamento attraverso AVP è caratterizzato da una riduzione dei livelli di mRNA e proteici di importanti fattori trascrizionali quali PPAR $\gamma$  e SREBP1a. I livelli di mRNA di C/EBP $\alpha$  non variano con il trattamento con AVP; tuttavia si osserva una riduzione significativa dei livelli proteici di C/EBP $\alpha$  (*Lagace et al., 2004*). Da questo studio si evince che l'AVP ha un effetto anti-adipogenico sui preadipociti murini e umani anche se il suo meccanismo d'azione non è stato ancora chiarito. In questo stesso studio è stato analizzato l'effetto di VPM ma non si sono notate differenze.

Inoltre sono stati effettuati studi sull'effetto dell'AVP e della VPM sul differenziamento osteogenico con interessanti risultati. Cho e collaboratori (2005) hanno dimostrato che un pre-trattamento di un giorno o il trattamento per i primi 3giorni del differenziamento osteogenico con AVP aumenta, in maniera dose dipendente, la deposizione di calcio e l'espressione di geni osteogenici (osteopontina, BMP-2, osterix e runx2) in cellule stromali derivate dal midollo osseo (hBMSC) e dal tessuto

adiposo (hADSC). Inoltre hanno verificato che il trattamento con AVP porta ad una inibizione della proliferazione delle hADSC e hBMSC in maniera dose-dipendente. Contemporaneamente hanno testato anche VPM sulle stesse cellule senza avere risultati significativi sul differenziamento osteogenico.

Lee e collaboratori hanno evidenziato che il trattamento con AVP causa una inibizione della crescita delle cellule staminali mesenchimali (hMSC) derivate dal cordone ombelicale o dal tessuto adiposo. Infatti è stata osservata una over-espressione di p21 causata da un aumento dell'acetilazione degli istoni H3 e H4 che ha portato ad un blocco del ciclo cellulare alla fase G2/M. Le hMSC sono state pretrattate con AVP e poi differenziate in senso condrogenico, adipogenico ed osteogenico per valutare il ruolo delle HDAC nella pluripotenza delle MSC. L'AVP diminuisce l'efficienza del differenziamento adipogenico e condrogenico, mentre il differenziamento osteogenico è risultato incrementato. In conclusione l'attività delle HDAC è essenziale per il mantenimento del self-renewal e della multipotenza delle hMSC (*Lee et al., 2009*). Altri due lavori che utilizzano come modello cellulare delle linee murine (MC3T3-E1 e C3H10T1/2), dimostrano che l'AVP promuove la maturazione osteoblastica. Schroeder e collaboratori dimostrano che gli inibitori delle istoni deacetilasi causano una iperacetilazione dell'istone H3 inducendo un aumento transiente della proliferazione osteoblastica ed un aumento del fattore trascrizionale Runx2 (*Schroeder et al., 2005*). Nel secondo lavoro si conferma il fatto che l'AVP riduce la proliferazione cellulare in maniera dose-dipendente mentre promuove il differenziamento osteoblastico in presenza di una matrice extracellulare. Dopo il trattamento con AVP sono aumentati i livelli di osteocalcina, osteopontina e collagene di tipo 1 $\alpha$ 2 (*Hatakeyama et al., 2011*).

Nel lavoro di Cho e collaboratori (2012), si è dimostrato che l'AVP sulle hMSC ha anche un effetto protettivo contro il danno ossidativo, migliora l'abilità migratoria e ha un effetto anti-apoptotico. Inoltre hanno dimostrato un aumento dell'espressione dei fattori trofici (BDNF, bFGF-2 e GDNF) dopo 12h di trattamento con VPA.

Pochi sono i lavori presenti in letteratura sull'effetto della VPM sul differenziamento adipogenico e osteogenico. Da questi studi sembra che la VPM non abbia effetto sul differenziamento mesenchimale, dimostrando che la proprietà dell'AVP quale inibitore delle istoni deacetilasi, potrebbe essere responsabile della modulazione dei diversi differenziamenti (*Lagace et al., 2004*) (*Lee et al., 2009*). L'AVP agisce attraverso molteplici meccanismi, non del tutto chiariti, ma questa sua complessità è probabilmente alla base dell'ampio spettro d'azione. La conferma dell'azione anti-adipogenica e pro-osteogenica dell'acido valproico e la comprensione dei meccanismi alla base di tali effetti sono fondamentali per poter ipotizzare un uso di questa sostanza nel trattamento dell'obesità o dell'osteoporosi.

## **8. BERBERINA**

La berberina (BRB) è una sostanza, dal sapore amaro e di colore giallo intenso, presente nella corteccia, nelle radici e nei fusti di piante appartenenti al genere *Berberis*, come il crespino (*Berberis vulgaris*) (Fig11).

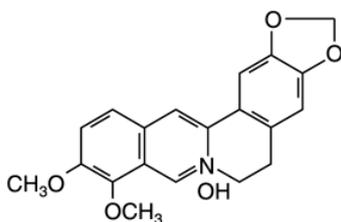


Fig11 Struttura della Berberina

È un alcaloide del gruppo della protoberberina e possiede numerose proprietà biologiche. La berberina è utilizzata nella medicina tradizionale: riduce la peristalsi intestinale, ha attività sedativa, ha azione antibatterica, induce bradicardia, è rilassante e riduce il ritmo cardiaco. Ad oggi è indicata nel trattamento della gastrite, coliti spastiche, spasmi viscerali di origine psicosomatica, psoriasi, orticaria e del prurito (*Yin et al., 2008*). Recentemente è stato riportato che la berberina ha anche un effetto anti-tumorale, anti-diabetico, anti-iperlipidemico, anti-ipertensivo e anti-infiammatorio (*Vuddanda et al., 2010*).

Una ricerca, pubblicata su *Nature Medicine* nel 2004, indica la berberina come una possibile alternativa alle statine contro il colesterolo definendola come un alcaloide vegetale particolarmente attivo nella riduzione della colesterolemia. *In vitro* è stato dimostrato che la berberina possiede un meccanismo d'azione diverso da quello delle statine, infatti non agisce bloccando la sintesi endogena del colesterolo (meccanismo delle statine) ma aumentando l'attività del gene per il recettore del colesterolo presente nel fegato facilitandone, di conseguenza, il riassorbimento dal sangue. Si assiste così ad una diminuzione media della concentrazione ematica di colesterolo del 29% e del 35% circa di trigliceridi (*Kong et al., 2004*). Utilizzando cellule di epatoma umano, è stato osservato che la Berberina aumenti l'espressione del recettore per la lipoproteina a bassa densità (LDLR) ( e che avvenga mediante un meccanismo post-trascrizionale stabilizzante l'RNA messaggero (*Kong et al., 2004*).

Recenti studi hanno evidenziato l'efficacia della berberina come ipoglicemizzante in pazienti affetti da diabete mellito di tipo2. La sostanza sembra agire principalmente aumentando l'espressione dei recettori per l'insulina, con aumentata sensibilità a questo ormone e riduzione dell'insulinoresistenza (*Yin et al., 2008*).

In un altro studio si è visto che, in topi obesi sottoposti ad una dieta ricca di grassi, l'uso della berberina ha portato ad una riduzione del peso, del livello di glucosio nel sangue, di trigliceridi e del livello totale di colesterolo accompagnati da una down regolazione dell'espressione di PPAR $\gamma$ , C/EBP $\alpha$  e una up-regolazione dell'espressione di GATA-3. L'uso della berberina non ha avuto effetti avversi su questi topi (Hu et al., 2010a).

Sono stati valutati gli effetti di berberina (BRB) sul gene e sui livelli di espressione proteica di GATA-1, GATA-2 e GATA-3 durante il differenziamento *in vitro* di human white preadipocyte (HWP) e preadipociti murini 3T3-L1. I risultati mostrano che successivi trattamenti con BRB portano ad un aumento dei livelli di mRNA e di espressione proteica di GATA-1 (Kim 2007), GATA-2 e 3 ed a una inibizione del differenziamento adipocitico (Hu et al 2010b; Hu, Davies 2009).

Numerosi sono gli studi effettuati sui preadipociti murini 3T3-L1 per capire i meccanismi molecolari alla base dell'azione di BRB. Tali lavori riportano che questa sostanza agisce riducendo l'espressione di PPAR $\gamma$  e C/EBP $\alpha$  sia a livello di mRNA che proteico (Ikarashi et al., 2012, Huang et al., 2006) aumentando l'espressione degli inibitori di C/EBP come CHOP e DEC2 (Pham et al., 2011) senza modulare il pathway di Wnt/ $\beta$ catenina (Bae, Yoon 2013).

In uno studio effettuato da Choi BH. e collaboratori (2006) è stata studiata l'espressione di fattori adipogenici e lipolitici in cellule 3T3-L1 trattate con diverse dosi di BRB. Il trattamento ha portato ad una riduzione sia della leptina che dei fattori adipogenici quali PPAR $\gamma$ , C/EBP $\alpha$ , SREBP-1c, fatty acid synthase, acetyl-CoA carboxylase, acyl-CoA synthase, lipoprotein lipase. Hanno inoltre dimostrato anche una down-regolazione dei livelli di mRNA di markers infiammatori come TNF- $\alpha$ , IL-6 e la proteina C reattiva. I dati quindi dimostrano che BRB ha un effetto sia anti-adipogenico che anti-infiammatorio su adipociti 3T3-L1.

Questi dati suggeriscono che la BRB possieda un potenziale farmacologico nel prevenire l'obesità. È stato testato anche l'effetto della BRB sul differenziamento osteogenico. È stato dimostrato *in vitro* su cellule murine che la BRB aumenta l'espressione di osteocalcina e osteopontina e promuove l'attività trascrizionale di Runx2. BRB attiva p38 ed aumenta l'espressione di COX2, due fattori chiave del differenziamento osteogenico ed inoltre gli autori hanno dimostrato che la BRB attiva il pathway p38MAPK-Runx2 che porta ad un aumento del differenziamento (Lee et al., 2008).

Uno studio *in vivo* ha dimostrato che BRB previene l'osteoporosi indotta da glucocorticoidi in ratti attraverso l'inibizione dell'osteoclastogenesi ed aumentando la formazione ossea (Xu et al., 2010). In un altro lavoro si è dimostrato che BRB somministrata per via orale in topi con senescenza

accelerata ha portato un aumento del BMD ed una inibizione dell'attività osteoclastica (*Li et al., 2003*)

La molteplicità di azioni benefiche, la capacità di operare a più livelli e l'assenza di effetti collaterali significativi, contribuiscono a rendere la berberina uno degli integratori più interessanti del momento, sul quale si concentrano le ricerche di numerosi studiosi. Nel frattempo, in commercio, sono già apparsi i primi prodotti a base di berberina, dove viene spesso associata ad altre sostanze con attività analoga.

I dati scientifici di supporto all'utilizzo della berberina per il trattamento dell'obesità e dell'osteoporosi sono però ancora molto scarsi. È necessaria una valutazione approfondita dell'effetto anti-adipogenico e pro-osteogenico di questa sostanza prima di poterla considerare un valido strumento farmacologico per il trattamento di queste patologie.

## 9. HIBISCUS SABDARIFFA

L'Hibiscus Sabdariffa L. (appartenente alla famiglia delle Malvaceae), comunemente conosciuto in Inghilterra come roselle e in Arabia come karkadè, è una pianta che cresce diffusamente nell'Africa centrale e occidentale e nel sud est asiatico. E' una pianta perenne e dai fiori rossi si ottiene il karkadè, utilizzato per la produzione di tisane e confetture. Questi estratti sono utilizzati nella medicina popolare contro diverse patologie come (Wang *et al.*, 2000, Ross 2003, Hirunpanich *et al.*, 2006): ipertensione, problemi epatici, stati febbrili, tosse e calcoli renali.

Viene anche utilizzato come antibatterico e antifungineo e come agente antispasmodico, ipocolesterolemico e cardioprotettivo.

I fiori dell'Hibiscus Sabdariffa contengono molti composti chimici che comprendono: polifenoli, flavonoidi, acido protocatechico, alcaloidi, acido L-ascorbico, carotinoidi, anisaldeide, galattosio, mucopolisaccaride, pectina, polisaccaridi e acido stearico (Segura *et al.*, 2008; Ali 2005) (Fig12).

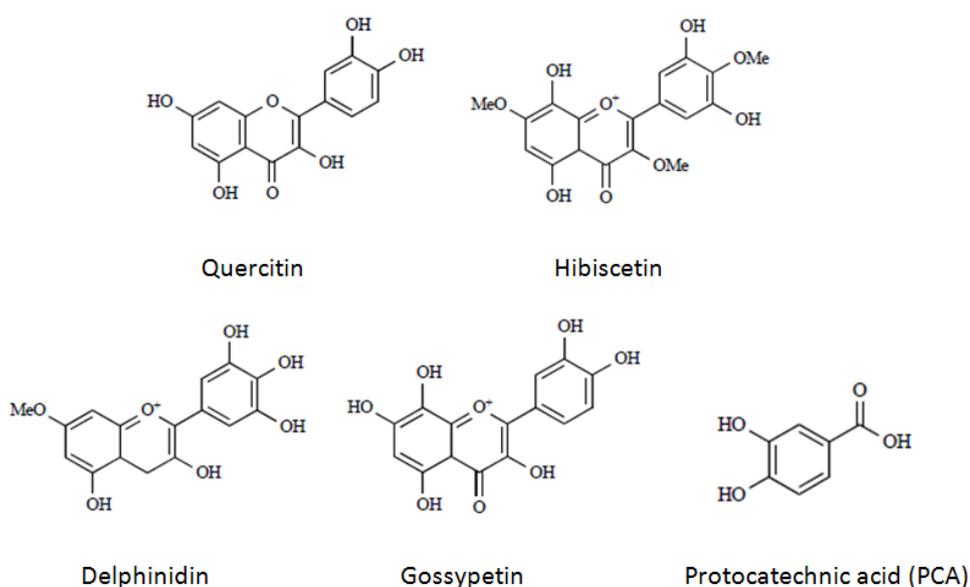


Fig12 Struttura chimica di alcuni flavonoidi e di acidi protocatecuici

L'estratto di Hibiscus Sabdariffa (HIB) ha un effetto anti-ipertensivo e cardio-protettivo in ratti ipertesi (Onyenekwe 1999). Uno studio ha dimostrato che la bevanda all'estratto di HIB abbassa anche la pressione sanguigna nei pazienti con ipertensione e diabete di tipo II. Studi *in vitro* hanno dimostrato che l'estratto di HIB è un composto vasorilassante, probabilmente in quanto agisce sui canali del calcio, inibisce l'enzima convertitore dell'angiotensina (ACE) ed è un agente diuretico (Herrera 2004). In pazienti con ipertensione, l'estratto di HIB riduce significativamente l'attività plasmatica di ACE e le concentrazioni di sodio nel siero senza modificare i livelli del potassio

(Herrera 2004; Herrera 2007). Un altro studio ha descritto come l'estratto di HIB induca un effetto rilassante endotelio-dipendente attivando la via della sintesi dell'ossido nitrico endoteliale (eNOS) attraverso il pathway Pi3-K/Akt (Sarr 2009). Ajay et al (2007) hanno mostrato che l'estratto di HIB ha un effetto vasodilatatore sulla reattività vascolare nelle aorte isolate da ratti spontaneamente ipertensivi e questo effetto è probabilmente mediato attraverso il pathway della sintesi dell'ossido nitrico endoteliale (eNOS)-cGMP-relaxant e dall'inibizione dell'afflusso di calcio nelle cellule del muscolo liscio vascolare.

### **Effetto dell'*Hibiscus Sabdariffa* sul tessuto adiposo e sindromi metaboliche**

Sono stati effettuati pochi studi *in vitro* per studiare l'effetto dell'HIB sugli adipociti ed i modelli cellulari utilizzati sono le 3T3-L1, preadipociti murini immortalizzati. Da tali studi è emerso che l'estratto grezzo di HIB può ridurre i livelli di mRNA di leptina durante il differenziamento adipogenico. La leptina è un ormone prodotto principalmente dagli adipociti e dal tessuto adiposo (de Heredia 2012). Tale estratto infatti potrebbe inibire l'accumulo di lipidi citoplasmatici e il differenziamento adipogenico dei preadipociti (Kim 2007). Kim e collaboratori, hanno dimostrato che nei preadipociti 3T3-L1 l'HIB inibisce in maniera dose-dipendente il differenziamento adipogenico. Tale inibizione è data dalla riduzione dell'espressione proteica e di mRNA di C/EBP $\alpha$  e PPAR $\gamma$ , attraverso il pathway di PI3-K e MAPK (pERK1/2).

Hirunpanich e collaboratori, hanno dimostrato che l'HIB possiede proprietà antiossidanti e ipocolesterolemiche in ratti e conigli con un nutrimento ad alto contenuto di colesterolo; tale effetto potrebbe essere dovuto alla capacità dell'estratto di HIB di controllare l'idrolisi di alcune lipoproteine e il loro uptake nei diversi tessuti (Hirunpanich 2006). Inoltre inibisce l'ossidazione del colesterolo, trigliceridi, LDL e la progressione dell'aterosclerosi nei conigli con un alto apporto di colesterolo nel cibo. Questa attività anti-aterosclerotica dell'HIB è stata correlata all'impedimento dell'ossidazione delle LDL nella parete arteriosa (Chen et al., 2003). Uno studio ha dimostrato che l'estratto di HIB può modulare l'assorbimento/escrezione di grassi e il peso corporeo nei ratti, aumentando l'escrezione di grassi nelle feci, accompagnata da una riduzione dei livelli di trigliceridi e di colesterolo, includendo anche le HDL (le lipoproteine ad alta densità). Questo effetto è dato dall'inattivazione della lipasi e dall'impedimento dell'up-take di 2-monoacilglicerolo negli enterociti, a causa della saturazione del sistema di trasporto specifico o dalla intensificazione del dell'acido palmitico (primo acido grasso prodotto durante la sintesi degli acidi grassi e da esso possono essere prodotti acidi grassi a catena più lunga) da sn-2 a sn-1 o sn-3. Tali effetti fanno pensare all'estratto di HIB come un possibile agente anti-obesità. (Chang et al., 2006; Carvajal et al., 2009).

E' stato effettuato un studio per valutare l'effetto dell'estratto di HIB sul profilo lipidico di individui con o senza sindrome metabolica dimostrando che l'HIB riduce in modo significativo i livelli di glucosio e di colesterolo totale, aumenta i livelli di HDL e del rapporto trigliceridi/HDL nei pazienti con tale sindrome (*Gurrola et al., 2010*).

Nei ratti con colesterolo alto, l'HIB diminuisce il numero di cellule schiumose che ossidano LDL e diminuisce anche la concentrazione di colesterolo e trigliceridi nel plasma (*Liu et al., 2006*). Chen e collaboratori, hanno dimostrato che L'HIB possiede una forte capacità antiossidante prevenendo l'ossidazione delle LDL (*Chen et al., 2003*). La somministrazione di HIB riduce l'MDA, un marker di perossidazione lipidica, nei tessuti dei ratti diabetici, suggerendo che l'estratto possieda una potente proprietà antiossidante. Questa azione antiossidante e ipolipidemica potrebbe essere correlata ai composti polifenolici intrinseci e agli acidi di-idro-benzoici, come l'acido protocatecuico (PCA) presente nell'estratto di HIB (*Ferombi et al., 2007*).

L'estratto di HIB viene utilizzato in più di 10 paesi in tutto il mondo per il trattamento dell'ipertensione e dell'iperlipidemia senza avere effetti collaterali. L'estratto di HIB ha un basso grado di tossicità con un LD50 che va dai 2000 fino ad oltre 5000mg/kg/day. Il consumo di HIB non ha portato a prove di tossicità epatica o renale, fatto salvo a eventuali effetti avversi epatici a dosi molto elevate (*Hopkins et al., 2013*).

Sono stati proposti un certo numero di potenziali meccanismi per spiegare l'effetto ipotensivo e anticolesterolo dell'estratto di HIB, ma la spiegazione più probabile è l'effetto antiossidante degli antociani che inibiscono l'ossidazione delle LDL, impedendo l'aterosclerosi, un importante fatto di rischio cardiovascolare. I dati a disposizione suggeriscono quindi che l'HIB è una sostanza promettente per il trattamento dell'ipertensione e dell'iperlipidemia, tuttavia sono necessari ulteriori studi prima del suo utilizzo in terapia.

## 10. RESVERATROLO

Il resveratrolo (3, 5, 4' triidrossistilbene) è un composto polifenolico non flavonoide che si trova in varie specie vegetali, alcune delle quali entrano a far parte della dieta umana: more di gelso, noccioline, uva. A causa della presenza nell'uva esso è presente anche nel vino, le cui proprietà benefiche sono state molto studiate negli ultimi anni. Questa molecola è stata conosciuta per secoli nella medicina asiatica e usata come farmaco antinfiammatorio (radice polverizzata di *Polygonum cuspidatum*).

La sintesi del resveratrolo nelle piante è indotta dall'esposizione alle infezioni microbiche, alle radiazioni ultraviolette e all'ozono; questa molecola può quindi essere classificata come fitoalexina (antibiotico prodotto dalle piante). Per questo motivo la produzione avviene nell'epidermide delle foglie e nella buccia dei chicchi d'uva, ma non nella polpa. È stata anche rilevata la presenza nelle parti legnose della pianta, come i raspi e i semi.

Il resveratrolo possiede più anelli aromatici, con più gruppi idrossilici ed esiste in due forme: cis-resveratrolo e trans-resveratrolo (Fig13). La forma trans è biologicamente attiva.

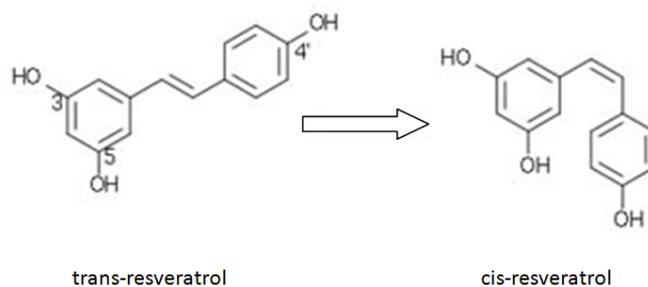


Fig13 Struttura chimica degli isomeri cis e trans-Resveratrolo (3,4',-5-triidrossistilben)

Grazie alla loro struttura i polifenoli, come il resveratrolo, sono in grado di chelare ioni metallici e hanno attività di scavengers di radicali liberi (*Brisdelli et al., 2009*). L'interesse per il Resveratrolo è nato dal paradosso francese per il quale in Francia, nonostante l'alto consumo di alimenti ricchi in acidi grassi saturi, l'incidenza di mortalità per malattie cardiovascolari era inferiore rispetto ad altri Paesi dieteticamente comparabili (*St Leger et al., 1979*). Su tale apparente paradosso si è speculato che il consumo di vino rosso potesse proteggere da malattie cardiache. Studi clinici hanno evidenziato che un consumo moderato di vino rosso produce sull'uomo una riduzione dei fattori di rischio di aterosclerosi. Nei consumatori di vino rosso si assiste infatti, ad una riduzione dell'aggregazione piastrinica, ad un incremento dei livelli plasmatici del colesterolo-HDL e ad una più bassa ossidazione delle LDL, fenomeni questi che si associano ad una minore formazione di placche aterosclerotiche nei vasi sanguigni (*Frankel, Waterhouse et al., 1993; Frankel et al., 1993*)

e quindi ad una riduzione degli eventi cardiovascolari, il che rende il Resveratrolo anche un agente cardioprotettivo.

La variabilità nella concentrazione del Resveratrolo nel vino dipende dal tipo di coltivazione e dal tempo di contatto tra la buccia dell'uva e il mosto durante la fermentazione. Infatti il Resveratrolo è presente nella buccia e non nella polpa del frutto e questo spiega le basse concentrazioni di Resveratrolo nel vino bianco, che non richiede la presenza delle bucce durante la fermentazione.

Il Resveratrolo, come molte fitoalexine, possiede numerose proprietà, tra le quali (*Brisdelli et al., 2009*):

- Proprietà antiossidanti
- Previene l'aggregazione piastrinica
- Proprietà anti-infiammatorie
- Azione antineoplastica e chemoprotettiva
- Effetto neuroprotettivo

È stato anche dimostrato che il Resveratrolo ha un ampio range di effetti sugli adipociti. In adipociti 3T3-L1 Picard e collaboratori (2004) hanno dimostrato che il Resveratrolo attiva l'over-espressione di SIRT1 che a sua volta promuove la mobilizzazione di lipidi attraverso la repressione di PPAR $\gamma$  riducendo così l'adipogenesi (*Picard et al., 2004*).

È stato anche osservato che induce apoptosi sugli adipociti maturi 3T3-L1 se utilizzato a concentrazioni elevate ma i meccanismi molecolari che inducono apoptosi non sono ancora del tutto chiari. Se usato a basse concentrazioni inibisce l'adipogenesi nei preadipociti maturi 3T3-L1 e diminuisce anche la vitalità cellulare (*Rayalam et al., 2008*). Il Resveratrolo agisce down-regolando l'espressione di PPAR $\gamma$ , C/EBP $\alpha$ , SREBP-1c, FAS, HSL, LPL e up-regolando l'espressione dei geni che regolano l'attività mitocondriale (SIRT3, UCP1 e Mfn2) (*Rayalam et al., 2007; Shakibaei et al., 2009; Athar et al., 2009*).

Quindi gli effetti del Resveratrolo sulla diminuzione dell'adipogenesi e della vitalità in preadipociti maturi non è solo mediata da una down-regolazione di fattori trascrizionali ed enzimi specifici degli adipociti ma anche da geni che modulano le funzioni mitocondriali.

Il Resveratrolo è stato anche testato sul metabolismo dell'osso ed è stato dimostrato il suo effetto nello stimolare la proliferazione e il differenziamento degli osteoblasti (*Mobasheri and Shakibaei 2013*). In uno studio effettuato su una linea cellulare murina di preosteoblasti (MC3T3-E1) è stata dimostrata la capacità del Resveratrolo di stimolare la proliferazione e il differenziamento di queste cellule ed aumentare l'attività della fosfatasi alcalina (ALP) (*Mizutani et al., 1998*). Studi recenti sulle hMSC suggeriscono che il RESV abbia un effetto su Sirt1, influenzando l'interazione con il

recettore attivatore di RUNX2 (*Shakibaei et al., 2012*). Sono stati condotti anche studi sull'effetto di RESV sul sistema RANKL/RANK/osteoprotegerina (pathway importante per il riassorbimento osseo), ed è stato dimostrato che RESV inibisce l'acetilazione indotta da RANKL e la traslocazione nucleare di NF- $\kappa$ B e l'osteoclastogenesi (*Shakibaei et al., 2011*).

L'effetto di RESV *in vivo* è contraddittorio, in quanto alcuni dimostrano un effetto benefico sulla densità minerale ossea mentre altri non notano differenze (*Csiszar 2011, Liu et al., 2005*).

Quindi i dati in letteratura indicano che il Resveratrolo possa essere un efficace agente anti-adipogenico. Per quanto riguarda il suo effetto sul metabolismo osseo, gli studi in letteratura dimostrano che i dati *in vitro* ed *in vivo* sono contraddittori e spesso non confrontabili. Sono necessari quindi ulteriori dati per confermare l'effetto pro-osteogenico del RESV.

Una conferma di tale proprietà renderebbe il resveratrolo una molecola particolarmente interessante come trattamento farmacologico dell'obesità. Infatti il suo utilizzo permetterebbe di associare all'azione anti-adipogenica un effetto positivo sul metabolismo dell'osso, spesso compromesso in pazienti obesi.

# ***MATERIALI E METODI***

## ***1. COLTURA E DIFFERENZIAMENTO DI MSCs UMANE (hMSCs)***

### ***1.1 Estrazione e coltura di hMSCs da midollo osseo umano***

Le hMSCs utilizzate in questo lavoro sono state fornite dal Laboratorio Interdipartimentale di Terapia Cellulare e Genica Stefano Verri.

Il materiale di partenza è costituito da sangue midollare fornito, previo consenso dei donatori, dalle sacche per i trapianti di midollo osseo effettuati presso il Laboratorio Verri. Il midollo osseo viene prelevato in presenza di anticoagulante (eparina, EDTA, citrato di sodio).

Il sangue midollare viene diluito 1:2 con soluzione fisiologica (NaCl 0.9%) o con PBS e centrifugato a 900 g per 10 min per rimuovere il grasso. Al termine il pellet viene risospeso in PBS ad una concentrazione di  $4 \times 10^7$  cellule/ml. In una provetta da 15 ml vengono posti circa 5 ml di Ficoll, sopra cui vengono stratificati fino ad un massimo di 3 ml di midollo, facendo attenzione a non mischiare le due fasi. La provetta viene centrifugata senza freni a 400 g per 30 min a 18-20°C.

Al termine della centrifugazione si può osservare la separazione di diverse fasi. Quella superiore è costituita da plasma, al di sotto è presente un anello costituito dalle cellule mononucleate. La fase inferiore è costituita dal Ficoll e dalle altre cellule midollari come granulociti ed eritrociti.

La fase superiore di plasma viene eliminata. L'anello di cellule mononucleate viene prelevato facendo attenzione a non toccare la fase inferiore. L'anello viene diluito 1:5 con soluzione fisiologica fredda e centrifugato a 500 g per 10 min a 4°C. Il surnatante viene eliminato e le cellule vengono risospese in fisiologica fredda.

Durante le varie fasi del processo vengono condotte delle analisi emocromocitometriche al fine di quantificare le componenti cellulari presenti nel campione. Le cellule ottenute vengono contate e piastrate in terreno DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's Medium) a basso contenuto di glucosio (DMEM-LG) (1 g/L), supplementato con L-glutamina 2 mM, penicillina 100 U/ml, streptomina 100 µg/ml, fungizone 250 µg/ml e siero (Fetal Bovine Serum, FBS) definito al 10%, inattivato a 56°C per 30 minuti, alla concentrazione di  $1-1,5 \times 10^7$  cellule per fiasca da 75 cm<sup>2</sup> in polistirene. Vengono mantenute in atmosfera umidificata con il 95% di aria ed il 5% di CO<sub>2</sub> a 37°C. Dopo due giorni il terreno di coltura viene sostituito con terreno fresco, eliminando così le cellule in sospensione.

Le cellule al passaggio p0 vengono mantenute in coltura per due settimane, fino ad arrivare al 70-80% di confluenza, cambiando il terreno due volte a settimana ed eliminando nel contempo le cellule non adese. Le cellule vengono staccate mediante tripsinizzazione (0.05% tripsina/EDTA) per 3 minuti a 37°C. La tripsina viene poi inattivata con 5 ml di terreno ed infine le cellule vengono passate in nuove fiasche ad una densità di 4000 cellule/cm<sup>2</sup> (es. 6 x 10<sup>5</sup> cells in fiasche da 150 cm<sup>2</sup>) per espandere la coltura (passaggio p1).

## 1.2 Congelamento e scongelamento delle hMSCs

Le cellule vengono staccate mediante tripsinizzazione e raccolte in una provetta di polipropilene. La provetta viene centrifugata per 10 minuti a 500 rcf e a 4°C. Il terreno viene aspirato e il pellet di cellule viene risospeso in 500 µl di FBS. Tutto il contenuto della falcon viene trasferito in una vial da congelamento, dove vengono aggiunti 500 µl di medium di congelamento costituito da FBS e dimetilsolfossido (DMSO) al 20%, raggiungendo quindi una concentrazione finale di 10% di DMSO.

La vial viene posta in un contenitore da congelamento con isopropanolo per avere una discesa della temperatura in modo controllato (1° C al minuto) e immediatamente riposta a - 80°C per una notte successivamente le cellule vengono trasferite in azoto liquido.

Per lo scongelamento le cellule vengono poste in un bagnetto termostato a 37°C fino allo scongelamento e subito poste in una provetta contenente 5 ml di terreno fresco. Dopo centrifugazione alla velocità di 500 rcf per 10 minuti, il pellet viene risospeso in terreno completo DMEM-LG e le cellule vengono piastrate in fiasche da 150 cm<sup>2</sup> ed incubate a 37°C in atmosfera umidificata con il 5% di CO<sub>2</sub>.

## 1.3 Caratterizzazione immunofenotipica attraverso l'analisi citofluorimetrica

Presso i laboratori della Fondazione Tettamanti è stato verificato il fenotipo delle hMSC, in particolare degli antigeni di membrana CD105, HLA-ABC, CD33, CD34 e HLA-DR. Presso i nostri laboratori le hMSC al p3, p4 e p17 sono state staccate, contate, centrifugate a 1000 rpm per 10 minuti a 4°C. Quindi, le cellule sono state decantate, lavate con una soluzione “*dilution buffer*” contenente FBS 3%, sodio azide 0.01% diluiti in PBS, e centrifugate a 1000 rpm per 5 minuti. Questo ciclo di lavaggio e centrifugazione è stato ripetuto altre due volte. Per la caratterizzazione immunofenotipica delle popolazioni di hMSC (10<sup>6</sup> cellule/tubo), è stata effettuata un'incubazione al buio di 40 minuti a 4°C con i seguenti anticorpi monoclonali:

- anti-human CD73 (clone AD2) coniugato a PE,
- anti-human CD34 (clone 581) coniugato a PE,
- anti-human CD105 (clone SN6) coniugato a PE.

Per valutare l'entità del legame aspecifico degli anticorpi sopracitati, le hMSC sono state incubate con l'appropriato controllo isotipico. Il controllo isotipico utilizzato è l'isotipo IgG<sub>1</sub> coniugato con PE. Dopo l'incubazione con l'anticorpo, le cellule sono state centrifugate, decantate e risospese in dilution buffer per 2 volte. L'analisi immunofenotipica delle hMSC è stata effettuata utilizzando un citofluorimetro e il software FACS Diva (BD FACScanto™ FlowCytometer, BD Biosciences, San Jose, CA, USA), dopo aver stabilito gli opportuni *gate windows* per i parametri fisici FSC (*Forward light Scatter*), indice delle dimensioni cellulari, e SSC (*Side Scatter*), indice della complessità cellulare.

#### 1.4 Induzione del differenziamento adipogenico di hMSCs

Le hMSCs vengono piastrate in dish ad una densità di  $2 \times 10^4$  cellule/cm<sup>2</sup> ( $6 \times 10^5$  cellule in dish da 60mm e  $2 \times 10^5$  cellule in dish da 35 mm) in terreno DMEM-LG completo. Dopo un giorno, le cellule vengono indotte con Adipogenic Induction Medium (AIM) costituito da:

- terreno DMEM-High Glucose (DMEM-HG, glucosio 4,5 g/l) completo,
- insulina 10 µg/ml,
- indometacina 100 µM,
- isobutilmetilxantina 500 µM,
- desametasone 1 µM.

Il terreno viene cambiato due volte alla settimana e al decimo giorno di coltura viene sostituito dall'Adipogenic Maintenance Medium (AMM) costituito da DMEM-HG completo con l'aggiunta di insulina 10 µg/ml senza altri fattori adipogenici. Per convenzione i terreni AIM e AMM verranno chiamati con il termine generico "terreno di differenziamento adipogenico".

Cellule trattate con DMEM-HG completo, senza alcun fattore adipogenico rappresentano il controllo.

Le sostanze utilizzate per indurre il differenziamento vengono preparate secondo differenti protocolli, aliquotate e conservate a -20°C:

- Indometacina e isobutilmetilxantina: vengono combinate e sciolte in DMSO ad una concentrazione pari a 0,1 M per l'indometacina e 0,5 M per l'isobutilmetilxantina, aliquotate e conservate a -20°C evitando congelamenti/scongelamenti ripetuti.
- Desametasone: viene sciolto in etanolo assoluto ad una concentrazione pari a 1 mM, aliquotato e conservato a -20°C evitando congelamenti/scongelamenti ripetuti.

### 1.5 Induzione del differenziamento osteogenico di hMSC

Le hMSC vengono piastrate su piastre precedentemente collagenate ad una densità di  $4 \times 10^3$  cellule/cm<sup>2</sup> in terreno DMEM-LG completo. Dopo tre giorni di coltura, le cellule vengono indotte al differenziamento osteogenico con Osteogenic Supplements Medium (OS medium) costituito da terreno DMEM-LG completo, con l'aggiunta di desametasone 100nm, Glicerolo 2-fosfato ( $\beta$ -GP) 10mM a Acido Ascorbico 2-fosfato (AA) 50 $\mu$ M. Cellule trattate con DMEM-LG completo rappresentano il controllo.

Le sostanze utilizzate per indurre il differenziamento vengono preparate secondo differenti protocolli, aliquotate e conservate a -20°C:

- Glicerolo 2-fosfato viene sciolto in acqua bidistillata ad una concentrazione pari a 1M;
- Acido Ascorbico 2-fosfato viene sciolto in acqua bidistillata ad una concentrazione pari a 50mM;
- Desametasone viene sciolto in etanolo assoluto ad una concentrazione pari a 1mM.

### 1.6 Induzione del differenziamento condrogenico di hMSC

Per ottenere il differenziamento in senso condrogenico le cellule sono state coltivate ad alta densità in pellet. A questo scopo le hMSC sono state staccate, contate e per ogni campione è stata prelevata un'aliquota di sospensione cellulare contenente 250000 cellule. Dopo centrifugazione per 10 minuti a 500 g a 4°C, ogni pellet è stato risospeso in 500  $\mu$ l di “*chondrogenic medium*” costituito da:

- DMEM-HG senza siero con l'aggiunta di ITS+premix (1:100),
- piruvato 1 mM,
- desametasone 100 nM,
- acido ascorbico 2-fosfato 50  $\mu$ g/ml,
- TGF- $\beta_3$  (Transforming Growth Factor- $\beta_3$ ) 10 ng/ml.

ITS+premix è un composto utilizzato per sostituire il siero ed è costituito da insulina 6.25  $\mu$ g/ml, transferrina 6.25  $\mu$ g/ml, acido selenico 6.25  $\mu$ g/ml, acido linoleico 5.35  $\mu$ g/ml e BSA (Bovine Serum Albumine) 1.25  $\mu$ g/ml.

I pellet in provetta sono stati incubati a 37°C in atmosfera umidificata con il 95% di aria ed il 5% di CO<sub>2</sub>. Il terreno è stato cambiato due volte a settimana, ponendo attenzione a non disgregare il pellet. Come controllo sono state utilizzate hMSC coltivate in pellet in terreno di coltura completo, senza l'aggiunta di altri fattori. La coltura dei pellet è stata mantenuta fino a sei settimane.

## 1.7 Trattamento con Acido valproico, Valpromide, Berberina, Hibiscus Sabdariffa e Resveratrolo nel differenziamento adipogenico e osteogenico

Le sostanze vengono preparate secondo le seguenti modalità:

- Acido valproico: sciolto in PBS ad una concentrazione iniziale di 500mM e successivamente diluito nel terreno per ottenere le concentrazioni desiderate.
- Valpromide: polvere sciolta in DMSO alla concentrazione iniziale di 500mM (aliquotato e conservato a -20°C) e successivamente diluito nel terreno per ottenere le concentrazioni desiderate.
- Berberina: sciolto in DMSO alla concentrazione iniziale di 16mM e successivamente diluito nel terreno per ottenere le concentrazioni finali desiderate.
- Hibiscus Sabdariffa: estratto sciolto in PBS alla concentrazione 1g/ml (aliquotato e conservato a -20°C) e diluito nel terreno per ottenere le concentrazioni desiderate.
- Resveratrolo: sciolto in DMSO alla concentrazione 10mM, successivamente aliquotato e mantenuto a -80°C fino al momento dell'utilizzo. Viene poi diluito in terreno per ottenere le concentrazioni volute. Le colture trattate con resveratrolo sono mantenute al riparo dalla luce diretta in quanto il resveratrolo è fotosensibile.

Le concentrazioni utilizzate per i due differenziamenti sono: Acido valproico (AVP) 5mM, Valpromide (VPM) 1mM, Berberina (BRB) 4µM, Hibiscus Sabdariffa (HIB) 5mg/ml e Resveratrolo (RESV) 10µM.

Le hMSCs vengono piastrate secondo le modalità descritte per i differenziamenti ed al momento dell'induzione vengono trattate con terreno AIM (o AMM dopo il decimo giorno) o OS a cui vengono aggiunte le sostanze. Le sostanze vengono aggiunte al medium ad ogni cambio di terreno. A 7gg, 10gg, 14gg, 21gg e 28gg le cellule vengono fissate e colorate con la specifica colorazione istologica.

### Valutazione dell'effetto delle sostanze sul differenziamento adipogenico aggiunte a diversi tempi:

Le hMSC sono state piastrate ad una densità di  $2 \times 10^4$  cellule/cm<sup>2</sup>, indotte il giorno dopo con terreno adipogenico mentre le sostanze sono state aggiunte a tempi diversi. Il 0gg indica che le sostanze sono state aggiunte sin dal primo giorno di induzione e mantenute per tutta la durata del trattamento. Il 3gg, 7gg, 10gg, 14gg e 21gg indicano i giorni dopo il differenziamento in cui sono state aggiunte le sostanze che sono state poi portate fino alla fine del trattamento. Le hMSC dopo 28gg di trattamento sono state fissate, colorate con Oil Red O e fotografate.

### Valutazione dell'effetto delle sostanze sul differenziamento osteogenico aggiunte a diversi tempi:

Le hMSC sono state piastrate ad una densità di  $4 \times 10^3$  cellule/cm<sup>2</sup> in terreno DMEM-LG completo. Dopo tre giorni di coltura, tutte le cellule vengono indotte al differenziamento osteogenico mentre le sostanze sono state aggiunte a tempi differenti. Il 0gg indica che le sostanze sono state aggiunte sin dal primo giorno di induzione osteogenica e mantenute per tutta la durata del trattamento. Il 3gg, 7gg, 10gg, 14gg e 21gg indicano i giorni di differenziamento dopo i quali sono state aggiunte le sostanze e portate fino alla fine del trattamento. Le hMSC dopo 28gg di trattamento sono state fissate e colorate con Alizarin Red S.

## **2. VALUTAZIONE MORFOLOGICA DEI DIFFERENZIAMENTI**

### 2.1 Colorazione con Oil Red O

Le cellule hMSCs vengono piastrate in dish da 35 mm di diametro e trattate per il differenziamento adipocitico in assenza o presenza di AVP, VPM, BRB, HIB e RESV. Per ogni tempo è prevista anche una coltura di controllo. Ai tempi prestabiliti le colture vengono lavate due volte con PBS e fissate in paraformaldeide 4% in tampone fosfato per 10 minuti. Le cellule fissate vengono incubate per 5 minuti a temperatura ambiente in isopropanolo 60% e successivamente in una soluzione contenente Oil Red O 1.8% in isopropanolo 60% per 15 minuti a temperatura ambiente. Al termine dell'incubazione le colture vengono lavate due volte con acqua bidistillata ed immediatamente fotografate.

L'Oil Red O è un composto diazolico, ossia una molecola costituita da tre strutture cilindriche connesse da due gruppi N = N. Tale composto ha un'alta affinità per i triacilgliceroli e gli esteri del colesterolo, i principali componenti dei depositi lipidici presenti negli adipociti, mentre l'affinità per i lipidi presenti nelle membrane cellulari è molto bassa. L'Oil Red O è un composto cromogeno, rilevabile nello spettro del visibile come una colorazione rossa.

### 2.2 Quantizzazione di Oil Red O

Dopo la colorazione con Oil Red O le dish sono trattate per 5 minuti a temperatura ambiente con isopropanolo 100% per solubilizzare il colorante. I campioni così ottenuti vengono letti allo spettrofotometro alla lunghezza d'onda di 516nm. Un pozzetto contenente isopropanolo 100% rappresenta il bianco. I relativi valori di assorbanza così ottenuti sono riportati in un grafico.

### 2.3 Colorazione con Alizarin Red S

Le cellule hMSC vengono piastrate e trattate per il differenziamento osteogenico, con o senza le sostanze alle diverse concentrazioni, come precedentemente descritto. A tempi prestabiliti le colture vengono lavate due volte con PBS e fissate in paraformaldeide 4% in tampone fosfato per 15 minuti. Le cellule fissate sono quindi incubate per 30 minuti a temperatura ambiente in una soluzione contenente Alizarin Red S 1% ed idrossido ammonio 1%. Al termine dell'incubazione le colture vengono lavate per due volte con acqua bidistillata, lasciate asciugare e fotografate.

Il colorante Alizarin Red S si lega agli ioni calcio presenti nei depositi mineralizzati e determina una colorazione rosso brillante.

### 2.4 Quantizzazione di Alizarin Red S

Dopo la colorazione con Alizarin Red S i pozzetti sono trattati per 5 minuti a temperatura ambiente con una soluzione al 5% di sodio dodecilsolfato (SDS) in 0,5M di HCl per solubilizzare il colorante. I campioni così ottenuti vengono letti allo spettrofotometro alla lunghezza d'onda di 425nm. Un pozzetto contenente solo eluente rappresenta il bianco. I relativi valori di assorbanza così ottenuti sono riportati in un grafico.

### 2.5 Processamento dei pellet e colorazione con Safranin O

#### Processamento dei pellet

I pellet di MSC trattati con chondrogenic medium o con terreno di coltura sono stati fissati mediante incubazione in 10% neutral buffered formalin per 30 minuti e disidratati mediante successivi lavaggi di 20 minuti ciascuno con etanolo 50%, 70% e 90%. I pellet sono stati poi colorati con una veloce immersione in eosina e sciacquati con etanolo 100% per 3 volte. Questa colorazione serve unicamente per visualizzare i pellet nei passaggi successivi. La disidratazione viene completata incubando i campioni per 20 min in etanolo 100% e successivamente per altri 20 minuti in xilolo prima di trasferirli in una soluzione di xilolo/paraffina 1:1 per 20 min a 60°C. In seguito i pellet sono stati incubati in sola paraffina a 60°C per tutta la notte. Il giorno successivo i pellet sono stati inclusi in paraffina e tagliati con il microtomo in sezioni con uno spessore di 7µm. Le sezioni sono state trasferite su vetrini precedentemente gelatinati e riposte in stufa calda per farle asciugare.

#### Colorazione con Safranin O

I vetrini sono stati deparaffinati con xilolo per 5 minuti e le sezioni sono state reidratate mediante successive incubazioni di 5 minuti ciascuna in etanolo 100%, 90%, 70% e 50%. Dopo un lavaggio di 5 minuti in acqua bidistillata le sezioni sono state incubate in Ematossilina di Harris per 3 minuti. Dopo il viraggio con acqua corrente le sezioni sono state lavate 1-2 volte con HCl 1% in etanolo

70% e successivamente con acqua demineralizzata. Le sezioni sono state incubate per 4 minuti con Fast Green 0.02% e lavate 1-2 volte con acido acetico 1%. Dopo un ulteriore lavaggio con acqua demineralizzata i vetrini sono stati incubati per 5 minuti in Safranin O 0.1% e lavati nuovamente in acqua demineralizzata per 5 minuti. Dopo asciugatura sotto cappa per tutta la notte, i vetrini sono stati montati con Entellan/Xilolo e fotografati con l'ausilio dell'apparecchio Nikon Coolscope. Safranin O si lega ai proteoglicani ed ai glicosaminoglicani, componenti della matrice del tessuto cartilagineo, determinandone una colorazione rosso-arancio.

### **3. MTT ASSAY**

Per valutare la citotossicità delle sostanze è stato effettuato un saggio biochimico su piastre da 96 pozzetti nelle quali sono state piastrate hMSC indifferenziate (7000 cellule per pozzetto) e hMSC indotte al differenziamento adipogenico e osteogenico con le sostanze a diverse concentrazioni. La vitalità cellulare è stata valutata attraverso il monitoraggio colorimetrico della conversione del bromuro di 3-(4,5-dimetiltiazolo-2-il)-2,5-defeniltetrazolo (MTT) a formazan. Le hMSC indifferenziate e le hMSC piastrate per il differenziamento adipogenico e osteogenico vengono indotte rispettivamente con terreno DMEM-LG, AIM e OS medium con o senza l'aggiunta delle singole sostanze a diverse concentrazioni e viene effettuato il test dopo 24h, 3, 7, 10, 14, 21, 28giorni di coltura. hMSCs mantenute in terreno DMEM-LG senza l'aggiunta delle sostanze rappresentano il controllo e vengono considerate come il 100% di vitalità cellulare.

Il saggio inizia eliminando il terreno e lavando le cellule con PBS addizionato con l'1% di una soluzione di MgCl<sub>2</sub> 50mM /CaCl<sub>2</sub> 90mM e successivamente viene aggiunto 100µl/well di DMEM (senza rosso fenolo) più 0,5mg/ml di MTT. Dopo un'ora di incubazione viene eliminato il terreno (contenente anche MTT non metabolizzato dalle cellule) ed ad ogni pozzetto viene aggiunto 150µl di etanolo assoluto e il colorante viene lasciato solubilizzare sull'agitatore per qualche minuto, per poi passare la piastra in centrifuga per 10 minuti a 2000rpm per eliminare i detriti cellulari che potrebbero interferire con la lettura dei campioni allo spettrofotometro. Vengono prelevati 100µl di surnatante da ciascun pozzetto e trasferiti in una nuova piastra; la piastra viene letta allo spettrofotometro a 570nm al quale viene sottratta la lettura a 690nm. L'etanolo assoluto viene usato come bianco e i valori letti allo spettrofotometro indicano l'attività mitocondriale, considerata indice della vitalità cellulare.

La metodica dell'MTT assay è semplice e riproducibile e misura l'attività mitocondriale della coltura cellulare. La deidrogenasi mitocondriale delle cellule vitali taglia l'anello tetrazolico dell'MTT, portando alla formazione di cristalli di formazano. I cristalli vengono sciolti in etanolo e la soluzione viola risultante viene misurata spettrofotometricamente.

## **4. SRB ASSAY**

Per valutare la citotossicità delle sostanze è stato effettuato un saggio biochimico su piastre da 96 pozzetti nelle quali sono state piastrate hMSC indifferenziate (7000 cellule per pozzetto) e hMSC indotte al differenziamento adipogenico e osteogenico con le singole sostanze a diverse concentrazioni. Dopo 24h, 3, 7, 10, 14, 21, 28gg di coltura le hMSC sono state fissate aggiungendo al terreno 50µl di TCA, acido tricloroacetico (50% TCA in acqua demineralizzata) per 60minuti a 4°C. Successivamente la piastra è stata lavata 5 volte con acqua e lasciata asciugare a temperatura ambiente (RT). Ai pozzetti asciutti sono stati aggiunti 50µl di SRB solution (0,4% di Sulforodamina-B in 1% di acido acetico) per 15minuti a temperatura ambiente. Per eliminare il colorante in eccesso sono stati fatti quattro lavaggi con acido acetico 1% e la piastra è stata fatta asciugare a RT. Per eluire il colorante sono stati aggiunti 150µl di TRIS (Tris-idrossimetilamminometano 10mM) ed è stata fatta la lettura allo spettrofotometro a 560nm considerando come bianco solo il TRIS. Colture mantenute in terreno DMEM-LG senza l'aggiunta delle sostanze rappresentano il controllo e vengono considerate come il 100% di vitalità cellulare.

L'SRB si lega agli aminoacidi delle proteine cellulari e la lettura con lo spettrofotometro del colorante legato alle proteine fornisce una stima della massa proteica totale che è a sua volta legato al numero di cellule.

## **5. ANALISI DELL'ESPRESSIONE PROTEICA DI hMSCs**

### **5.1 Preparazione di estratti proteici totali**

Al fine di ottenere estratti proteici totali ai vari tempi prestabiliti, le hMSCs vengono piastrate in dish da 60 mm secondo la densità precedentemente indicata e trattate per il differenziamento adipogenico e osteogenico con l'aggiunta di AVP 5mM, VPM 1mM, BRB 4µM, HIB 5mg/ml e RESV 10µl. A tempi prestabiliti il terreno viene rimosso e vengono eseguiti due lavaggi con PBS freddo mantenendo le piastre in ghiaccio. Vengono quindi aggiunti 200 µl di Lysis Buffer costituito da HEPES 50 mM pH 7.5, NaCl 150 mM, glicerolo 10%, Tryton x-100 10%, MgCl<sub>2</sub> 1,5 mM, Ethylene Glicol Tetraacetic Acid (EGTA) 5 mM, a cui si aggiungono inibitori delle fosfatasi e delle proteasi (Phenyl Methyl Sulfonyl Fluoride (PMSF) 4 mM, aprotinina 1%, sodio ortovanadato (Na<sub>3</sub>VO<sub>4</sub>) 10 mM e sodio pirofosfato 2mM. La lisi delle cellule avviene anche mediante azione meccanica esercitata tramite un cell lifter. Il lisato cellulare viene poi recuperato e centrifugato a 13500 rpm per 15 minuti ad una temperatura di 4°C. Il surnatante viene quindi raccolto e conservato a -80°C.

La quantità di proteine contenute negli estratti proteici preparati viene determinata secondo il

metodo di Bradford. Un'aliquota del campione (4 $\mu$ l) viene risospesa in acqua bidistillata (1ml totale) e si aggiunge 1 ml di Coomassie Reagent per un volume totale di 2 ml. Dopo cinque minuti di incubazione si valuta l'assorbanza della soluzione alla lunghezza d'onda di 595 nm. Il Coomassie si lega alle proteine in ambiente acido; tale legame determina una variazione del picco di assorbimento del Coomassie, che passa da 465 nm a 595 nm. Poiché la curva di risposta colorimetrica del Coomassie Reagent non è lineare rispetto all'incremento della concentrazione proteica, è necessario costruire una curva standard utilizzando quantità note di una proteina di riferimento. La quantità di proteine contenuta nell'aliquota viene quindi determinata attraverso il confronto tra l'assorbanza del campione in esame e quella di campioni contenenti quantità note di Bovine Serum Albumin (BSA). Una volta effettuata la misurazione dell'assorbanza dei campioni, i dati riguardanti gli standards vengono riportati su computer per poter tracciare una curva di calibrazione, in base alla quale è possibile per interpolazione risalire alla concentrazione proteica dei campioni in esame. La curva di taratura viene costruita riportando in ascissa la concentrazione di BSA e in ordinata i corrispondenti valori di assorbanza.

## 5.2 Elettroforesi su gel di poliacrilammide (SDS-PAGE) e trasferimento su filtro di nitrocellulosa

- Preparazione del gel di poliacrilammide

Le proteine vengono separate in base al peso molecolare, in condizioni di corsa denaturanti, grazie all'impiego di un gel di poliacrilammide (SDS-PoliAcrilammide Gel Electrophoresis). Il gel utilizzato per la separazione delle proteine si compone di due parti, una porzione inferiore denominata Running Gel e una superiore, denominata Stacking Gel. Il Running Gel contiene 13% di soluzione acrilammide/bis-acrilammide, Sodio Dodecil Solfato (SDS) 0,1%, Ammonio Persolfato 1%, TEMED 0,4%, Tris HCl pH 8.8 375 mM ed acqua bidistillata. Lo Stacking Gel invece contiene il 5% della soluzione madre di acrilammide/bis-acrilammide, SDS 0,1%, Ammonio Persolfato 1%, TEMED 0.1%, Tris HCl pH 6.8 125 mM e acqua bidistillata.

- Preparazione dei campioni proteici e corsa elettroforetica

Aliquote degli estratti proteici vengono risospese in Laemli Buffer 5X (SDS 10%, Tris-HCl pH 6.8 400 mM,  $\beta$ -mercaptoetanololo 5%, glicerolo 50% e blu di bromofenolo 0,5%), in modo da ottenere un rapporto in volume campione : Laemli Buffer pari a 4 : 1. Per uniformare il volume dei campioni da caricare si aggiunge Laemli Buffer 1X, preparato diluendo il Buffer 5X con acqua bidistillata. I campioni così preparati vengono centrifugati rapidamente, denaturati a 95°C per cinque minuti e caricati negli appositi pozzetti.

Le proteine migrano nel gel dal polo negativo al polo positivo dell'apparato di corsa elettroforetica grazie ad un Buffer di corsa costituito da Trisma base 30 g/L, glicina 144 g/L ed SDS 10 g/L, posto nella camera superiore e in quella inferiore dell'apparato e all'applicazione di un campo elettrico di 200V. Per seguire la migrazione dei campioni nel gel si utilizza un marker costituito da un insieme di proteine colorate a peso molecolare noto.

- Trasferimento delle proteine dal gel al filtro di nitrocellulosa

Al termine della corsa elettroforetica le proteine vengono trasferite dal gel ad un filtro di nitrocellulosa, mediante elettroblotting. Il procedimento prevede l'assemblaggio di una cassetta per il trasferimento costituita da un supporto di plastica sul quale vengono collocate nell'ordine una spugnetta, un foglio di carta 3M, la nitrocellulosa, il gel contenente le proteine, un altro foglio 3M e una seconda spugnetta. Un secondo supporto di plastica chiude la cassetta. La griglia viene posta all'interno di una camera di trasferimento contenente buffer di trasferimento (metanolo 200 ml/L, Trisma base 3,025 g/L e glicina 14,4 g/L), e sottoposta ad un campo elettrico di 180 mA a 4°C per 2 ore che permette la migrazione delle proteine cariche negativamente dal gel verso il foglio di nitrocellulosa, cui si legano covalentemente. L'efficienza del trasferimento si valuta incubando il filtro di nitrocellulosa con il Rosso Ponceau, un colorante che va a legarsi in maniera reversibile alle proteine.

### 5.3 Immunoblotting

- Anti-GSK-3beta (fosforilato in serina 9= forma inibitoria)

Il filtro di nitrocellulosa viene sottoposto ad una incubazione in Blocking Buffer costituito da Washing Buffer (Tris HCl pH 7.5 20mM, NaCl 150mM, Tween 20 0,10%) e BSA5% per 1 ora a temperatura ambiente. Successivamente viene effettuata un'incubazione over night a 4°C in presenza dell'anticorpo primario anti-GSK3beta diluito 1:1000 in Blocking Buffer. Il giorno successivo vengono effettuati tre lavaggi da 5 minuti con Washing Buffer. L'anticorpo utilizzato riconosce in maniera specifica la forma fosforilata sul residuo di serina9 di GSK-3beta. Terminati i lavaggi si procede ad un'incubazione con anticorpo secondario anti-rabbit coniugato con HRP diluito 1:1000 (Tab.4) in Blocking Buffer per 1ora, e poi a tre lavaggi da 5 minuti con Washing Buffer. Terminata la procedura viene effettuata la reazione di chemiluminescenza che permetterà di visualizzare GSK-3beta in corrispondenza del peso molecolare di 46 kDa.

- Anti-βcatenina

Il filtro di nitrocellulosa viene sottoposto ad una incubazione in Blocking Buffer costituito da Washing Buffer (Tris HCl pH 7.5 20mM, NaCl 150mM, Tween 20 0,05%) e latte magro 5%, per

un periodo di 1 ora a temperatura ambiente. Successivamente viene effettuata un'incubazione overnight a 4°C in presenza dell'anticorpo primario anti-βcatenina diluito 1:500 in Blocking Buffer. Il giorno successivo vengono effettuati tre lavaggi da dieci minuti l'uno con Washing Buffer. Terminati i lavaggi si procede ad un'incubazione con anticorpo secondario anti-mouse coniugato con HRP diluito 1:2000 (Tab.4) in Blocking Buffer per un'ora, e poi a tre lavaggi da cinque minuti l'uno con Washing Buffer e l'ultimo con Washing Buffer privo di Tween 20. Terminata la procedura viene effettuata la reazione di chemiluminescenza che permetterà di visualizzare βcatenina in corrispondenza del peso molecolare di 88 kDa.

- Anti-phospho p44/42 (p-ERK1/2)

Il filtro di nitrocellulosa viene sottoposto ad una incubazione in Blocking Buffer costituito da Washing Buffer (Tris HCl pH 7.5 20mM, NaCl 150mM, Tween 20 0,10%) e latte magro 5%, per un periodo di 1 ora a temperatura ambiente. Successivamente viene effettuata un'incubazione overnight a 4°C in presenza dell'anticorpo primario anti P-ERK diluito 1:1000 in Blocking Buffer. Il giorno successivo vengono effettuati tre lavaggi da cinque minuti l'uno con Washing Buffer. L'anticorpo policlonale utilizzato riconosce in maniera specifica la forma fosforilata sui residui Treonina 202 e Tirosina 204 delle due isoforme di ERK. Terminati i lavaggi si procede ad un'incubazione con anticorpo secondario anti-rabbit coniugato con HRP diluito 1:1000 (Tab.4) in Blocking Buffer per un tempo di novanta minuti, e poi a tre lavaggi da cinque minuti l'uno con Washing Buffer privo di Tween 20. Terminata la procedura viene effettuata la reazione di chemiluminescenza che permetterà di visualizzare p-ERK1/2 in corrispondenza del peso molecolare di 42 kDa e 44 kDa.

- Anti-Actina

L'actina viene utilizzata come controllo di caricamento, poichè costitutivamente espressa. Il filtro di nitrocellulosa viene sottoposto ad una incubazione in Blocking Buffer (Tris HCl pH 8.0 10mM, NaCl 150mM, Tween 20 0,05% e latte magro al 5%) per un periodo di un'ora. Successivamente viene effettuata un'incubazione in presenza dell'anticorpo policlonale anti-Actina diluito 1:1000 in Blocking Buffer (Tab.4) per un tempo di un'ora, trascorsa la quale vengono effettuati tre lavaggi da cinque minuti l'uno con Washing Buffer, costituito dagli stessi componenti del Blocking Buffer ma privo di latte. Terminati i lavaggi si procede ad un'incubazione con anticorpo secondario anti-goat coniugato con HRP diluito 1:1000 in Blocking Buffer (Tab.4) per un tempo di un'ora, e poi a tre lavaggi da cinque minuti l'uno seguiti da un lavaggio da cinque minuti con Washing Buffer privo di Tween 20. Terminata la procedura viene effettuata la reazione di chemiluminescenza che permetterà di visualizzare l'actina in corrispondenza del peso molecolare di 43 kDa.

	Anticorpo primario	Anticorpo secondario
Anti GSK-3 $\beta$	1:1000	Anti-rabbit 1:1000
Anti- $\beta$ catenina	1:500	Anti-mouse 1:2000
Anti-phospho p44/42 (pERK)	1:1000	Anti-rabbit 1:1000
Anti-actina	1:1000	Anti-goat 1:1000

Tab.4: Anticorpi primari e secondari con le rispettive diluizioni.

### 5.4 Reazione di chemiluminescenza

Tutti gli anticorpi secondari utilizzati per gli immunoblotting sono coniugati con perossidasi di rafano (HRP). La presenza del complesso Ag-AbI-AbII coniugato con HRP viene rilevata mediante una reazione di chemiluminescenza. Eseguito l'immunoblotting il filtro viene dunque asciugato e poi incubato per 5 minuti in una soluzione che contiene perossido di idrogeno, luminolo ed intensificatori chimici di luminescenza. Il luminolo, substrato chemiluminescente, viene ossidato dagli anioni prodotti dalla perossidasi coniugata con l'anticorpo secondario ed emette luce in grado di impressionare una lastra autoradiografica. Il filtro viene asciugato e collocato in una cassetta che consente lo sviluppo fotografico. Il tempo di esposizione varia da pochi secondi a qualche minuto a seconda della combinazione anticorpo primario-anticorpo secondario utilizzata.

L'analisi densitometrica è stata effettuata con il software Kodak ID 3.6.

## **6. ANALISI DELL'ESPRESSIONE GENICA DI hMSCs**

### 6.1 Preparazione di estratti di RNA totale

Al fine di analizzare l'espressione genica delle hMSC, le cellule vengono coltivate alle concentrazioni prestabilite per il differenziamento adipogenico e osteogenico e trattate con i terreni di coltura (controlli) oppure indotte ai differenziamenti in presenza o assenza delle sostanze alle concentrazioni: AVP5mM, VPM1mM, BRB4 $\mu$ M, HIB5mg/ml, RESV10 $\mu$ M. Gli estratti vengono preparati a diversi tempi di induzione:

- differenziamento adipogenico: 12h, 1gg, 3gg.
- differenziamento osteogenico: 3gg, 7gg, 10gg, 14gg.

Per l'estrazione di RNA abbiamo utilizzato il TriPure Isolation Reagent (kit Roche) e abbiamo seguito il protocollo del kit. Si aspira il terreno e dopo un lavaggio veloce con PBS si aggiunge 1ml di tripure e si lisano le cellule utilizzando cell lifter. Raccolto il Tripure in eppendorf da 2ml, si incuba per 5minuti a temperatura ambiente. Dopo aver aggiunto 200 $\mu$ l di Cloroformio, le eppendorf vanno agitate e lasciate a 4°C per 15min. Successivamente si centrifugano a 12000g per 15min a

4°C e si recupera il surnatante che contiene RNA (la parte sottostante verrà utilizzata per recuperare proteine e DNA). Al surnatante si aggiungono 500µl di isopropanolo, si invertono le eppendorf e si lasciano a -20°C per 10 minuti. Si centrifugano le eppendorf a 12000g per 10min a 4°C, si elimina il surnatante, ed al pellet viene aggiunto 1ml di etanolo 75%. Dopo una centrifugata a 7500g per 5minuti a 4°C, si elimina il surnatante, si lascia asciugare il pellet che viene poi risospeso in 20µl di acqua depeccata e conservati a -20°C. La concentrazione del RNA estratto viene determinata mediante una misura spettrofotometrica di una piccola aliquota (2µl) del campione a 260nm. la formula utilizzata per calcolare la concentrazione in µg/µl è la seguente:

$$[\text{RNA}] = (\text{OD}_{260\text{nm}} * \text{fattore di diluizione} * 40) / 1000$$

Allo scopo di valutare la purezza del RNA estratto, si effettua inoltre una misurazione a 280nm e si calcola il rapporto tra le letture spettrofotometriche a 260 e 280nm. Tale rapporto dovrebbe essere maggiore di 1,8. Viene inoltre effettuata la lettura a 230nm per valutare la contaminazione da sostanze di natura organica.

## 6.2 Retrotrascrizione e real time PCR

L'analisi dell'espressione genica tramite real time PCR prevede un primo step di retrotrascrizione del RNA totale in cDNA. Tale conversione viene effettuata utilizzando il kit commerciale High-Capacity cDNA Reverse Trascrizione Kits composto da random primers, dNTPs e Multiscribe reverse transcriptase in un buffer di reazione adeguato. Partendo da 0,6ng di RNA, vengono sintetizzati 20µl di cDNA seguendo un ciclo di retrotrascrizione proposto dal kit composto da un primo step a 25°C per 10 minuti, seguito da un secondo step a 37°C per due ore ed ultimato con un terzo step a 85°C per 5 secondi. Il cDNA viene in seguito diluito fino ad un volume finale di 100µl e mantenuto a -20°C.

L'amplificazione, la rilevazione e la quantificazione del cDNA target mediante real time PCR viene effettuata con l'impiego di ABI prism 7500 sequence detection system (APPLERA International).

Ciascun campione viene analizzato in triplicato in una miscela di reazione avente volume finale di 25µl. L'analisi di PCR viene effettuata su piastre multi-wells da real time PCR con Optical Caps. In ciascun pozzetto vengono caricati 5µl di cDNA del campione da analizzare e 6,25µl di acqua depc. Ad esso viene aggiunto un volume pari a 13,75µl di una miscela di reazione così composta:

- 12,5µl di Master Mix 2x contenente enzima Taq Polimerasi, MgCl<sub>2</sub>, dNTPs, ROX e Syber Green;
- 1,25µl del Kit del gene da analizzare (GADPH, CEBPβ, PPARγ, RUNX2 e OSTERIX)

Le condizioni di reazione prevedono dei cicli di reazione suddivisi in tre fasi ed a diverse temperature:

Stage1: 1 step a 50°C per 2 minuti

Stage 2: 1 step a 95°C per 10minuti

Stage 3: 40 steps a 95°C per 15 secondi e a 60°C per 1 minuto.

Durante la reazione di amplificazione il sistema rileva l'emissione di fluorescenza relativa a ciascun campione. L'espressione genica viene valutata attraverso un processo di quantificazione relativa che prevede di quantificare il livello di espressione di un gene target rispetto ad un calibratore prestabilito necessario per avere un riferimento fisiologico. Nel nostro caso viene utilizzato, come calibratore del cDNA ottenuto dalla retrotrascrizione, un campione di RNA totale di cellule hMSCs in coltura non trattate (hMSC CRAV p7 e hMSC p7 #100613).

In aggiunta, i valori di quantificazione del gene target ottenuti in seguito all'amplificazione vengono normalizzati rispetto ad un controllo endogeno per limitare le differenze dovute ad una eventuale variabilità nella concentrazione iniziale di RNA totale convertito in cDNA. Il controllo endogeno scelto per le nostre indagini è il gene GAPDH.

L'analisi della quantificazione relativa per un determinato template target necessita dei seguenti parametri:

- $C_T$  (threshold cycle) dei template target e del controllo endogeno
- $\Delta C_T$ : la differenza tra il  $C_T$  del template target e quello del controllo endogeno
- $\Delta\Delta C_T$  la differenza tra il  $\Delta C_T$  del template in analisi e quello del calibratore.

Le analisi delle qPCR sono state eseguite tramite il software v2.0.6 dell'Applied Biosystems che calcola in base a questi parametri la quantità relativa RQ come  $2^{-\Delta\Delta C_T}$ .

I geni analizzati sono: GAPDH, CEBP $\beta$ , PPAR $\gamma$ , RUNX2 e OSTERIX.

## ***7. ANALISI DEL DIFFERENZIAMENTO ADIPOGENICO MEDIANTE CITOFUORIMETRIA***

È stato valutato l'effetto di Acido valproico, Valpromide, Berberina, Hibiscus sabdariffa e Resveratrolo sul differenziamento adipogenico di hMSC mediante citofluorimetria. Rispetto alla colorazione Oil Red O e al suo dosaggio spettrofotometrico, che ci fornisce un dato quantitativo in base al grado di differenziamento dell'intera coltura, l'analisi mediante citofluorimetria ci permette di andare a quantificare il numero di cellule differenziate e il loro contenuto lipidico.

A tal fine le hMSC sono state piastrate e trattate per tutto il tempo del differenziamento con terreno contenente i fattori adipogenici addizionato delle cinque sostanze alle concentrazioni scelte in base agli esperimenti di citotossicità:

- ACIDO VALPROICO (AVP): 5mM,
- VALPROMIDE (VPM): 1mM,

- BERBERINA (BRB): 4 $\mu$ M,
- HIBISCUS SABDARIFFA (HIB): 5mg/ml
- RESVERATROLO (RESV): 10 $\mu$ M.

I terreni sono stati cambiati due volte alla settimana e le sostanze sono state aggiunte al terreno tutte le volte. Dopo 28gg di induzione adipogenica con le sostanze, le cellule sono state marcate con Calceina (aggiunta al terreno alla concentrazione 4 $\mu$ M per 30min a 37°C), staccate con 0,2% di tripisna, 0,4% collagenasi e 0,25mM EDTA, fissate con PARA 0,5% per 15 min e successivamente marcate con Nile Red (1 $\mu$ g/ml). Dopo 20min di incubazione con Nile Red, le cellule sono state analizzate utilizzando il citofluorimetro (BD FACScanto<sup>TM</sup> FlowCytometer, BD Biosciences, San Jose, CA, USA) e il software FACS Diva.

La calceina (letta in green-FITC-A) è un fluoroforo in grado di penetrare la membrana cellulare. Viene utilizzata come indice della vitalità cellulare in quanto la calceina-AM è un composto idrofobico in grado di attraversare facilmente la membrana cellulare e portarsi nel citoplasma. L'idrolisi della calceina-AM ad opera di esterasi endogene produce calceina, un composto idrofilico fortemente fluorescente che viene trattenuto all'interno del citoplasma. Il segnale di fluorescenza ottenuto è proporzionale al numero di cellule vive presenti nella sospensione cellulare, infatti la calceina-AM viene trattenuta molto bene dalle cellule vive. Il Nile Red (letto in red-PE-A) è un colorante specifico per i lipidi e ci permette di discriminare le cellule differenziate, quindi positive al Nile Red dalle cellule indifferenziate, negative.

## ***8. ANALISI STATISTICA***

È stata effettuata l'analisi statistica dei risultati ottenuti per valutare se le differenze, osservate tra le cellule di controllo e le cellule trattate con AVP, VPM, BRB, HIB e RESV, sono statisticamente significative. A questo scopo è stato applicato il Dunnett's Multiple Comparison Test e il test t student. Questi programmi appartengono al pacchetto statistico GraphPad Prism.

## ***9. MATERIALI UTILIZZATI***

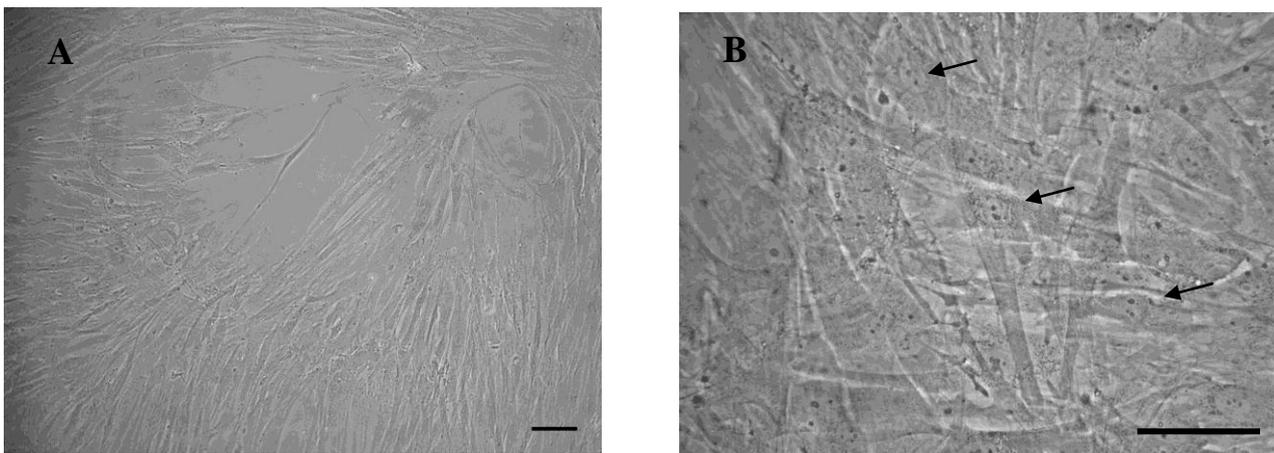
- Per le colture cellulari terreni (DMEM 1 g/L glucosio, DMEM 4.5 mg/L glucosio), glutammina, penicillina/streptomicina, fungizone e tripsina/EDTA sono stati forniti da Lonza (Belgio).
- Il siero fetale bovino (defined FBS) è stato acquistato da Hyclone (Logan, UT, USA).
- La plastica per colture cellulari (fiasche e petri) è stata acquistata da Falcon.
- Desametasone e  $\beta$ -glicerolfosfato sono stati acquistati da Applichem GmbH (Darmstadt, Germania).
- CD34, mouse IgG coniugato a PE, IQ products, Croningen, Netherlands. CD73, mouse Ig coniugato a PE, BD Pharmingen. CD 105, mouse IgG coniugato PE, eBioscience.
- AVP, VPM, BRB, RESV e Nile Red sono stati forniti da Sigma Aldrich.
- L'estratto di HIB è stato fornito dall'Istituto Sperimentale per la Floricoltura di Sanremo.
- L'anticorpo primario anti-actina è stato fornito da Santa Cruz Biotechnology.
- L'anticorpi che riconosce p-ERK1/2 e GSK3 $\beta$  sono forniti da Cell Signaling.
- L'anticorpo che riconosce  $\beta$ catenina è stato fornito dalla Dako.
- Gli anticorpi secondari sono forniti da Amersham, Santa Cruz Biotechnology e Chemicon.
- Il latte utilizzato per la saturazione dei siti aspecifici è prodotto dalla Regilait.
- Il kit Coomassie Blue® utilizzato per il dosaggio delle proteine è prodotto da Pierce.
- La preparazione dei gel d'acrilammide viene effettuata utilizzando acrilammide e bis acrilammide fornite entrambe da Sigma.
- Il marker di peso molecolare utilizzato per seguire la migrazione delle proteine nel gel di acrilammide viene fornito da Perkin Elmer.
- Il  $\beta$ -mercaptoetanolo è fornito da ICN Biochemicals.
- la calceina e il collagene è stato fornito da BD Biosciences.
- La nitrocellulosa sulla quale sono trasferite le proteine è prodotto da Schleicher & Schuell.
- Tutti gli altri materiali utilizzati sono stati acquistati da Sigma Chemicals Co (St. Louis, MO, USA).

# RISULTATI

## 1.1 ESTRAZIONE E COLTURA DI CELLULE STAMINALI MESENCHIMALI UMANE

Le cellule staminali mesenchimali umane (hMSC) sono state ottenute da sangue midollare o da aspirati midollari dall'ambulatorio centro trapianti dell'Azienda Ospedaliera San Gerardo di Monza, previa autorizzazione dei pazienti. Le hMSC sono state isolate e caratterizzate presso i laboratori della fondazione Tettamanti ed in seguito utilizzate nel nostro laboratorio (*Salvadè et al., 2007*).

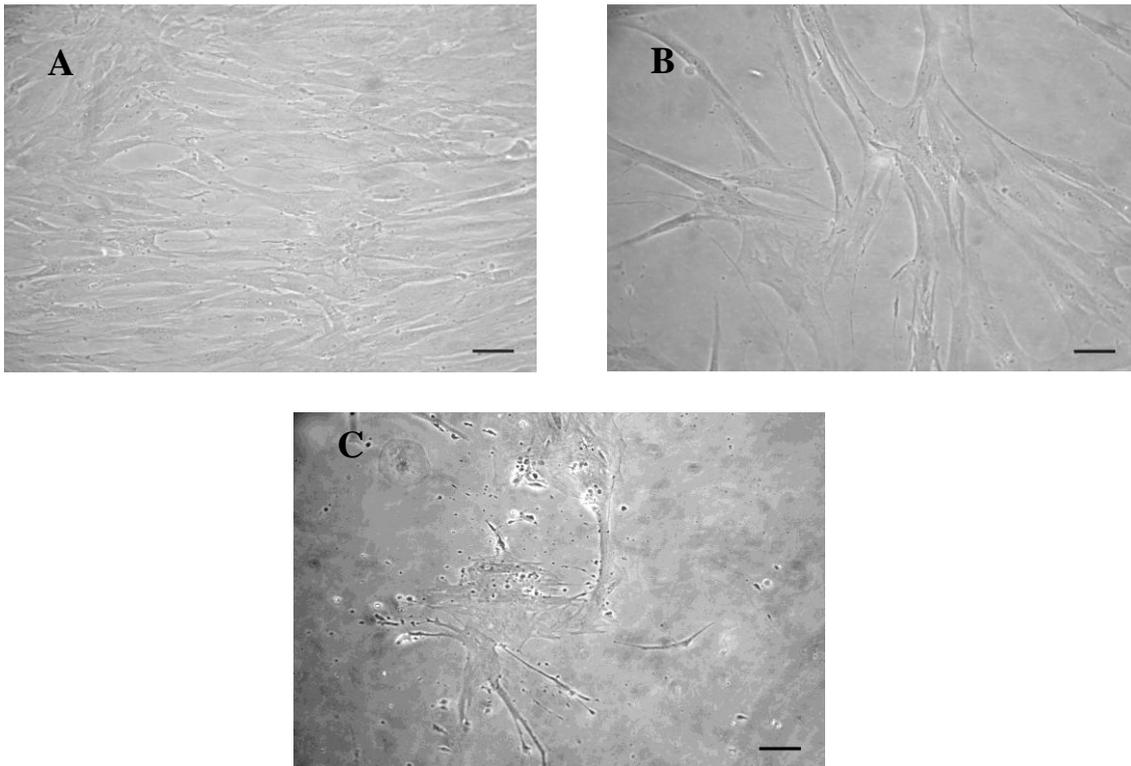
Il protocollo per l'isolamento di hMSC dal midollo osseo prevede la separazione delle componenti midollari su gradiente di densità e la coltivazione della frazione corrispondente alle cellule mononucleate. In seguito questa popolazione cellulare subisce un'ulteriore selezione sulla base della capacità di crescere e proliferare adesa alla piastra. Le cellule così ottenute presentano una morfologia simil-fibroblastica, con una forma allungata e con un nucleo ben evidente (Fig1).



**Fig1 Colture di hMSC (p3).** Colture di hMSC, al terzo passaggio, ad ingrandimento 10x (A) e 40x (B). Le cellule presentano una morfologia simil-fibroblastica, con una forma allungata ed un nucleo ben evidente (freccie, B). Barra 100 $\mu$ m.

Per la coltura ed espansione delle hMSC è stato utilizzato il terreno di coltura DMEM con il 10% di siero FBS defined in quanto le colture mantenute in queste condizioni hanno dimostrato di mantenere inalterato il loro profilo immunofenotipico e biochimico, valutato presso i nostri laboratori e quelli della fondazione Tettamanti. Nelle nostre colture, le hMSC proliferano mantenendo inalterata la loro morfologia per diversi passaggi (Fig2), nonostante si osservi un aumento delle dimensioni cellulari con l'aumentare dei passaggi.

Dal p14 in poi (Fig2C) si osserva una diminuzione della capacità proliferativa delle hMSC e aumentano i tempi necessari al raggiungimento della confluenza cellulare. Inoltre si osserva un aumento della granulosità intracellulare e di detriti cellulari. Questi fenomeni sono tipici della senescenza replicativa ed il raggiungimento di questo fenomeno varia da paziente a paziente. Per uno dei pazienti esaminati già al p14 le cellule presentavano un aspetto granuloso e un blocco della proliferazione, mentre per altri pazienti questi segni di sofferenza cellulare si sono evidenziati al p16 o al p18.



**Fig2 Colture di hMSC a diversi passaggi.** Colture di hMSC, al p4 (A), p8 (B), p14 (C). Le hMSC proliferano e si osserva un aumento delle dimensioni cellulari con l'aumentare dei passaggi (A-C). Barra: 50µm.

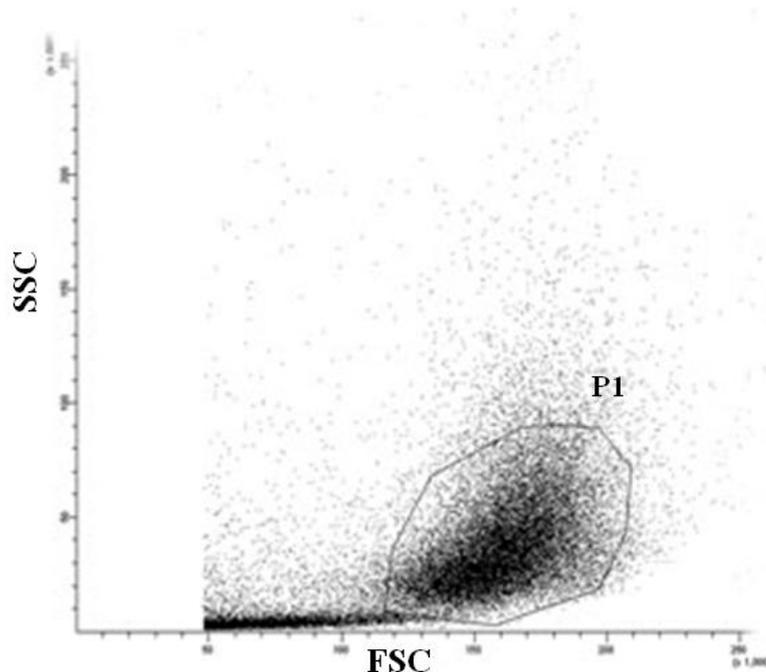
## ***1.2 CARATTERIZZAZIONE IMMUNOFENOTIPICA DELLE hMSC***

La caratterizzazione immunofenotipica delle hMSC, effettuata presso i laboratori della Fondazione Tettamanti, conferma che le cellule selezionate sono cellule staminali mesenchimali, in quanto si evidenzia un'elevata espressione degli antigeni di membrana CD105 ( $\geq 95\%$ ) e HLA-ABC ( $\geq 70\%$ ) ed una bassa espressione degli antigeni CD33, CD34 e HLA-DR ( $\leq 5\%$ ) (Salvadè *et al.*, 2007). Questo profilo corrisponde a quello descritto in letteratura per le MSC umane (Pitteringer *et al.*, 1999; Dominici *et al.*, 2006).

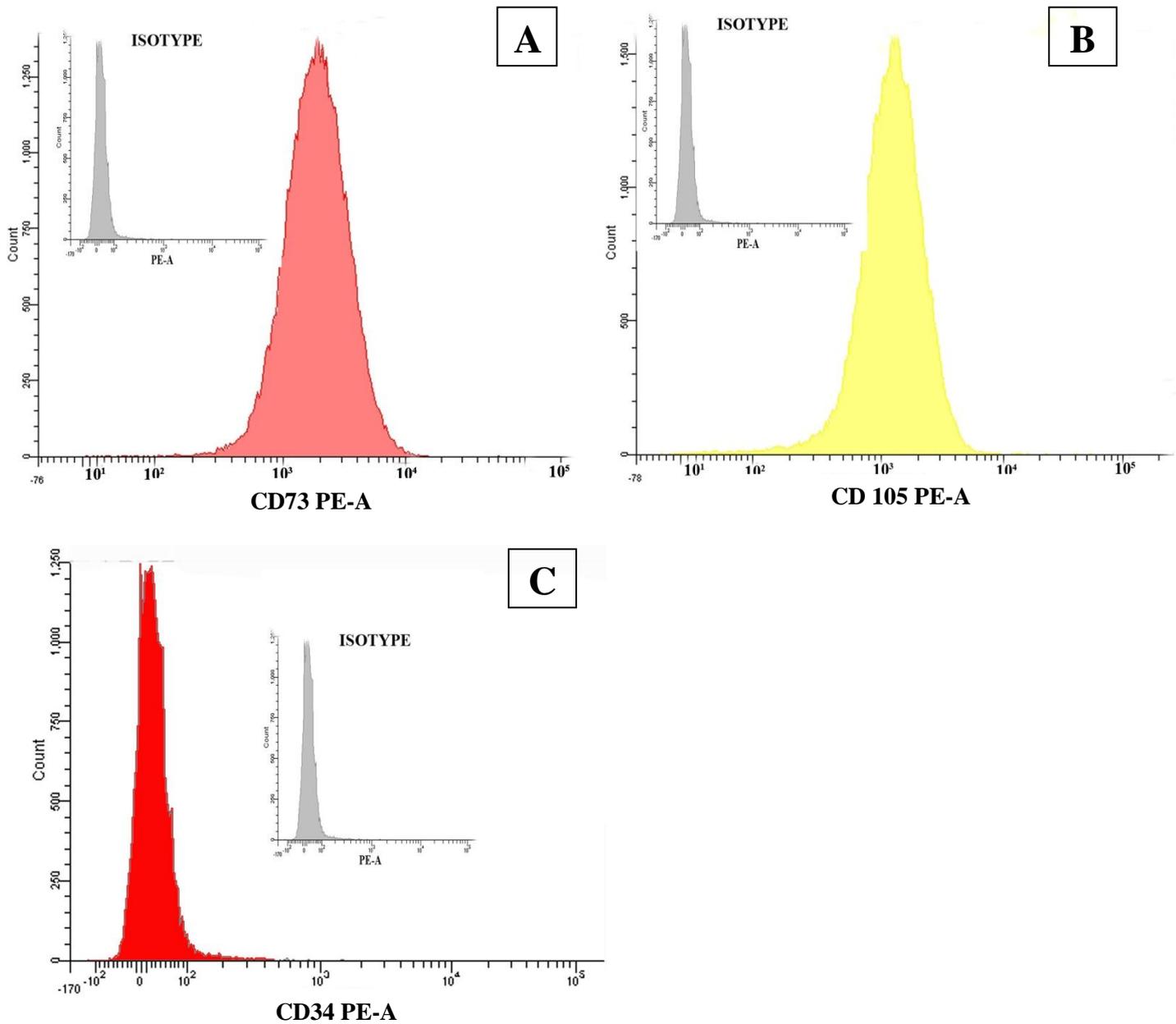
Inoltre nei nostri laboratori abbiamo valutato anche l'espressione dei marker CD73, CD105 e CD34 al p4 e p17.

HLA-ABC antigeni di istocompatibilità MHC di classe I.	≥70% (dati non mostrati)
CD33 è una glicoproteina di superficie cellulare espressa da cellule progenitrici mieloidi e monociti, ma non su normali linfociti, piastrine o eritrociti.	≤5% (dati non mostrati)
HLA-DR antigeni di isocompatibilità MHC di classe II.	≤5% (dati non mostrati)
CD73 è una molecola espressa da linfociti T e B, cellule dendritiche, cellule epiteliali, cellule endoteliali oltre che dalle MSC e catalizza la defosforilazione dell'adenosina monofosfato (AMP) convertendolo in adenosina. Inoltre CD73 media l'attivazione dei linfociti T e l'adesione dei linfociti all'endotelio.	≥95%
CD105 è un omodimero espresso da cellule endoteliali, macrofagi attivati e MSC ed è coinvolto nell'adesione e nell'angiogenesi embrionale.	≥95%
CD34 glicoproteina di transmembrana, espressa da cellule progenitrici ematopoietiche, che interviene in meccanismi di trasduzione del segnale e nell'adesione di certi antigeni all'endotelio.	≤5%

I risultati indicano che, dal punto di vista dei parametri fisici, al p4 (Fig3) è stata selezionata un'unica popolazione P1 ed oltre il 95% delle cellule risulta positiva per CD73 e CD105 e meno del 5% positiva per CD34 (Fig4). Al p17 i risultati, ottenuti esaminando i parametri fisici e l'espressione degli antigeni selezionati, sono sovrapponibili a quelli osservati al p4.



**Fig3 Parametri fisici delle hMSC.** In ascissa sono riportati i valori di FSC (indice della dimensione cellulare), in ordinata i valori di SSC (indice della complessità cellulare interna) di hMSC al p4. A tale passaggio è distinguibile un'unica popolazione (P1).



**Fig4 Caratterizzazione immunofenotipica delle hMSC.** Le hMSC (p4) sono state caratterizzate mediante analisi citofluorimetrica per valutare l'espressione degli antigeni di superficie CD73 (A), CD105 (B) e CD34 (C). Per valutare l'entità del legame aspecifico degli anticorpi utilizzati, sono stati considerati opportuni controlli isotipici IgG<sub>1</sub>-PE (istogrammi grigi nei riquadri in alto). Al p4, la popolazione che si è selezionata risulta oltre il 95% positiva per CD73 (A) e CD105 (B) e meno del 5% positiva per CD34 (C).

## ***1.3 DIFFERENZIAMENTO DELLE MSC NEI LINEAGE MESENGENICI***

Per una completa caratterizzazione delle hMSC isolate è stata valutata la loro capacità di differenziare nei lineage mesengenic. A tale scopo sono stati utilizzati specifici protocolli di differenziamento in uso nei nostri laboratori (*Foudah et al., 2013*).

### ***1.3.1 Differenziamento adipogenico***

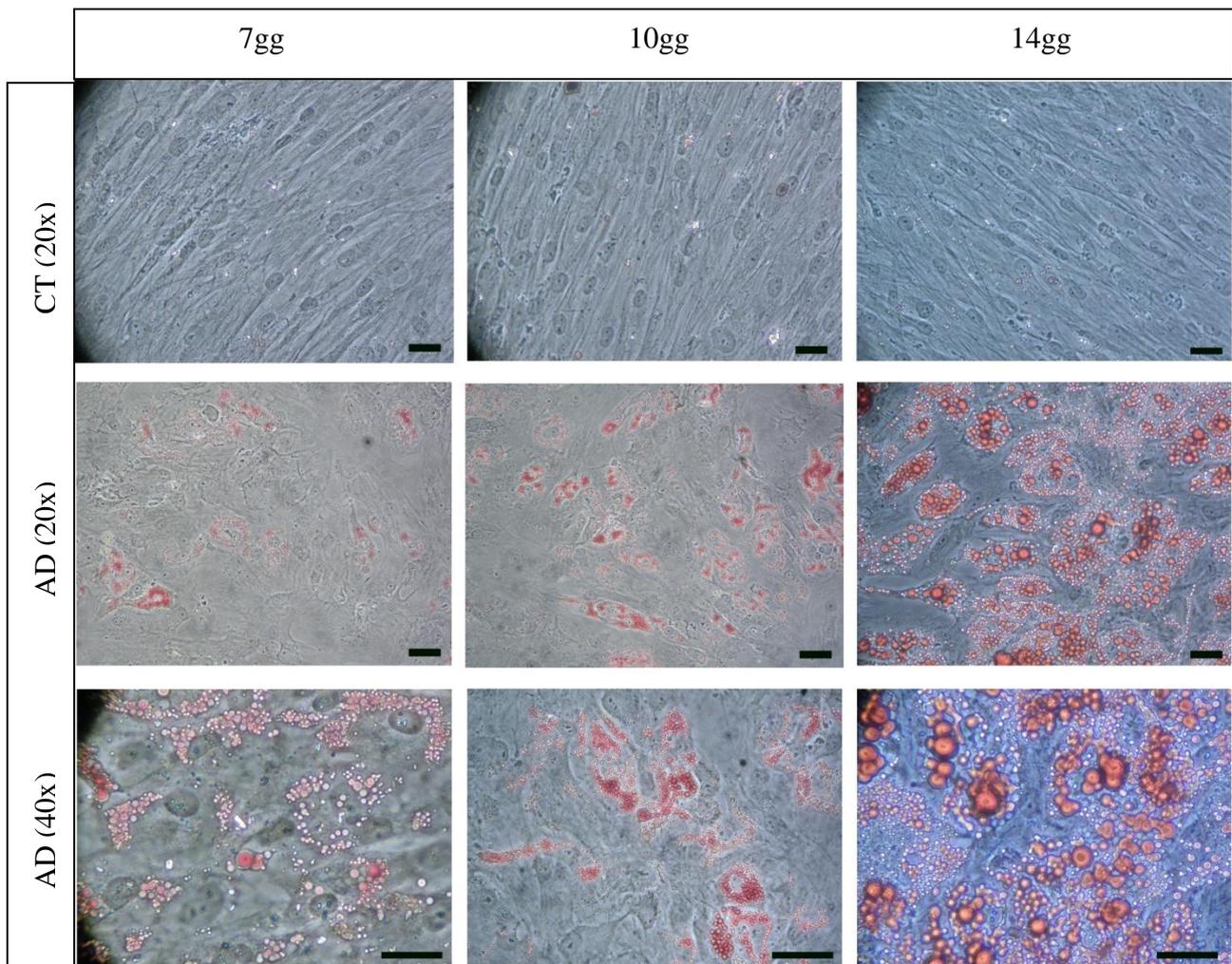
Presso il nostro laboratorio è stato precedentemente valutato se il grado di confluenza cellulare influenzi il differenziamento adipogenico delle hMSC. Sono state condotte varie prove in cui le cellule sono state piastrate a diversa densità e trattate secondo i protocolli di differenziamento adipogenico. Sulla base dei risultati ottenuti da queste prove, è stato stabilito che la densità iniziale di 20.000 cellule/cm<sup>2</sup> è quella che meglio supporta il differenziamento adipogenico delle hMSC.

Le hMSC sono state piastrate e trattate per il differenziamento adipogenico per 14 giorni. Durante questo periodo le cellule sono state osservate e, a tempi prestabiliti, colorate con Oil Red O e fotografate al microscopio ottico.

Il controllo (CT) è rappresentato da cellule mantenute in DMEM-HG completo senza fattori adipogenici. Nelle colture di hMSC indotte al differenziamento adipogenico (AD) è possibile osservare che, dopo 7 giorni di trattamento con il terreno adipogenico, le cellule cominciano a perdere la tipica conformazione fibroblastica che caratterizza le colture di controllo e si verifica la comparsa di piccole gocce intracellulari, positive alla colorazione con Oil Red O, che si collocano per lo più in posizione periferica lungo la membrana citoplasmatica (Fig5).

Al 10° giorno con terreno di induzione adipogenico le cellule continuano ad accumulare lipidi sotto forma di gocce intracellulari, positive alla colorazione istologica. Dal 10° giorno il terreno di induzione adipogenico viene sostituito con il terreno di mantenimento che consente di mantenere e completare il differenziamento adipogenico. Dopo 14 giorni di trattamento la maggior parte delle cellule risulta positiva alla colorazione Oil Red O, il citoplasma delle hMSC risulta interamente occupato da grandi depositi intracellulari positivi alla colorazione ed il nucleo subisce uno spostamento in posizione periferica. L'aumento nel numero delle gocce intracellulari fa sì che la maggior parte delle cellule mostrino un citoplasma ricco di depositi lipidici.

Le colture cellulari di hMSCs utilizzate come controllo non mostrano a nessuno dei tempi esaminati la comparsa delle gocce e infatti sono negative alla colorazione; mantengono la forma simil-fibroblastica ed il nucleo risulta ben evidente al centro delle cellule (Fig5).

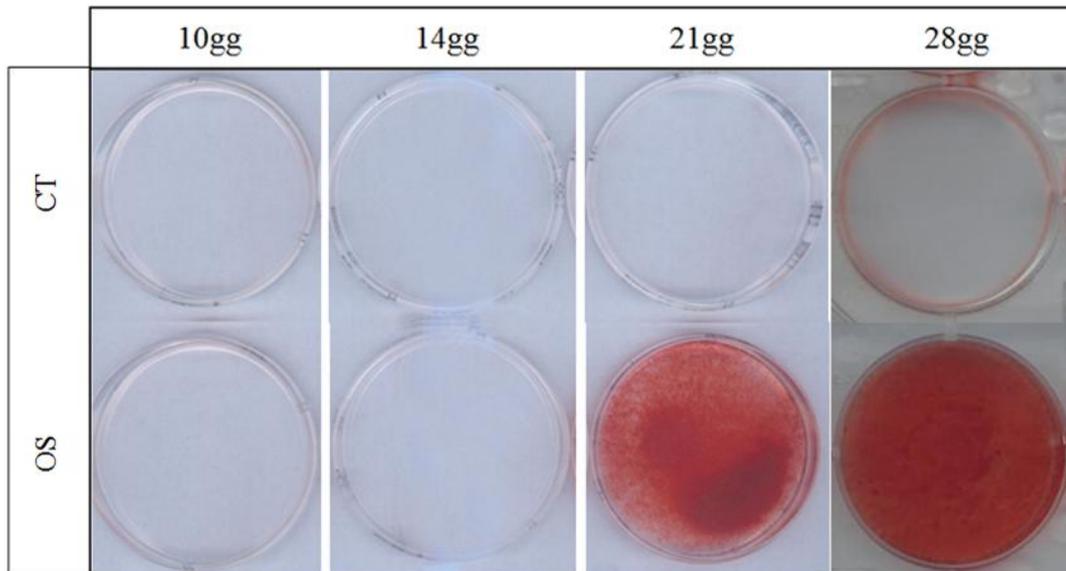


**Fig5** Colorazione con Oil Red O di cellule hMSC di controllo (CT) o indotte al differenziamento adipogenico (AD) a 7, 10, 14 giorni dal trattamento. Barra 30 $\mu$ M.

### ***1.3.2 Differenziamento osteogenico***

Precedentemente presso il nostro laboratorio è stato valutato se il grado di confluenza cellulare influenzi il differenziamento osteogenico delle hMSC. Sono state condotte varie prove in cui le cellule sono state piastrate a diversa densità e trattate secondo il protocollo di differenziamento osteogenico. Sulla base dei risultati ottenuti, è stato stabilito che la densità iniziale di 4000 cellule/cm<sup>2</sup> è quella che meglio supportano il differenziamento osteogenico.

Per indurre il differenziamento in senso osteogenico, le hMSC sono state trattate con terreno contenente fattori osteogenici (OS). Cellule trattate solo con terreno di coltura, senza l'aggiunta di supplementi osteogenici, rappresentano il controllo (CT). La colorazione con Alizarin red S evidenzia la presenza di calcio mineralizzato nelle colture di hMSC trattate con terreno osteogenico a partire dai 21 giorni dal trattamento ed in maniera più evidente ai 28 giorni (Fig6). Le cellule di controllo non mostrano positività al colorante in tutti i tempi analizzati.

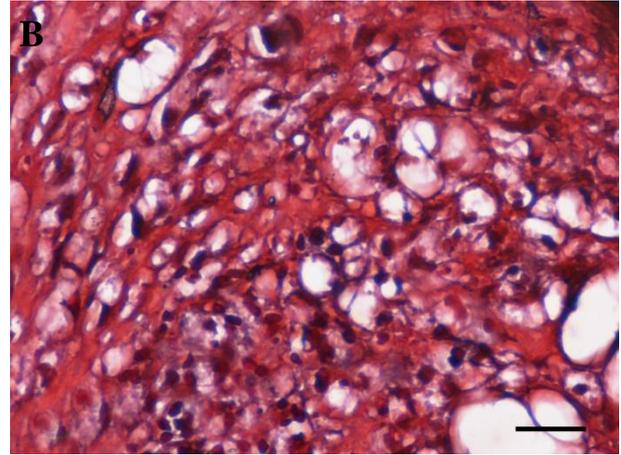
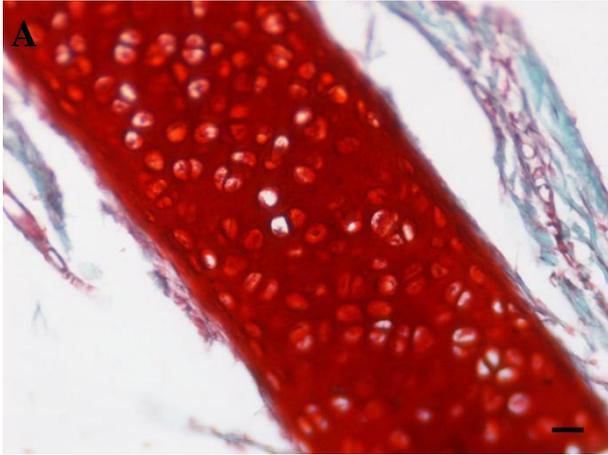


**Fig6 Differenziamento osteogenico.** Colture di hMSC (p4) trattate con terreno completo senza fattori osteogenici (CT) o con terreno osteogenico (OS) per 10, 14, 21 e 28 giorni.

### ***1.3.3 Differenziamento condrogenico***

Il differenziamento condrogenico delle hMSC richiede la coltura in pellet ad alta densità. In una fase preliminare è stata valutata la densità cellulare che meglio supporta il differenziamento condrogenico coltivando le cellule in tubi a diversa densità e trattandole successivamente secondo i protocolli di differenziamento condrogenico. Sulla base dei risultati ottenuti da queste prove, è stato stabilito che la densità iniziale di 250.000 cellule/tubo è quella che meglio supporta il differenziamento condrogenico delle hMSC.

Cellule coltivate in DMEM-HG senza siero con l'aggiunta di ITS+premix e senza ulteriori supplementi rappresentano il controllo. Dopo circa 6 settimane dal trattamento, i pellet sono stati inclusi in paraffina e sono state preparate delle sezioni istologiche colorate con safranin O. I pellet coltivati in terreno di coltura senza supplementi condrogenici si presentano poco compatti e al momento dell'inclusione la loro disgregazione non ha consentito di ottenere successivamente delle sezioni istologiche da colorare. Pertanto abbiamo considerato un controllo positivo rappresentato da una sezione di tessuto cartilagineo di orecchio colorato con safranin O (Fig7A). Le cellule coltivate in pellet con terreno condrogenico mantengono invece una maggiore compattezza rispetto alle cellule coltivate con terreno di coltura senza fattori condrogenici e dopo colorazione con safranin O (Fig7B) si nota la matrice in cui sono presenti proteoglicani, glucosaminoglicani e si può osservare anche la formazione di gruppi isogeni di cellule.



**Fig7 Differenziamento condrogenico.** Sezioni istologiche di tessuto cartilagineo di orecchio (A) e di hMSC coltivate in pellet con “chondrogenic medium” (B) per 6 settimane. Barra: 25 $\mu$ m.

## ***2. VALUTAZIONE DELLA TOSSICITA'***

La citotossicità delle sostanze oggetto del nostro studio è stata valutata mediante due differenti metodiche: MTT e SRB assay. La metodica dell'MTT assay è semplice e riproducibile e misura l'attività mitocondriale della coltura cellulare. La deidrogenasi mitocondriale delle cellule vitali taglia l'anello tetrazolico dell'MTT, portando alla formazione di cristalli di formazano. I cristalli vengono sciolti in etanolo e la soluzione viola risultante viene misurata spettrofotometricamente. Un aumento o diminuzione delle cellule vitali ha per risultato un cambiamento concomitante nella quantità di formazano che si forma e che può essere considerato come un indicatore del grado di citotossicità causato dall'esposizione alle sostanze in esame. L'SRB assay è un altro metodo per misurare la vitalità cellulare legata però alla massa proteica della coltura. L'SRB si lega agli aminoacidi delle proteine cellulari e la lettura con lo spettrofotometro del colorante legato alle proteine fornisce una stima della massa proteica totale che è a sua volta legata al numero di cellule vitali.

Sono stati condotti degli studi di citotossicità mediante MTT e SRB assay e sono state valutate le seguenti concentrazioni:

- Acido Valproico (AVP): 1mM, 5mM e 10mM
- Valpromide (VPM): 1mM, 2mM e 5mM
- Berberina (BRB): 4 $\mu$ M, 8 $\mu$ M e 12 $\mu$ M
- Hibiscus sabdariffa (HIB): 1mg/ml, 2mg/ml e 5mg/ml
- Resveratrolo (RESV): 10 $\mu$ M, 25 $\mu$ M e 35 $\mu$ M

Abbiamo testato tali sostanze sia sulle hMSC indifferenziate che sulle hMSC indotte al differenziamento adipogenico e osteogenico per poter identificare, per ogni sostanza, una concentrazione non tossica da poter utilizzare negli esperimenti successivi. Dal momento che VPM, BRB e RESV sono state sciolte in DMSO, abbiamo testato anche la concentrazione più alta di DMSO che non è risultata tossica sia sulle hMSC indifferenziate che sulle hMSC indotte al differenziamento adipogenico e osteogenico (dati non mostrati).

### ***2.1 Test di vitalità su hMSC indifferenziate***

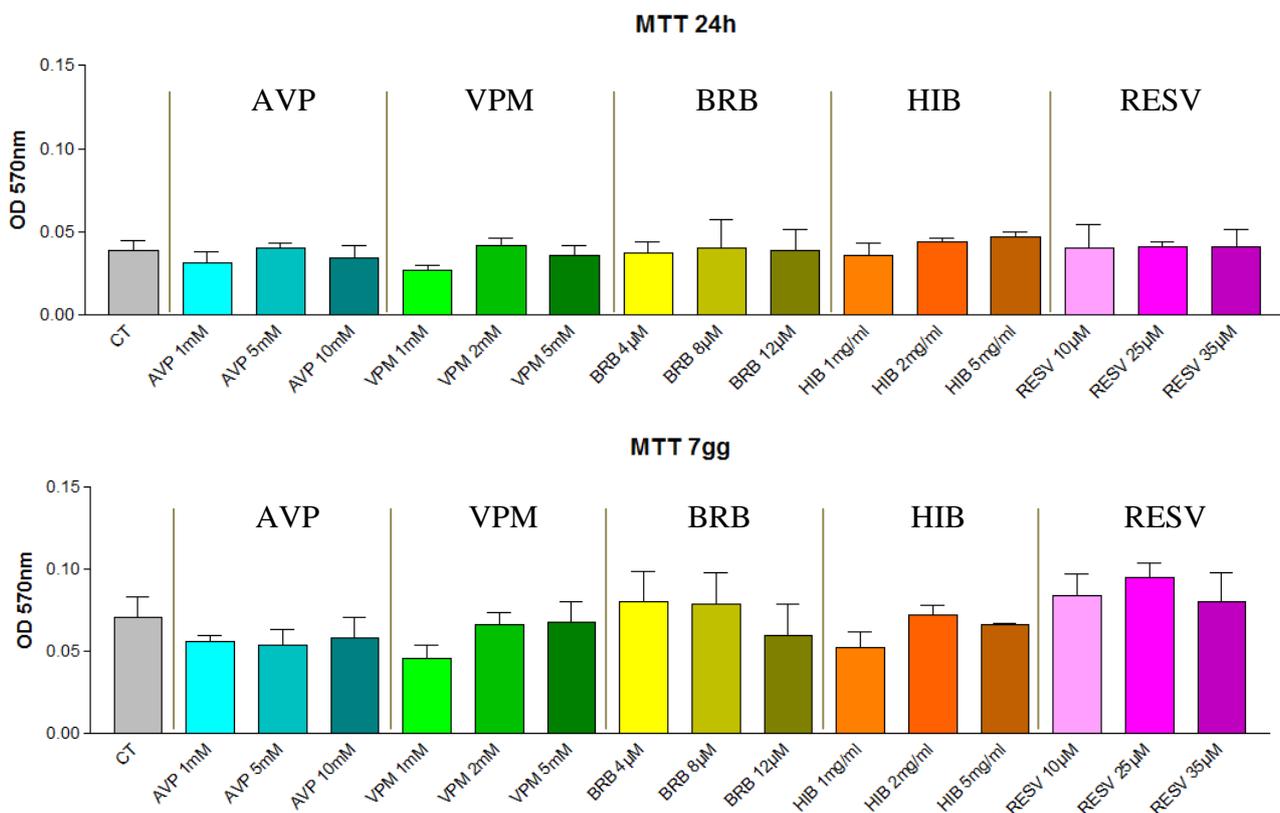
Abbiamo testato l'effetto delle sostanze sulle hMSC indifferenziate. Per questo motivo le hMSC sono state piastrate in terreno DMEM-LG completo ed il giorno successivo al piastramento le cellule sono state indotte con le sostanze a diverse concentrazioni. Il controllo è rappresentato da cellule trattate solo con terreno di coltura (CT).

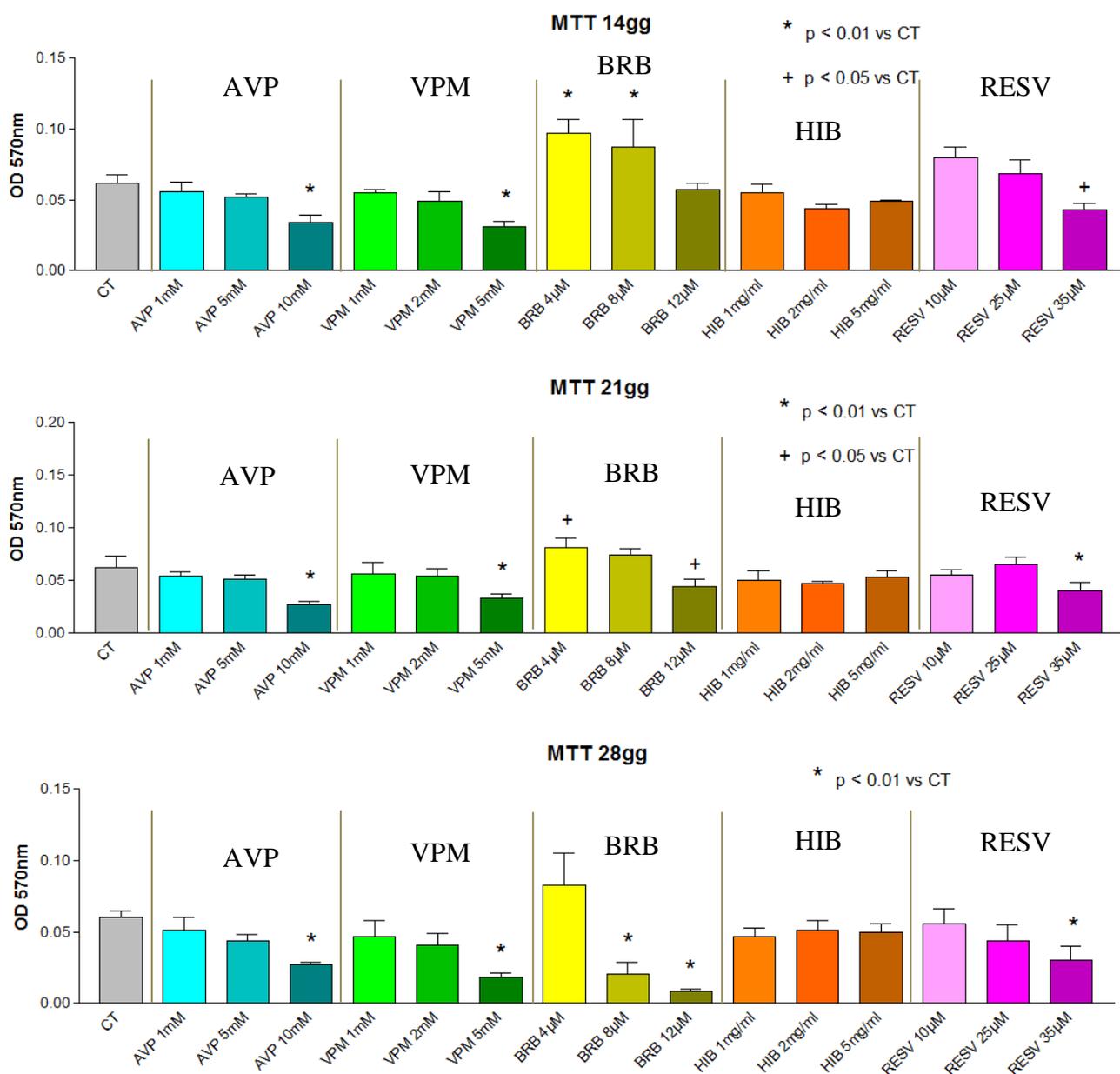
Dopo 24h, 7gg, 14gg, 21gg, 28gg dall'induzione è stato effettuato l'MTT (Fig8) e l'SRB (Fig9) assay per valutare la vitalità cellulare. I dati sono espressi sotto forma di media  $\pm$  deviazione standard, calcolati sui valori ottenuti in 3 esperimenti indipendenti. La statistica è stata effettuata applicando il Dunnett's Multiple Comparison Test, che permette il confronto tra il controllo (CT) e le diverse sostanze alle differenti concentrazioni.

### 2.1.1 MTT assay

Dai dati ottenuti con l'MTT assay possiamo dedurre che tutte le sostanze sembrano non avere effetti sulle hMSC fino a 7gg di trattamento. Dopo 14gg, le cellule trattate con le concentrazioni più alte, AVP 10mM, VPM 5mM e RESV 35 $\mu$ M hanno una riduzione significativa dell'assorbanza dell'MTT che indica una riduzione dell'attività mitocondriale. Al contrario le hMSC trattate con BRB 4 $\mu$ M e BRB 8 $\mu$ M hanno un aumento significativo dell'attività mitocondriale indice della vitalità cellulare.

Sia dopo 21 che dopo 28 giorni di trattamento si conferma il dato della tossicità di AVP 10mM, VPM 5mM e RESV 35 $\mu$ M. Per quanto riguarda BRB, a 21 giorni si osserva la tossicità della dose più alta (BRB 12 $\mu$ M) mentre a 28 giorni tale tossicità si estende anche alla dose intermedia (8 $\mu$ M). In conclusione possiamo affermare che le concentrazioni AVP 10mM, VPM 5mM, BRB 8 $\mu$ M, BRB 12 $\mu$ M e RESV 35 $\mu$ M risultano tossiche sulle hMSC indifferenziate. Inoltre HIB a tutte le dosi valutate non ha interferito con la vitalità cellulare fino alla fine del trattamento.



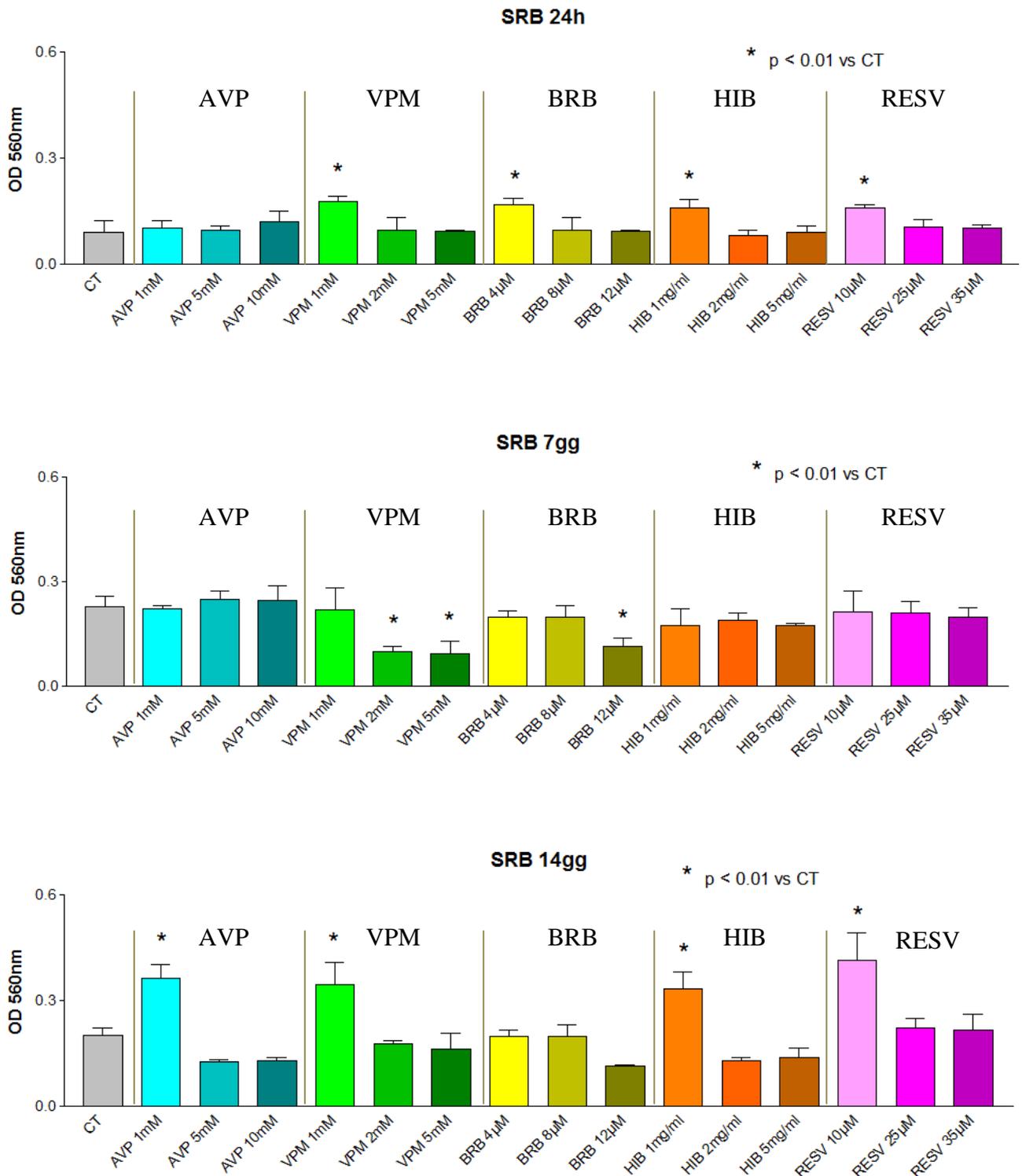


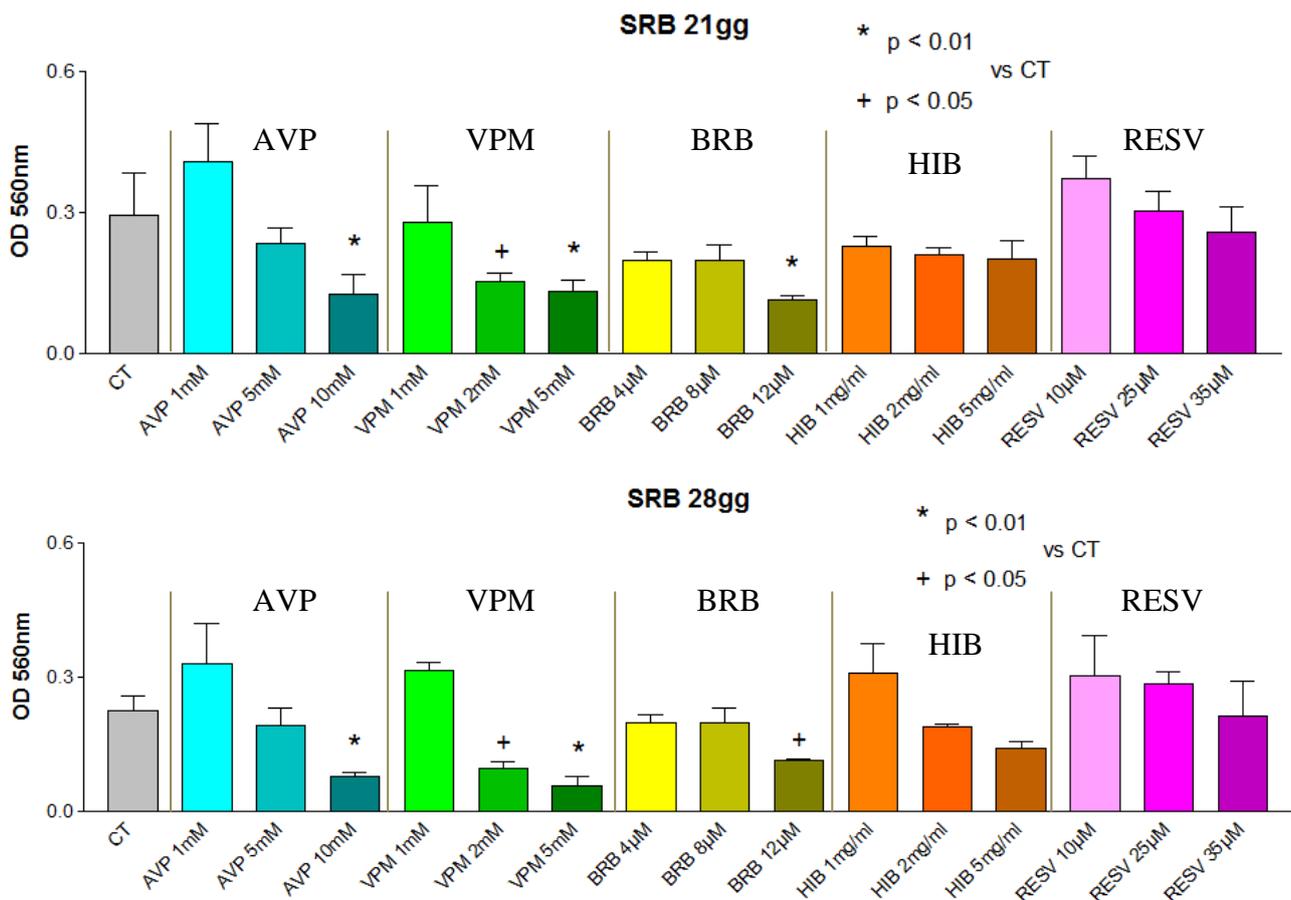
**Fig8** Valutazione mediante MTT assay test dell'effetto di AVP, VPM, BRB, HIB e RESV a diverse concentrazioni sulla vitalità delle hMSC indifferenziate. La significatività è stata valutata confrontando per ciascun tempo i valori ottenuti rispetto al controllo (CT) mediante il Dunnett's Multiple Comparison Test (\*  $p < 0.01$ ; +  $p < 0.05$  VS CT). I dati sono espressi sotto forma di media  $\pm$  deviazione standard, calcolati sui valori ottenuti in 3 esperimenti indipendenti.

### 2.1.2 SRB assay

Dopo 24h di trattamento si osserva che le hMSC trattate con la dose più bassa di VPM, BRB, HIB e RESV presentano, rispetto al controllo, un aumento significativo dell'assorbanza dell'SRB. Tale dato indica che dopo 24h le cellule trattate con queste sostanze hanno una vitalità cellulare maggiore rispetto al CT. Ad una settimana di trattamento invece si osserva una significativa riduzione della vitalità cellulare per le cellule trattate con VPM2mM, VPM5mM e BRB12µM e questa riduzione si osserva anche dalla terza settimana fino a fine trattamento. A 14gg si osserva un

significativo aumento della vitalità cellulare per le cellule trattate con AVP 1mM, VPM 1mM, HIB 1mg/ml e RESV 10µM. A 21gg la concentrazione AVP 10mM risulta tossica e questa tossicità permane fino al 28esimo giorno.





**Fig9** Valutazione mediante SRB assay test dell'effetto di AVP, VPM, BRB, HIB e RESV a diverse concentrazioni sulla vitalità delle hMSC indifferenziate. La significatività è stata valutata confrontando per ciascun tempo i valori ottenuti rispetto al controllo (CT) mediante il Dunnett's Multiple Comparison Test (\*  $p < 0.01$ ; +  $p < 0.05$  VS CT). I dati sono espressi sotto forma di media  $\pm$  deviazione standard, calcolati sui valori ottenuti in 3 esperimenti indipendenti.

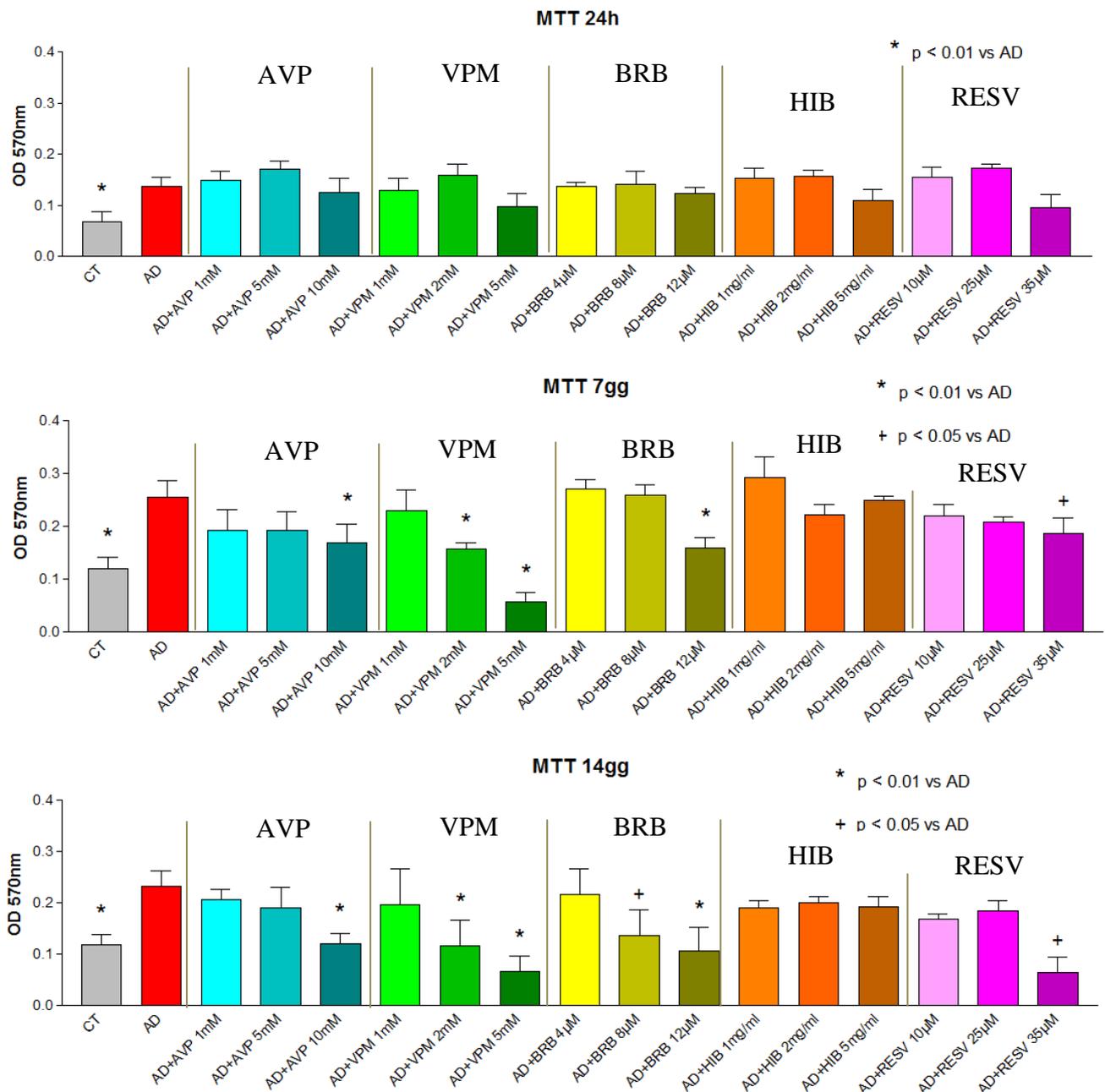
## 2.2 Test di vitalità su hMSC differenziate in senso adipogenico

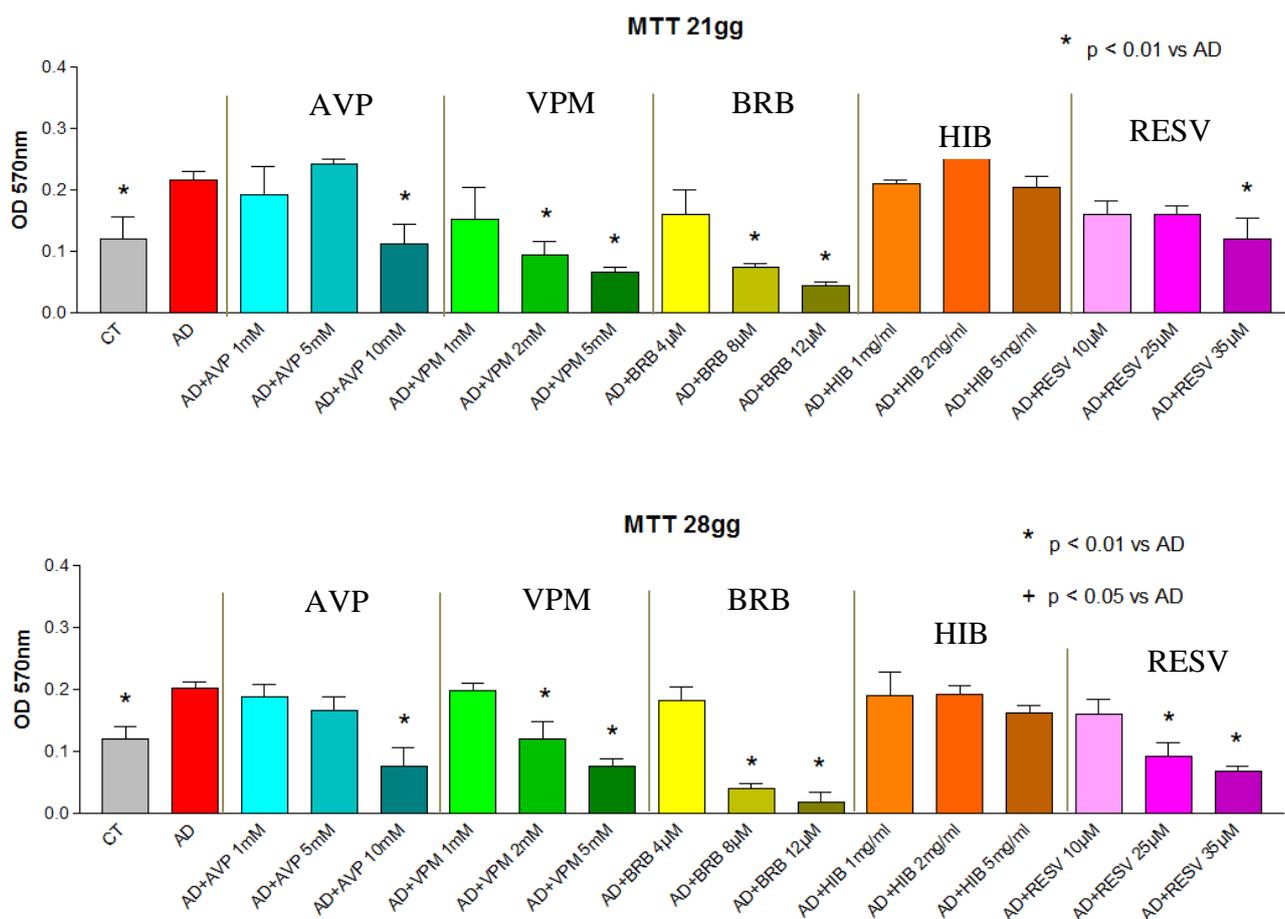
Abbiamo testato l'effetto delle sostanze sulle cellule differenziate in senso adipogenico. Per questo motivo le hMSC sono state piastrate ed il giorno successivo indotte al differenziamento con il terreno di induzione adipogenico e l'aggiunta delle sostanze a diverse concentrazioni. Il controllo (CT) è rappresentato da cellule trattate solo con terreno di coltura DMEM-HG mentre l'AD corrisponde alle hMSC indotte con solo il terreno di induzione. Al decimo giorno di trattamento il terreno di induzione è stato sostituito con il terreno di mantenimento.

Dopo 24h, 7, 14, 21 e 28 gg dall'induzione sono stati effettuati l'MTT (Fig10) e l'SRB (Fig11) assay per valutare la vitalità cellulare. I dati sono espressi sotto forma di media  $\pm$  deviazione standard, calcolati sui valori ottenuti in 3 esperimenti indipendenti. La statistica è stata effettuata applicando il Dunnett's Multiple Comparison Test, che permette il confronto tra le cellule indotte al differenziamento adipogenico (AD) con le hMSC indotte al differenziamento adipogenico in presenza delle diverse sostanze a differenti concentrazioni.

### 2.2.1 MTT assay

A 24h di trattamento le cellule di controllo presentano un'assorbanza dell'MTT minore rispetto all'AD in quanto il terreno adipogenico rende le cellule metabolicamente più attive. Tale differenza si osserva a tutti i tempi analizzati. La concentrazione AVP 10mM risulta tossica già dopo 7gg di trattamento e tale effetto si mantiene fino ai 28gg. Le concentrazioni VPM 1mM, BRB 4µM e RESV 10µM si dimostrano non tossiche sulle hMSC indotte al differenziamento adipogenico per tutti i tempi analizzati. La sostanza HIB non determina alterazioni sulla vitalità delle cellule differenziate.

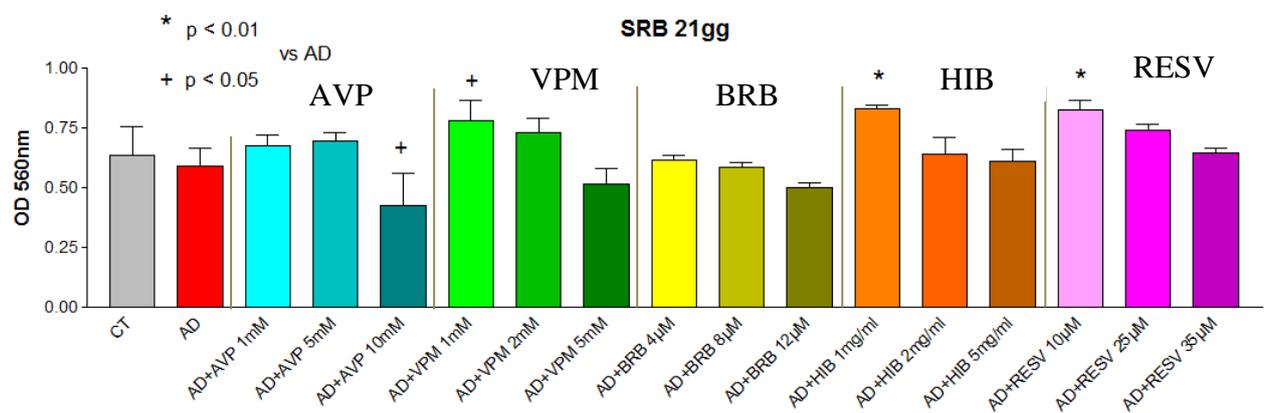
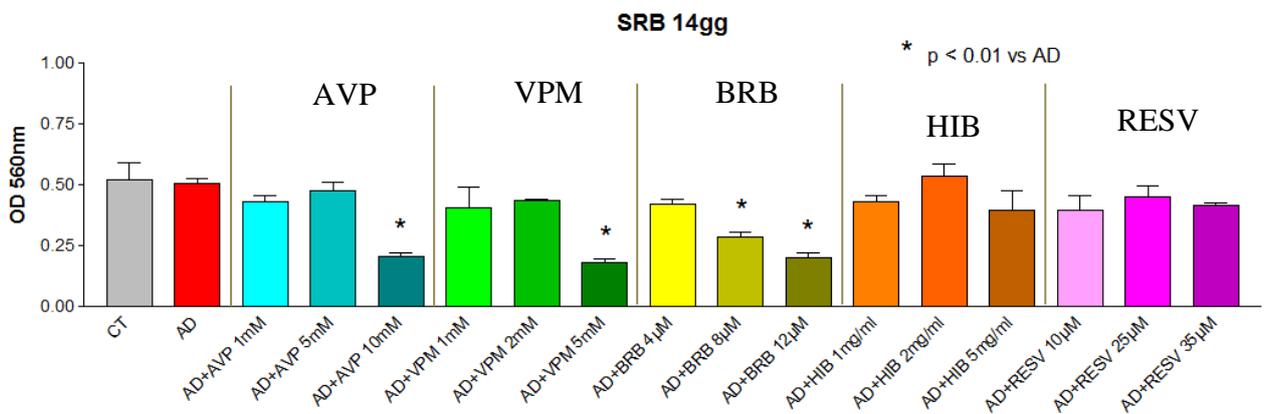
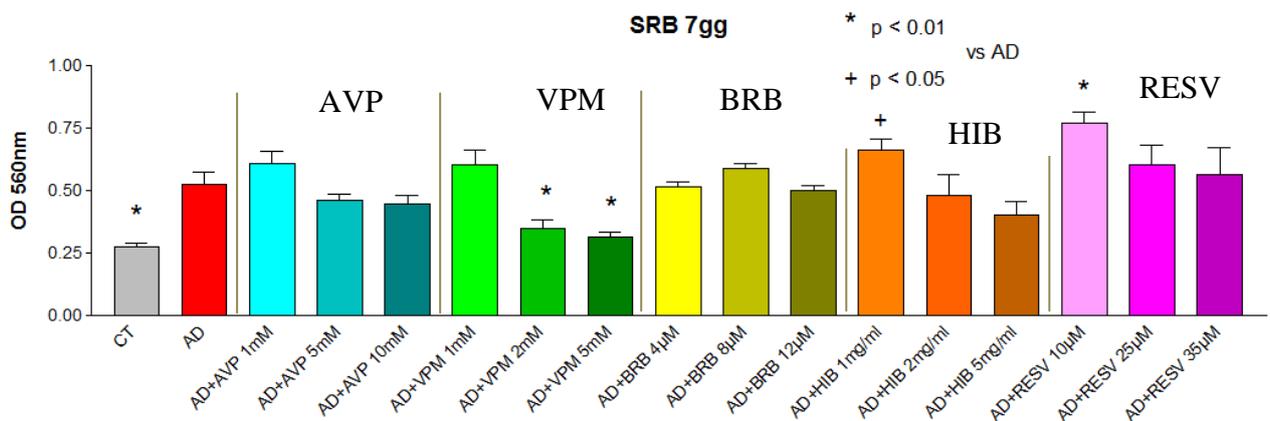
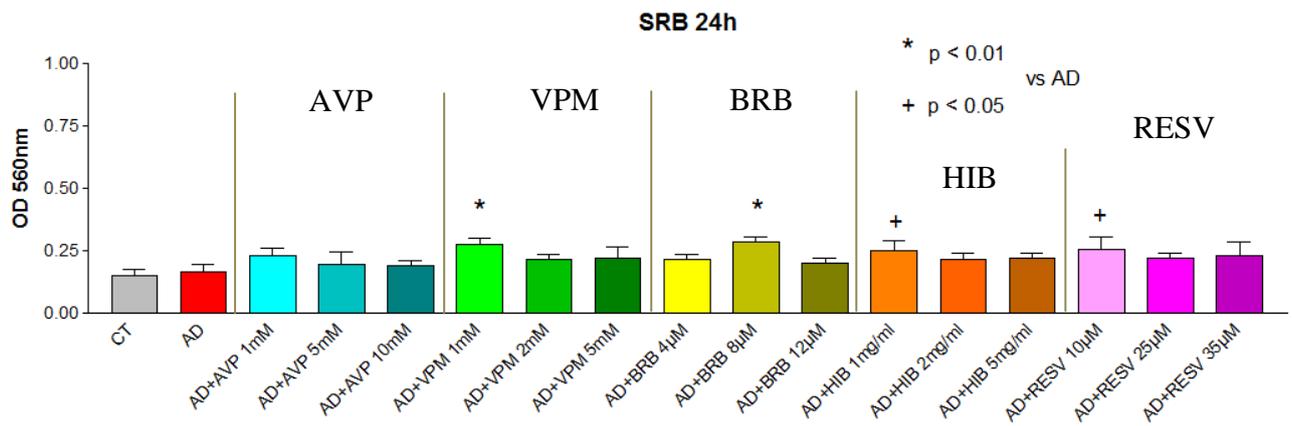


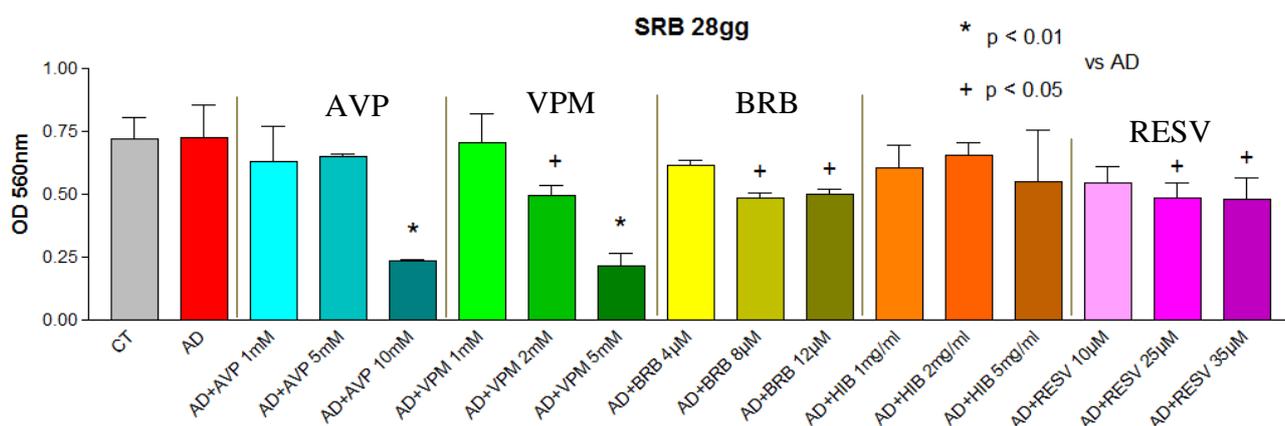


**Fig10** Valutazione mediante MTT assay test dell'effetto di AVP, VPM, BRB, HIB e RESV a diverse concentrazioni sulla vitalità delle hMSC indotte al differenziamento adipogenico (AD). La significatività è stata valutata confrontando per ciascun tempo i valori ottenuti rispetto all'AD mediante il Dunnett's Multiple Comparison Test (\*  $p < 0.01$ ; +  $p < 0.05$  VS AD). I dati sono espressi sotto forma di media  $\pm$  deviazione standard, calcolati sui valori ottenuti in 3 esperimenti indipendenti.

### 2.2.2 SRB assay

A 24h le cellule indotte al differenziamento adipogenico in presenza di VPM 1mM, BRB 8μM, HIB 1mg/ml e RESV 10μM presentano una vitalità cellulare significativamente maggiore rispetto alle cellule trattate con solo il terreno di induzione (AD). Dopo una settimana tale vitalità resta significativamente più elevata, sempre rispetto ad AD, per le cellule trattate con HIB 1mg/ml e RESV 10μM mentre si riduce per le cellule trattate con VPM 2mM e 5mM. Tra la seconda e la terza settimana di trattamento si verificano delle variazioni nella vitalità delle cellule trattate con le diverse sostanze fino ad arrivare a 28gg dove si conferma il dato ottenuto con l'MTT assay. Infatti la vitalità cellulare per le cellule trattate con AVP 10mM, VPM2mM, VPM5mM, BRB8μM, BRB12μM, RESV25μM e RESV35μM risulta inferiore rispetto all'AD.





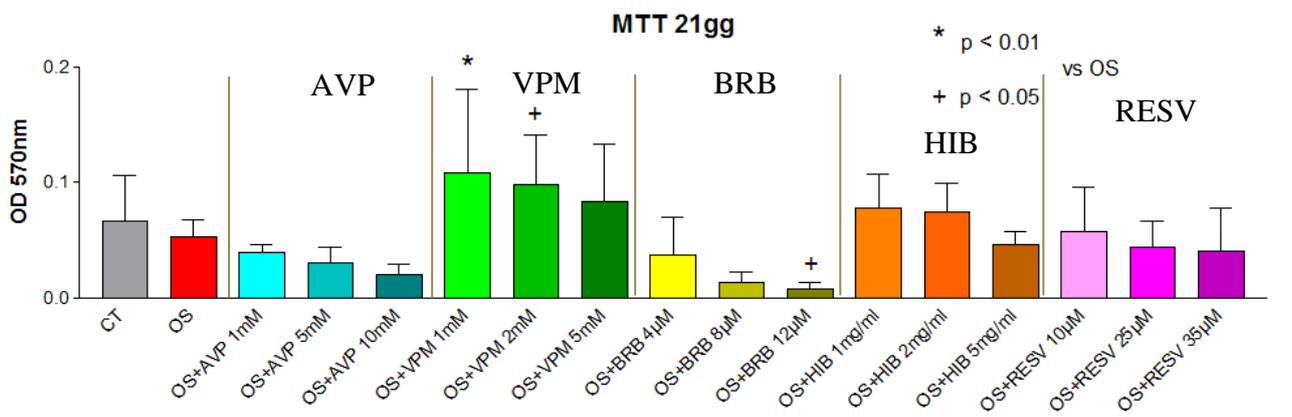
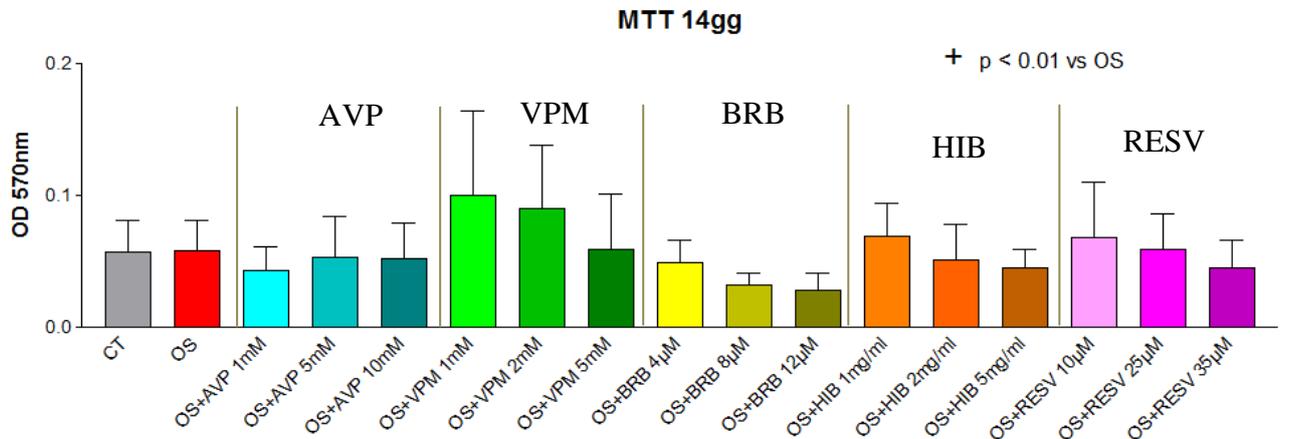
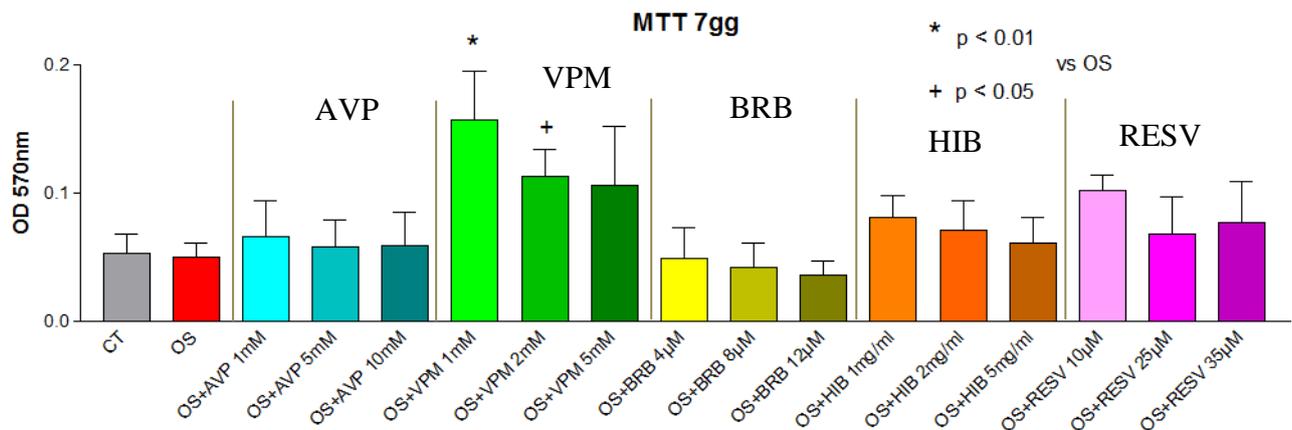
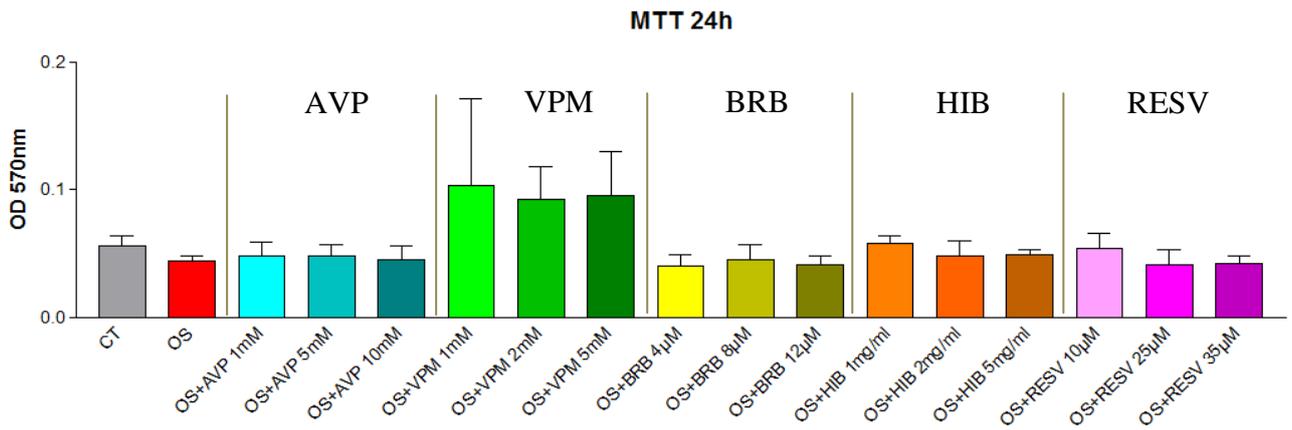
**Fig11 Valutazione mediante SRB assay test dell'effetto di AVP, VPM, BRB, HIB e RESV a diverse concentrazioni sulla vitalità delle hMSC indotte al differenziamento adipogenico (AD).** La significatività è stata valutata confrontando per ciascun tempo i valori ottenuti rispetto all'AD mediante il Dunnett's Multiple Comparison Test (\*  $p < 0.01$ ; +  $p < 0.05$  VS AD). I dati sono espressi sotto forma di media  $\pm$  deviazione standard, calcolati sui valori ottenuti in 3 esperimenti indipendenti.

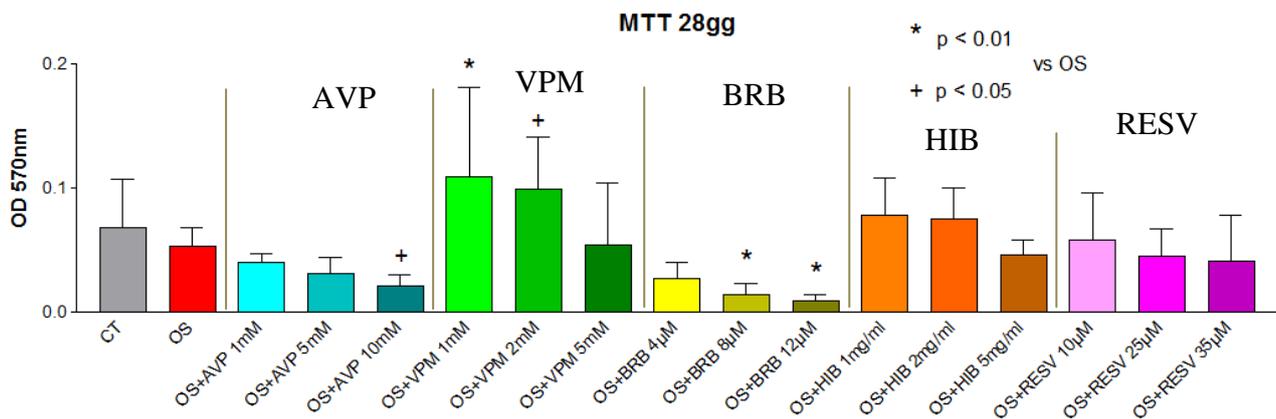
### 2.3 Test di vitalità su hMSC differenziate in senso osteogenico

Abbiamo testato l'effetto delle sostanze sulle cellule differenziate in senso osteogenico. Per questo motivo le hMSC sono state piastrate e dopo tre giorni indotte al differenziamento osteogenico con l'aggiunta delle sostanze a diverse concentrazioni. Il controllo (CT) è rappresentato da cellule trattate solo con terreno di coltura mentre l'OS corrisponde alle hMSC indotte con solo il terreno OS medium. Dopo 24h, 7gg, 14gg, 21gg, 28gg dall'induzione sono stati effettuati l'MTT (Fig12) e l'SRB (Fig13) assay per valutare la vitalità cellulare. I dati sono espressi sotto forma di media  $\pm$  deviazione standard, calcolati sui valori ottenuti in 3 esperimenti indipendenti. La statistica è stata effettuata applicando il Dunnett's Multiple Comparison Test, che permette il confronto tra le cellule indotte al differenziamento osteogenico (OS) con le hMSC indotte con OS e le diverse sostanze alle differenti concentrazioni.

#### 2.3.1 MTT assay

Dopo 24h di induzione non si osservano differenze significative tra OS e le hMSC indotte al differenziamento osteogenico e l'aggiunta delle sostanze. Dopo una settimana di induzione le cellule trattate con le sostanze VPM 1mM e VPM 2mM hanno una vitalità significativamente maggiore rispetto all'OS e tale differenza si osserva anche a 21 e 28gg. Dopo 4 settimane abbiamo notato una riduzione della vitalità nelle cellule indotte al differenziamento osteogenico. Questo valore è stato confermato anche dall'osservazione al microscopio ottico in quanto si è notato un distacco dalla plastica delle cellule differenziate. Le concentrazioni AVP 10mM, BRB 8µM e BRB 12µM risultano tossiche sulle hMSC indotte al differenziamento osteogenico. Per le sostanze HIB, RESV non si notano differenze con l'OS per tutti i tempi analizzati.

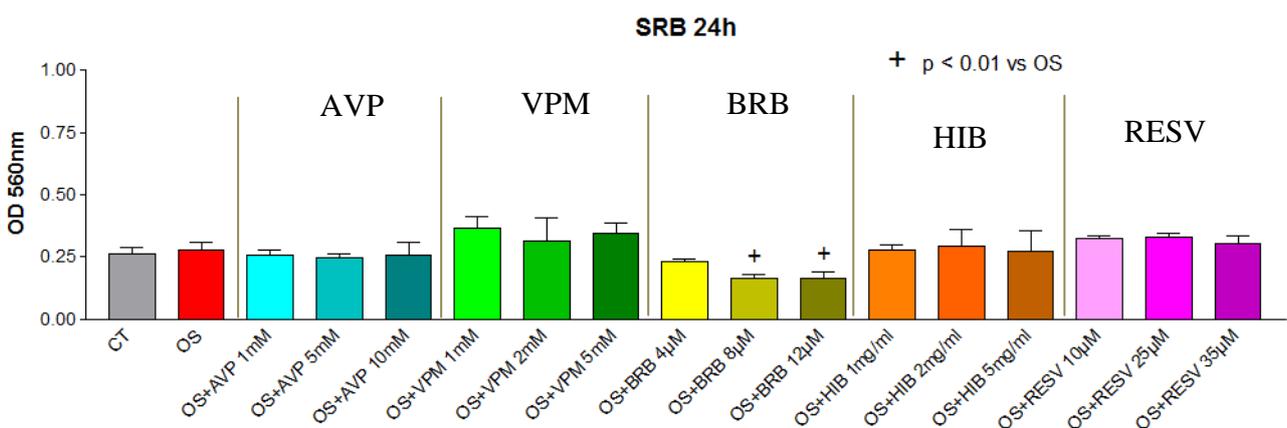


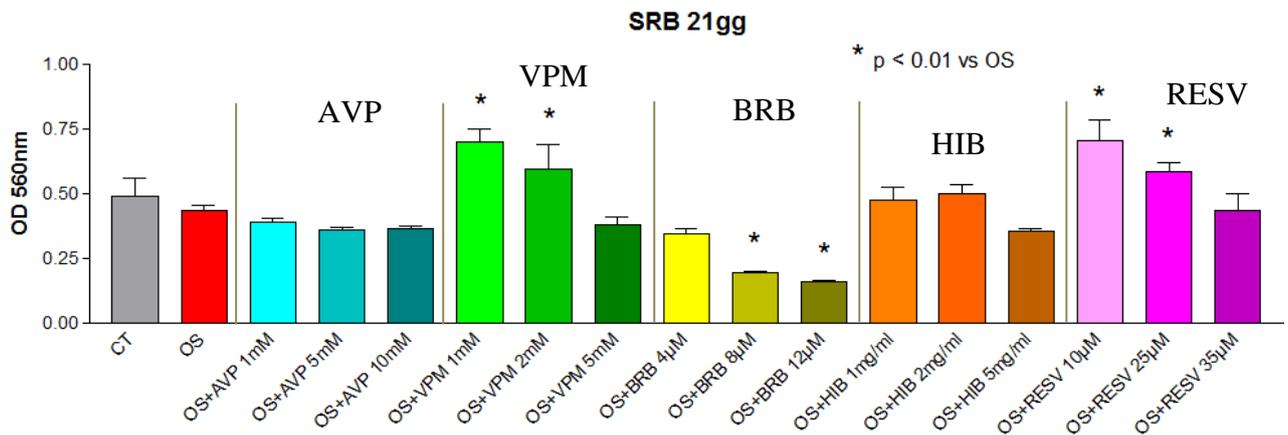
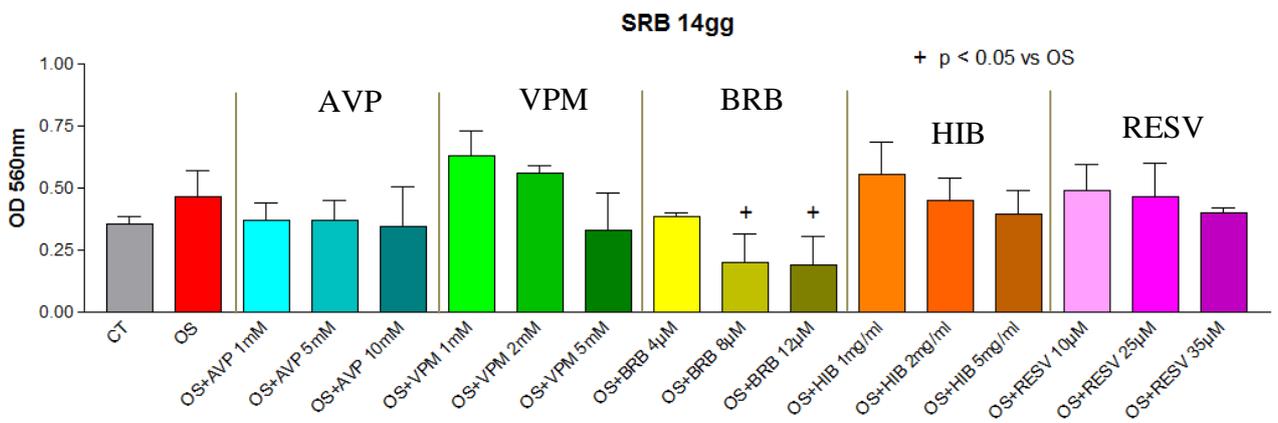
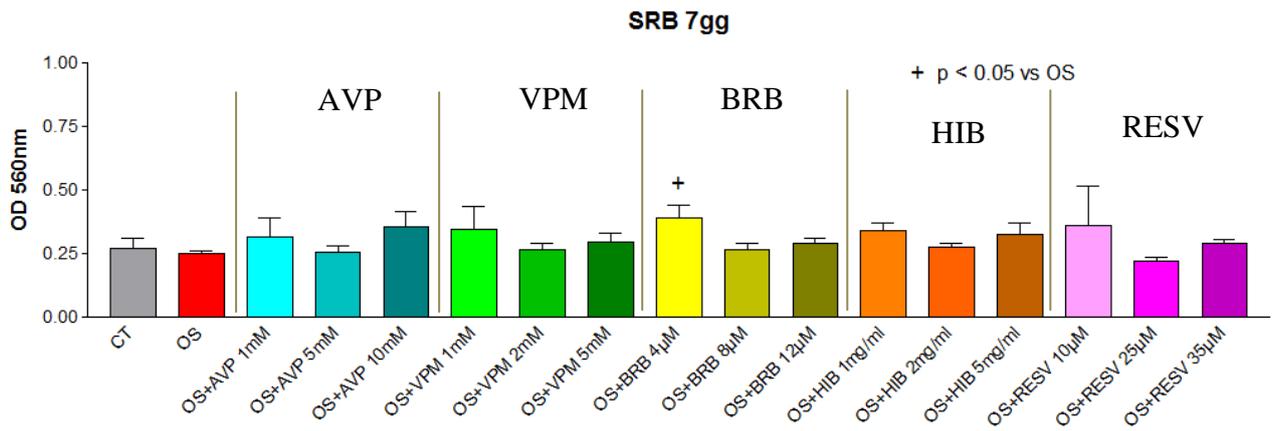


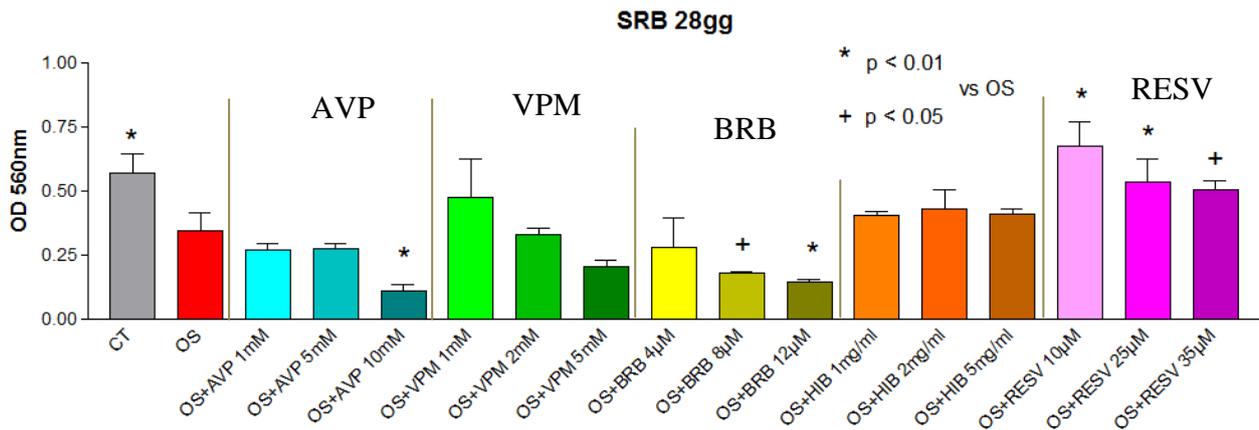
**Fig12 Valutazione mediante MTT assay test dell'effetto di AVP, VPM, BRB, HIB e RESV a diverse concentrazioni sulla vitalità delle hMSC indotte al differenziamento osteogenico (OS).** La significatività è stata valutata confrontando per ciascun tempo i valori ottenuti rispetto all'OS mediante il Dunnett's Multiple Comparison Test (\*  $p < 0.01$ ; +  $p < 0.05$  VS OS). I dati sono espressi sotto forma di media  $\pm$  deviazione standard, calcolati sui valori ottenuti in 3 esperimenti indipendenti.

### 2.3.2 SRB assay

A 24h dall'induzione al differenziamento osteogenico, le concentrazioni BRB  $8\mu\text{M}$  e BRB  $12\mu\text{M}$  causano una riduzione della vitalità cellulare rispetto all'OS e tale differenza si mantiene fino al 28°giorno. A 21gg dal differenziamento le cellule trattate con VPM 1mM, VPM 2mM, RESV  $10\mu\text{M}$  e RESV  $25\mu\text{M}$  hanno una vitalità significativamente maggiore rispetto all'OS. A fine trattamento la concentrazione AVP 10mM risulta tossica mentre le tre concentrazioni di RESV hanno un aumento significativo della vitalità rispetto all'OS. Per tutti i tempi analizzati, le cellule trattate con HIB hanno una vitalità paragonabile all'OS.







**Fig13 Valutazione mediante SRB assay test dell'effetto di AVP, VPM, BRB, HIB e RESV a diverse concentrazioni sulla vitalità delle hMSC indotte al differenziamento osteogenico (OS).** La significatività è stata valutata confrontando per ciascun tempo i valori ottenuti rispetto all'OS mediante il Dunnett's Multiple Comparison Test (\*  $p < 0.01$ ; +  $p < 0.05$  VS OS). I dati sono espressi sotto forma di media  $\pm$  deviazione standard, calcolati sui valori ottenuti in 3 esperimenti indipendenti.

Dai risultati ottenuti dai test di vitalità cellulare, abbiamo deciso di utilizzare, per gli esperimenti successivi, le concentrazioni:

- ACIDO VALPROICO (AVP): 5mM,
- VALPROMIDE (VPM): 1mM,
- BERBERINA (BRB): 4 $\mu$ M,
- HIBISCUS SABDARIFFA (HIB): 5mg/ml
- RESVERATROLO (RESV): 10 $\mu$ M.

Infatti tali concentrazioni non risultano tossiche sulle hMSC indifferenziate, sulle hMSC indotte al differenziamento adipogenico o osteogenico per tutta la durata del trattamento.

### ***3. EFFETTO DI AVP, VPM, BRB, HIB E RESV SUL DIFFERENZIAMENTO ADIPOGENICO DI hMSC***

È stato valutato l'effetto di AVP, VPM, BRB, HIB e RESV sul differenziamento adipogenico di hMSC. Le sostanze in esame sono state aggiunte al terreno di differenziamento sin dal momento iniziale dell'induzione e sono state mantenute per tutta la durata del trattamento differenziativo. Il controllo (CT) è rappresentato da cellule trattate solo con terreno di coltura DMEM-HG mentre l'AD corrisponde alle hMSC indotte con solo il terreno di induzione adipogenico. Al decimo giorno di trattamento il terreno di induzione è stato sostituito con il terreno di mantenimento.

A tempi prestabiliti (7, 10, 14, 21, 28gg) le cellule sono state colorate con Oil Red O, fotografate ed in seguito all'eluizione del colorante è stato eseguito un dosaggio spettrofotometrico.

Differenze tra le hMSC indotte al differenziamento adipogenico in presenza delle diverse sostanze o in loro assenza sono visibili a partire dai 7 giorni di trattamento e risultano maggiormente evidenti ai tempi successivamente valutati. In Fig14 ed in Fig15 sono riportate immagini della colorazione con Oil Red O a 14gg e 28gg in quanto più rappresentative.

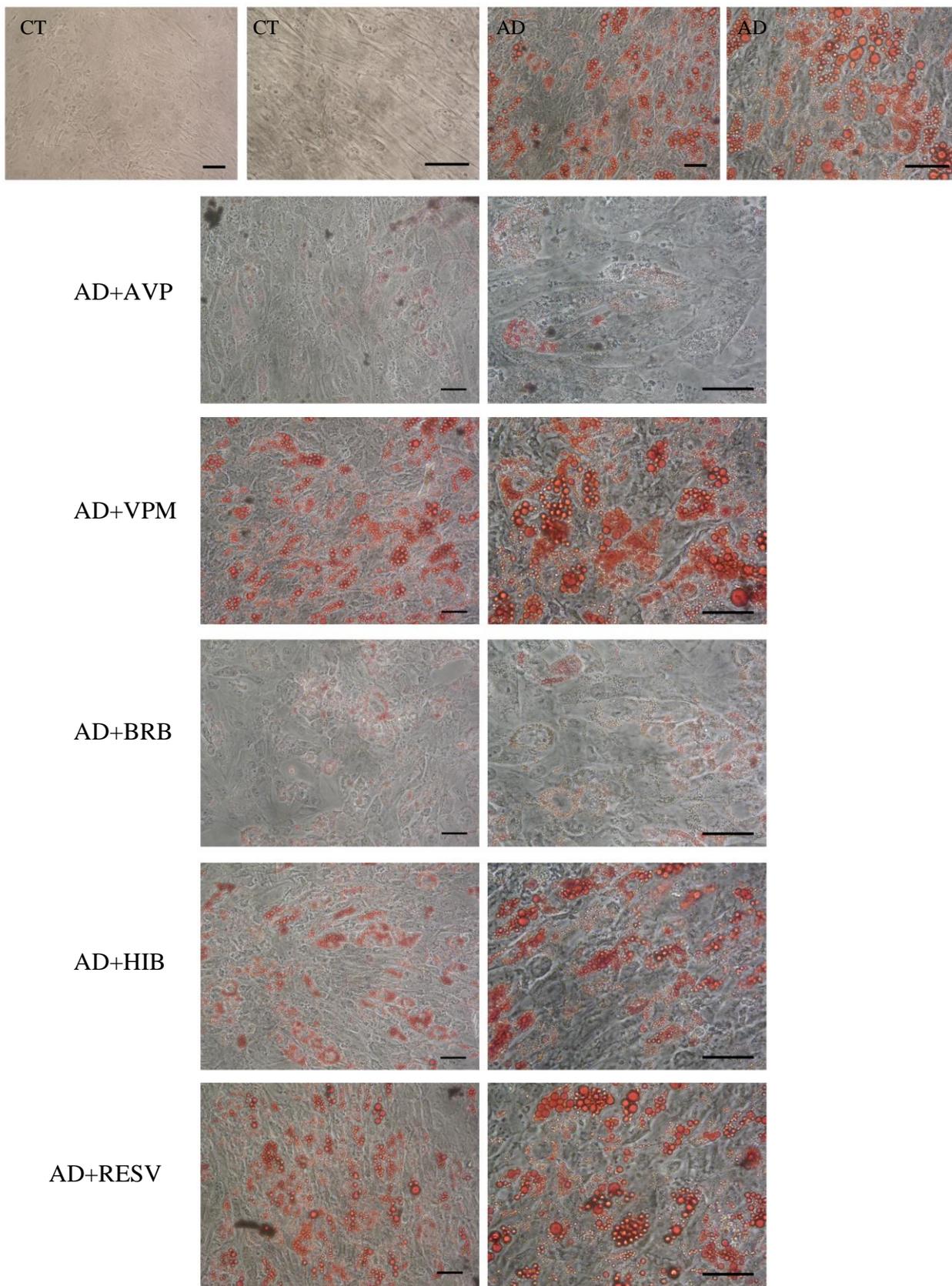
#### *Osservazioni al microscopio ottico in seguito alla colorazione Oil red O*

Le hMSC trattate con terreno di differenziamento + AVP assumono una morfologia rotondeggiante come l'AD ma le osservazioni al microscopio ottico evidenziano una minor quantità di gocce lipidiche intracellulari (Fig14). La differenza tra AD e AD+AVP è ancora più evidente a 28gg (Fig15).

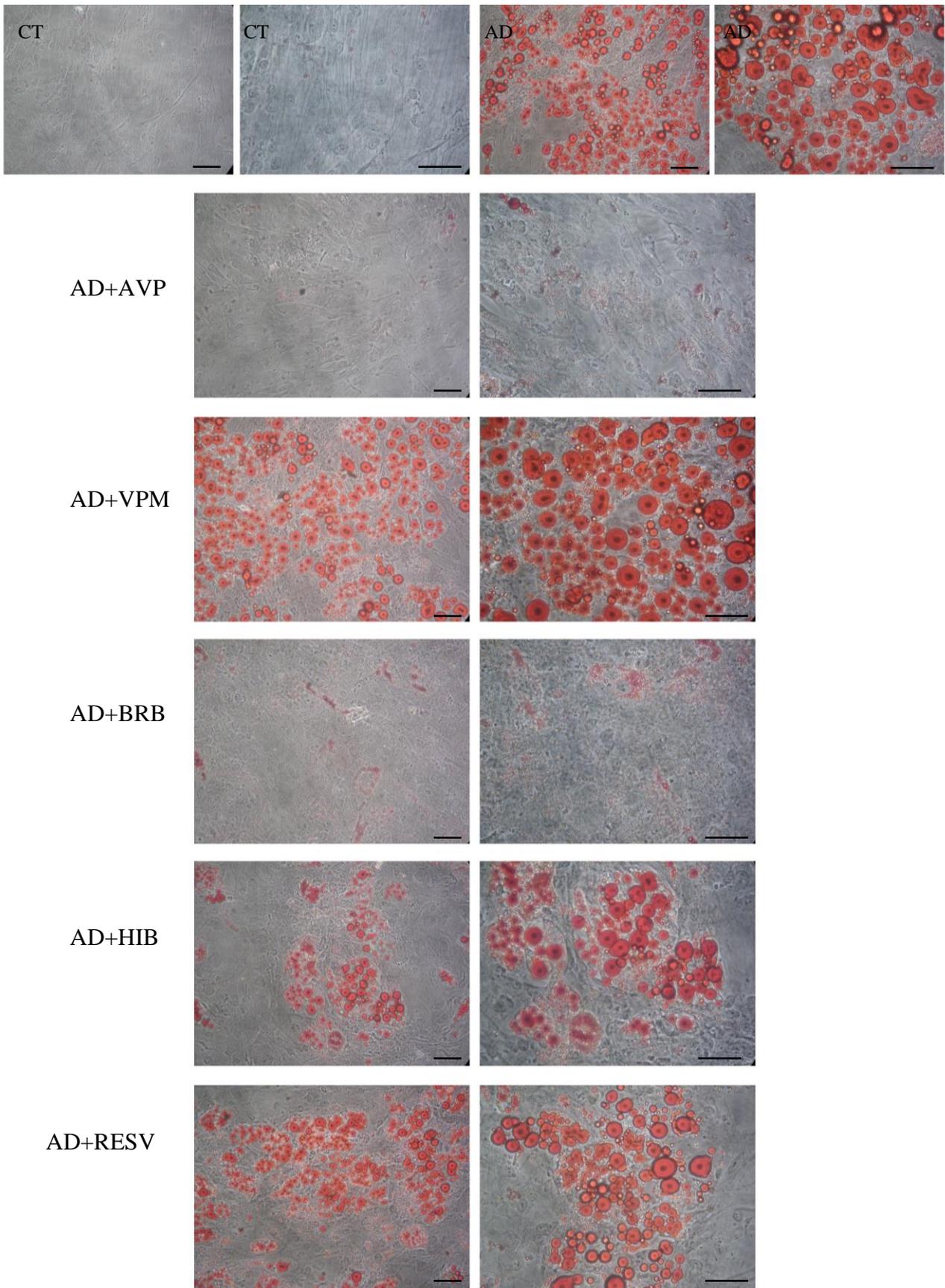
Le hMSC trattate con terreno di differenziamento + VPM sono paragonabili all'AD in quanto assumono una morfologia rotondeggiante ed accumulano lipidi sotto forma di gocce intracellulari (Fig14). A 28gg si osserva una maturazione delle cellule differenziate in quanto si ha un aumento delle dimensioni delle gocce lipidiche intracellulari (Fig15).

Le hMSC trattate con terreno di differenziamento + BRB assumono una morfologia rotondeggiante come l'AD ma non si osservano accumuli di gocce lipidiche all'interno delle cellule differenziate (Fig14). Questa osservazione è ancora più evidente dopo 28gg di trattamento (Fig15).

Le hMSC trattate con terreno di differenziamento + HIB si comportano come le hMSC trattate con RESV, infatti tendono ad assumere una forma rotondeggiante paragonabile all'AD ma le osservazioni al microscopio ottico evidenziano una minor quantità di cellule differenziate (Fig14). Dopo 28gg di trattamento sia per le hMSC AD+HIB che per le hMSC AD+RESV osserviamo che le poche cellule differenziate tendono comunque a fondere le gocce intracellulari che infatti risultano più voluminose (Fig15).



**Fig14 Colorazione Oil Red O.** La colorazione con Oil Red O è stata effettuata dopo 14 gg di trattamento in hMSC indotte al differenziamento adipogenico in assenza (AD) o presenza delle diverse sostanze (AD+AVP5mM, AD+VPM 1mM, AD+BRB 4 $\mu$ M, AD+HIB 5mg/ml e AD+RESV 10 $\mu$ M). Barra 50 $\mu$ m.



**Fig15 Colorazione Oil Red O.** La colorazione con Oil Red O è stata effettuata dopo 14 gg di trattamento in hMSC indotte al differenziamento adipogenico in assenza (AD) o presenza delle diverse sostanze (AD+AVP5mM, AD+VPM 1mM, AD+BRB 4µM, AD+HIB 5mg/ml e AD+RESV 10µM). Barra 50µm.

Dai grafici ottenuti con la quantizzazione dell'Oil Red O effettuata in seguito ad eluizione del colorante e al suo dosaggio spettrofotometrico, si osserva che nelle hMSC indotte al differenziamento adipogenico (AD) e nelle cellule trattate con solo il terreno DMEM-HG (CT) non si osservano differenze significative a 7gg di trattamento (Fig16 A). Dal 10gg fino alla fine del trattamento, per tutti i tempi analizzati (14gg, 21gg e 28gg) aumenta in maniera significativa l'assorbanza dell'Oil Red O nell'AD rispetto al CT. Dal grafico si può anche osservare che, con il proseguire del trattamento, le cellule trattate per il differenziamento adipogenico hanno un progressivo aumento della quantità di colorante che indica l'aumento del numero di cellule differenziate e del numero/volume di gocce intracellulari.

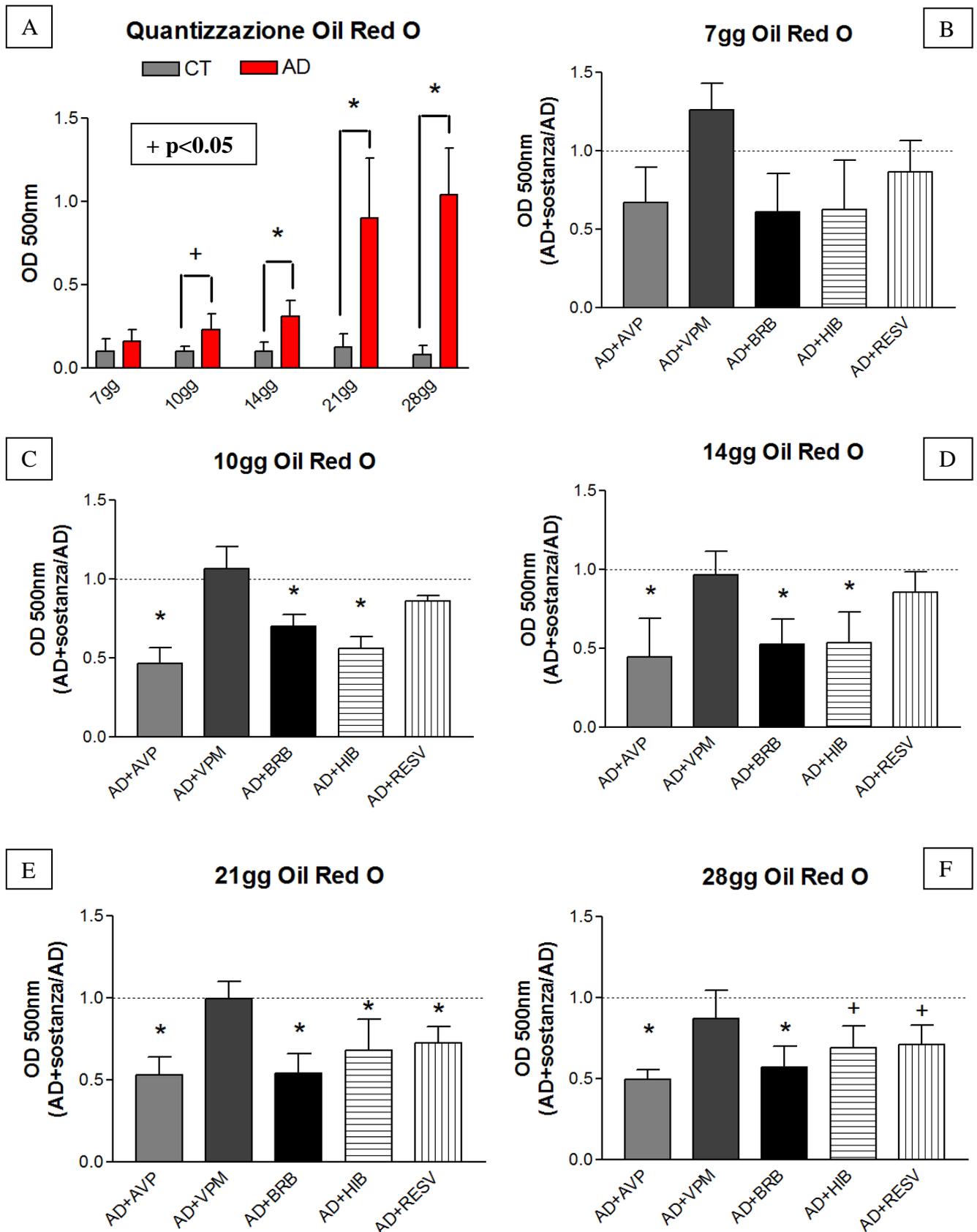
Dai grafici ottenuti con la quantizzazione dell'Oil Red O effettuata in seguito ad eluizione del colorante e al suo dosaggio spettrofotometrico (Fig16 B-F), si osserva che a 7gg non ci sono differenze statisticamente significative tra le hMSC trattate con solo il terreno di differenziamento (AD) e le hMSC indotte al differenziamento adipogenico con l'aggiunta delle sostanze.

A 10gg, 14gg, 21gg e 28gg le hMSC trattate con il terreno di differenziamento e AVP, BRB e HIB presentano valori di assorbanza significativamente ridotti rispetto all'AD. Per le cellule trattate con RESV i valori di assorbanza si riducono in maniera significativa rispetto all'AD solo a 21gg ed il dato è confermato anche a 28gg di trattamento.

Per quanto riguarda le cellule trattate con VPM 1mM le variazioni osservate non sono significative rispetto all'ADIPO per tutti i tempi analizzati.

Dai risultati ottenuti con le osservazioni al microscopio ottico e dall'analisi quantitativa dell'eluizione dell'Oil Red O, si osserva che le hMSC indotte al differenziamento adipogenico e trattate con:

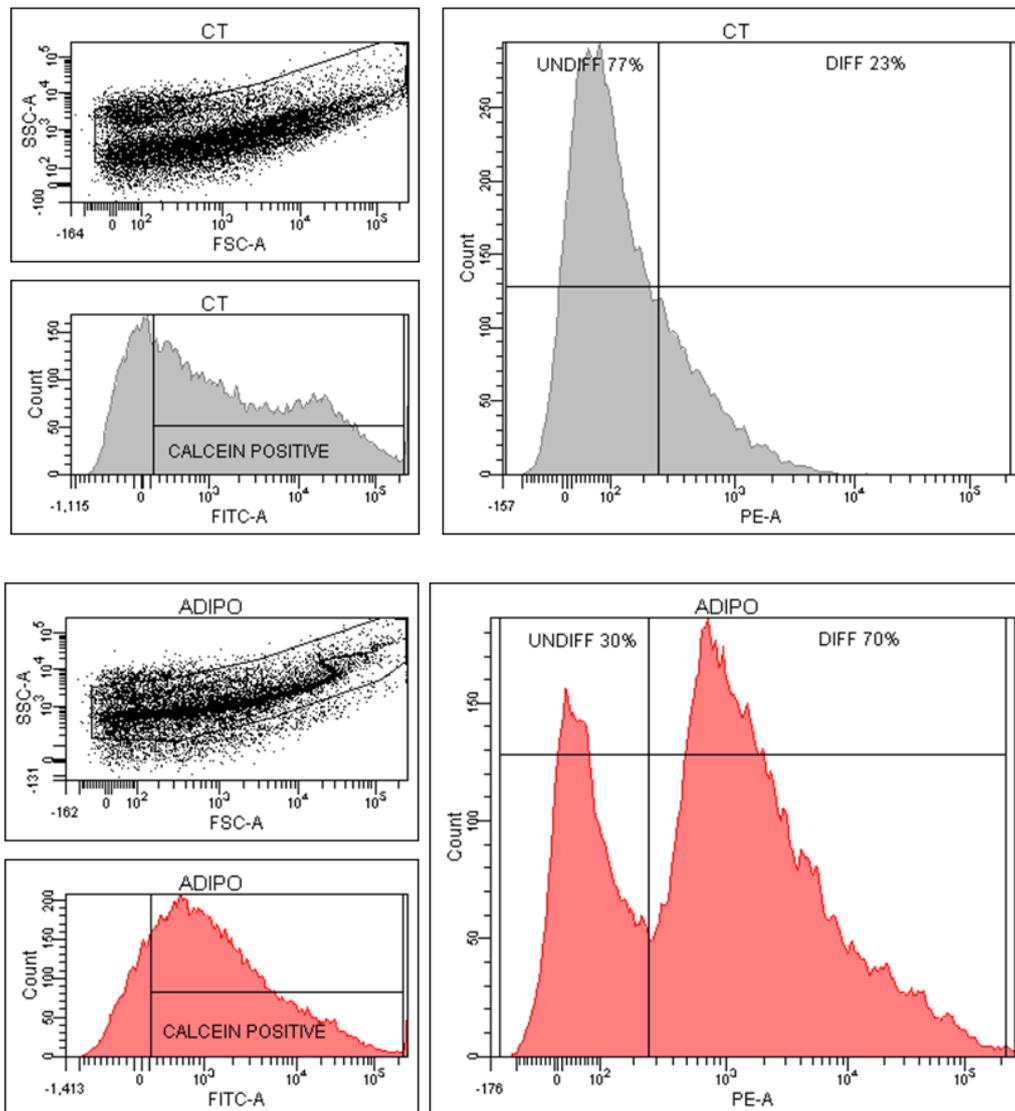
- AVP, BRB, HIB e RESV hanno una inibizione del differenziamento adipogenico,
- VPM non variano rispetto alle hMSC indotte con solo il terreno adipogenico.

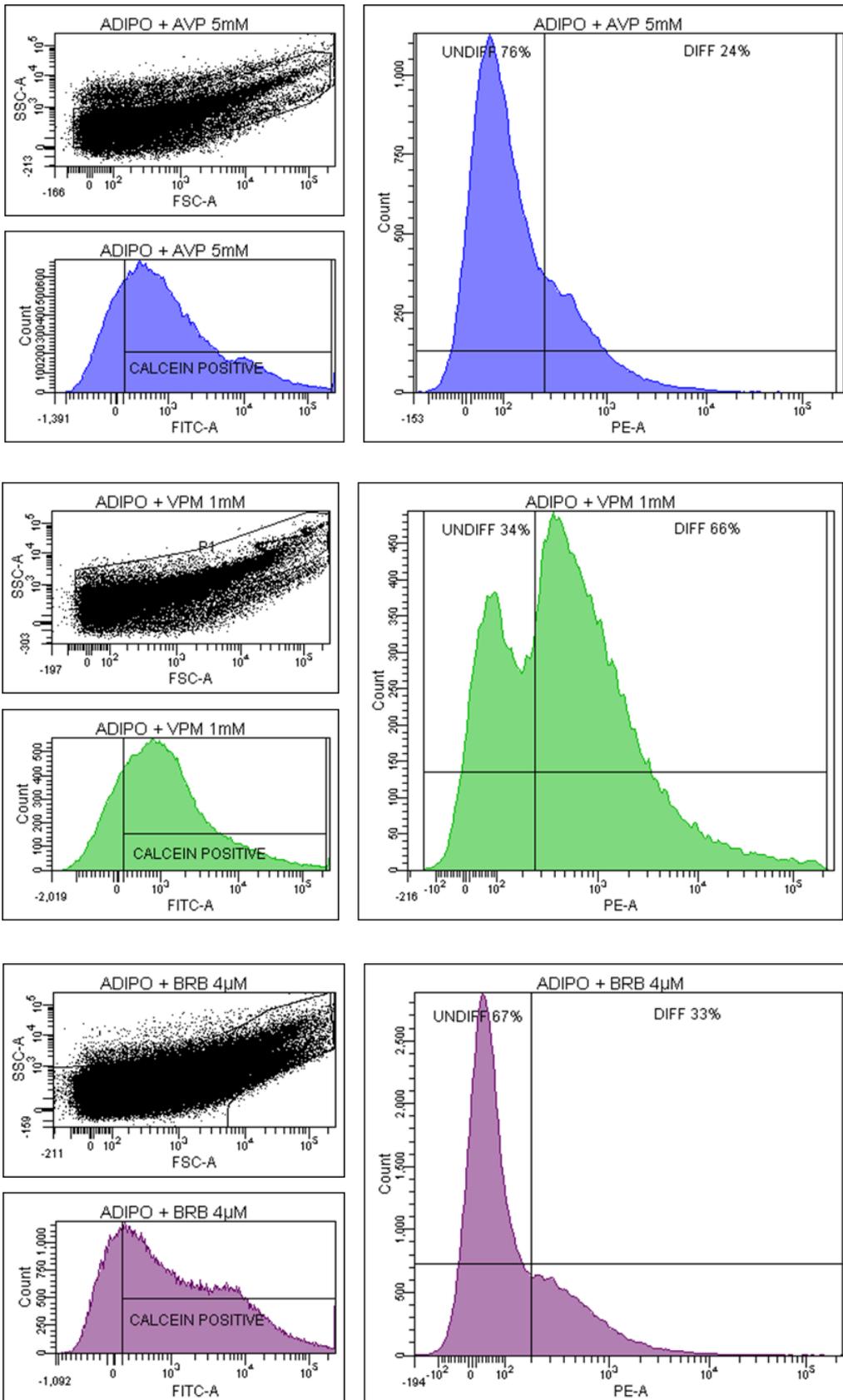


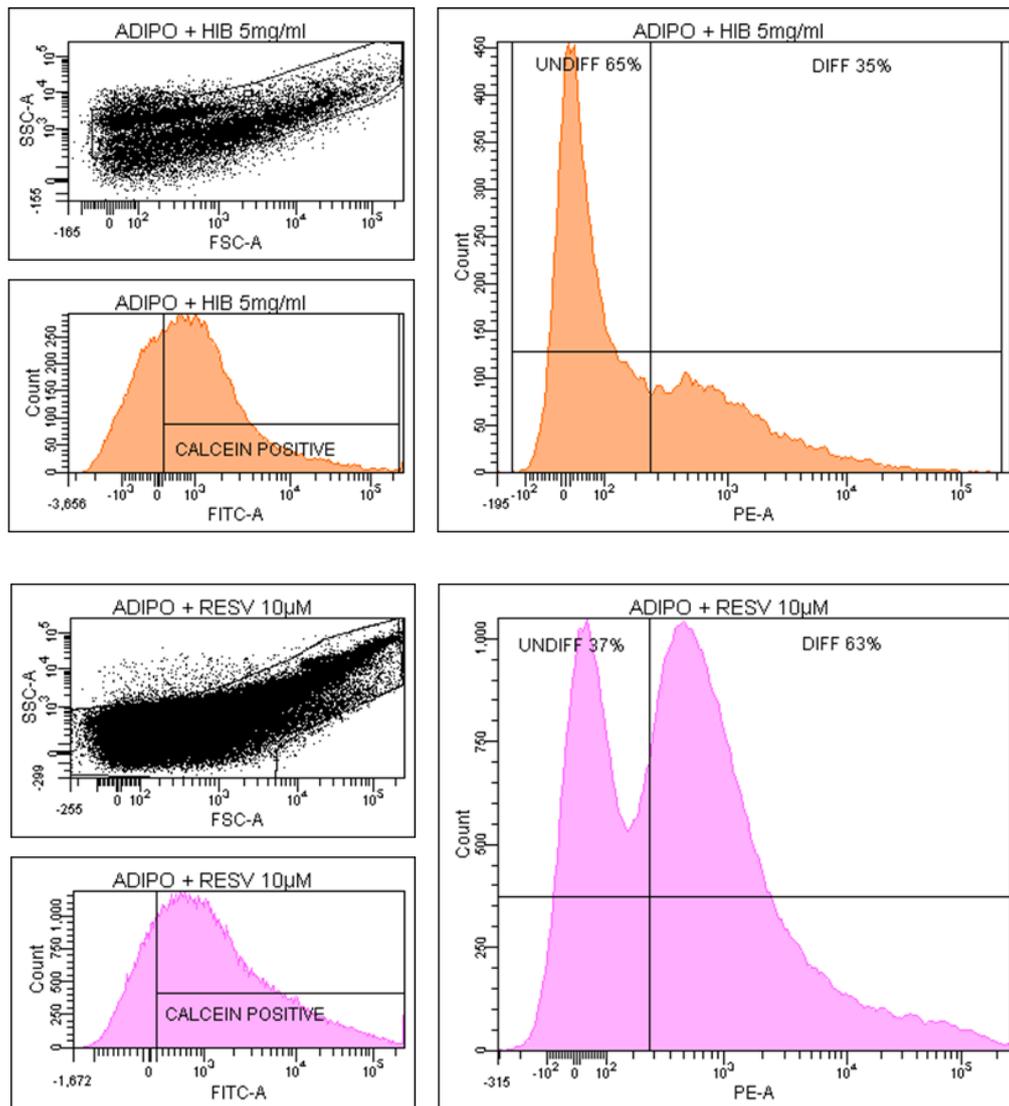
**Fig16 Quantizzazione Oil Red O delle hMSC.** I dati sono espressi sotto forma di media  $\pm$  deviazione standard, calcolati sui valori ottenuti in 3 esperimenti indipendenti. La linea tratteggiata corrisponde alla media degli OD osservati in AD. (A) La significatività è stata valutata con il test t di Student per CT-AD (\*  $p < 0.01$ ; +  $p < 0.05$ ), (B-F), confrontando per ciascun tempo i valori degli OD ottenuti rispetto all'OD dell'AD mediante il Dunnett's Multiple Comparison Test (\*  $p < 0.01$ ; +  $p < 0.05$  VS AD).

## 4. VALUTAZIONE DEL DIFFERENZIAMENTO ADIPOGENICO MEDIANTE NILE RED

Dopo 28gg di induzione adipogenica in presenza o in assenza delle sostanze, le cellule sono state staccate, fissate e marcate con Calceina (visibile nel canale FITC-A) e Nile Red (visibile nel canale PE-A) e analizzate al citofluorimetro (Fig17). Il controllo (CT) è rappresentato da cellule trattate solo con terreno di coltura DMEM-HG mentre l'ADIPO corrisponde alle hMSC indotte con solo il terreno di induzione adipogenico. Al decimo giorno di trattamento il terreno di induzione viene sostituito con il terreno di mantenimento (AMM).



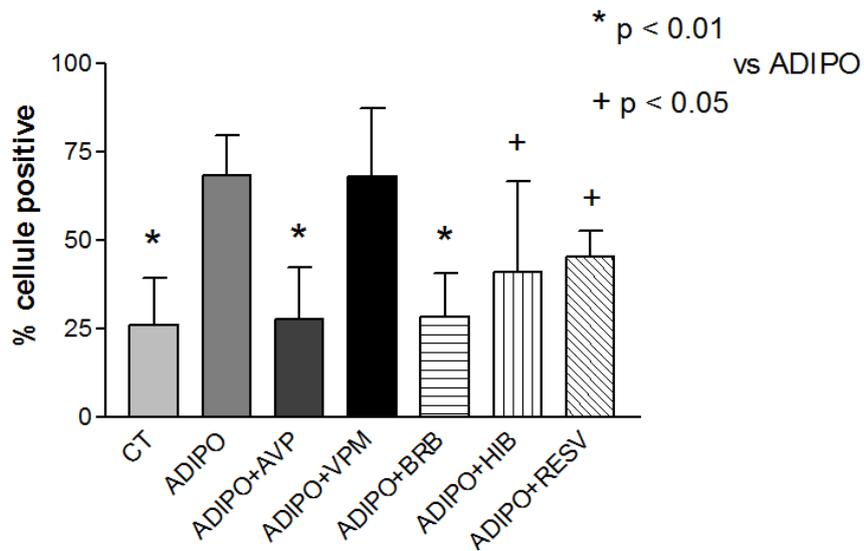




**Fig17 Analisi del differenziamento adipogenico mediante citofluorimetria.** Le immagini riportate sono rappresentative di un esperimento che è stato ripetuto sei volte.

Per poter analizzare le cellule differenziate, vengono prima selezionate le cellule positive alla calceina, come indicatore di vitalità, e poi su quelle selezionate viene analizzato il Nile Red.

Dai dati ottenuti da 6 esperimenti differenti, si osserva che tra le cellule indotte al differenziamento adipogenico (ADIPO) e le cellule trattate con VPM 1mM non c'è differenza, infatti la percentuale di cellule differenziate è di circa il 75% per entrambe. Le cellule trattate con AVP e BRB hanno una percentuale di cellule differenziate significativamente inferiore rispetto all'ADIPO, infatti la percentuale è di circa il 25%. Anche per le cellule trattate con HIB e RESV la percentuale di cellule differenziate è significativamente minore rispetto all'ADIPO e la percentuale è di circa il 50% (Fig18).



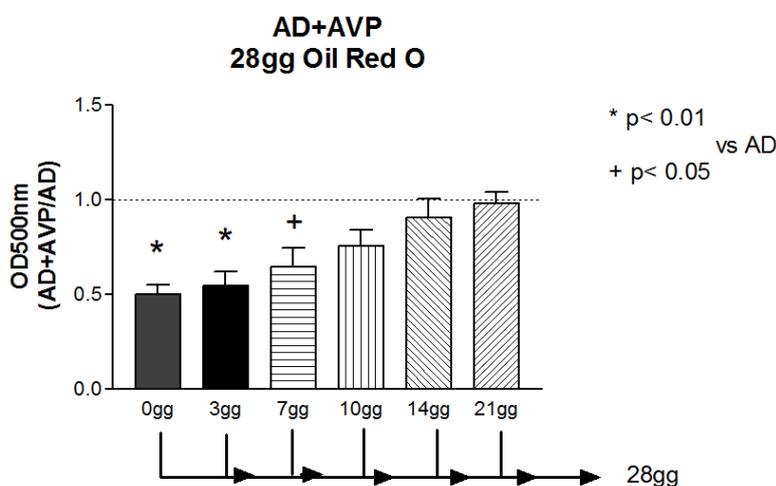
**Fig18 Percentuale delle cellule positive alla Calceina e al Nile Red dopo 28gg di trattamento.** La significatività è stata valutata confrontando i valori ottenuti rispetto all'ADIPO mediante il Dunnett's Multiple Comparison Test (\* p < 0.01; + p < 0.05 VS ADIPO). I dati sono espressi sotto forma di media ± deviazione standard, calcolati sui valori ottenuti in 6 esperimenti indipendenti.

## 5. EFFETTO DI AVP, VPM E HIB SUL DIFFERENZIAMENTO ADIPOGENICO AGGIUNTE A TEMPI DIVERSI

Negli esperimenti successivamente descritti le diverse sostanze esaminate sono state aggiunte al terreno di differenziamento adipogenico a tempi diversi dall'inizio del trattamento. **0gg** indica che la sostanza è stata aggiunta contemporaneamente al terreno di differenziamento adipogenico ed è presente per tutta la durata del trattamento. **3gg, 7gg, 10gg, 14gg e 21gg** indicano che la sostanza è stata aggiunta dopo 3-7-10-14-21 giorni dall'induzione con il terreno di differenziamento ed è presente fino alla fine del trattamento differenziativo. Le sostanze analizzate sono AVP5mM, VPM1mM e HIB5mg/ml perchè sono risultate le più interessanti.

### 5.1 ACIDO VALPROICO

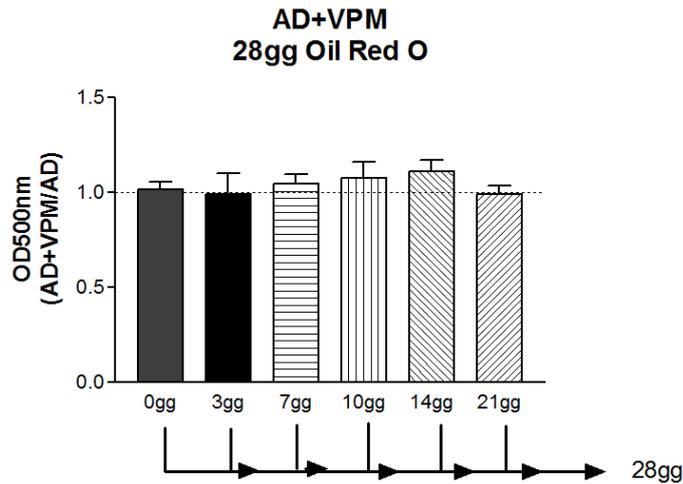
Dalla quantizzazione dell'Oil Red O (Fig19) si osserva che l'effetto anti-adipogenico dell'AVP si verifica quando viene aggiunto al terreno di differenziamento al tempo 0 o dopo 3 o 7 giorni dall'inizio dell'induzione al differenziamento stesso. L'aggiunta della sostanza dopo 10, 14 o 21gg non comporta variazioni significative, infatti i valori dell'assorbanza sono paragonabili ai valori delle hMSC indotte con solo il terreno adipogenico.



**Fig19 Quantizzazione Oil Red O a 28gg delle hMSC trattate con AVP5mM.** 0gg indica che AVP è stata aggiunta contemporaneamente al terreno di differenziamento adipogenico ed è presente per tutta la durata del trattamento. 3gg, 7gg, 10gg, 14gg e 21gg indicano che AVP è stata aggiunta dopo 3-7-10-14-21 giorni dall'induzione con il terreno di differenziamento ed è presente fino alla fine del trattamento differenziativo. La linea tratteggiata corrisponde alla media degli OD osservati in AD. La significatività è stata valutata confrontando per ciascun tempo i valori degli OD ottenuti rispetto all'OD dell'AD mediante il Dunnett's Multiple Comparison Test (\* p < 0.01; + p < 0.05 VS AD).

### 5.2 VALPROMIDE

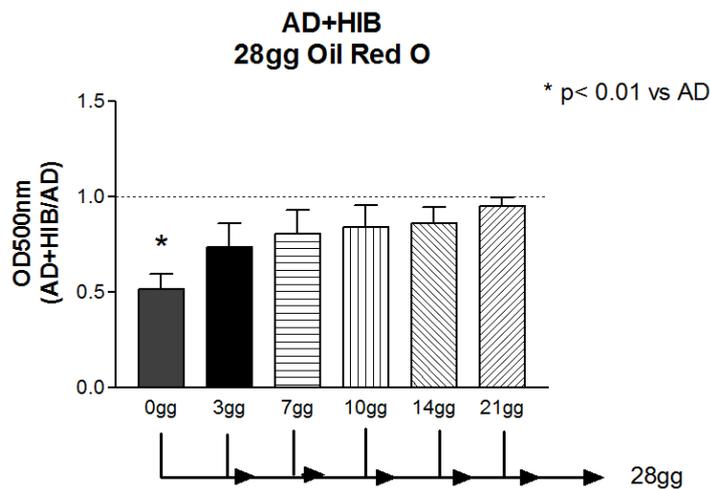
Dalla quantizzazione dell'Oil Red O (Fig20) e dalle osservazioni al microscopio ottico si dimostra che VPM non ha effetto antiadipogenico sia se aggiunto al giorno 0 che successivamente.



**Fig20 Quantizzazione Oil Red O a 28gg delle hMSC trattate con VPM1mM.** 0gg indica che VPM è stata aggiunta contemporaneamente al terreno di differenziamento adipogenico ed è presente per tutta la durata del trattamento. 3gg, 7gg, 10gg, 14gg e 21gg indicano che VPM è stata aggiunta dopo 3-7-10-14-21 giorni dall'induzione con il terreno di differenziamento ed è presente fino alla fine del trattamento differenziativo. La linea tratteggiata corrisponde alla media degli OD osservati in AD. La significatività è stata valutata confrontando per ciascun tempo i valori degli OD ottenuti rispetto all'OD dell'AD mediante il Dunnett's Multiple Comparison Test (\*  $p < 0.01$ ; +  $p < 0.05$  VS AD).

### 5. 3 HIBISCUS SABDARIFFA

L'effetto anti-adipogenico di HIB5mg/ml si osserva solo quando viene aggiunto nel momento stesso in cui le cellule vengono indotte con il terreno adipogenico e mantenuto per tutta la durata del trattamento. Non si osserva alcun effetto sul differenziamento adipogenico se HIB viene aggiunta in giorni successivi rispetto all'induzione (Fig21).



**Fig21 Quantizzazione Oil Red O a 28gg delle hMSC trattate con HIB5mg/ml.** 0gg indica che HIB è stata aggiunta contemporaneamente al terreno di differenziamento adipogenico ed è presente per tutta la durata del trattamento. 3gg, 7gg, 10gg, 14gg e 21gg indicano che HIB è stata aggiunta dopo 3-7-10-14-21 giorni dall'induzione con il terreno di differenziamento ed è presente fino alla fine del trattamento differenziativo. La linea tratteggiata corrisponde alla media degli OD osservati in AD. La significatività è stata valutata confrontando per ciascun tempo i valori degli OD ottenuti rispetto all'OD dell'AD mediante il Dunnett's Multiple Comparison Test (\*  $p < 0.01$ ; +  $p < 0.05$  VS AD).

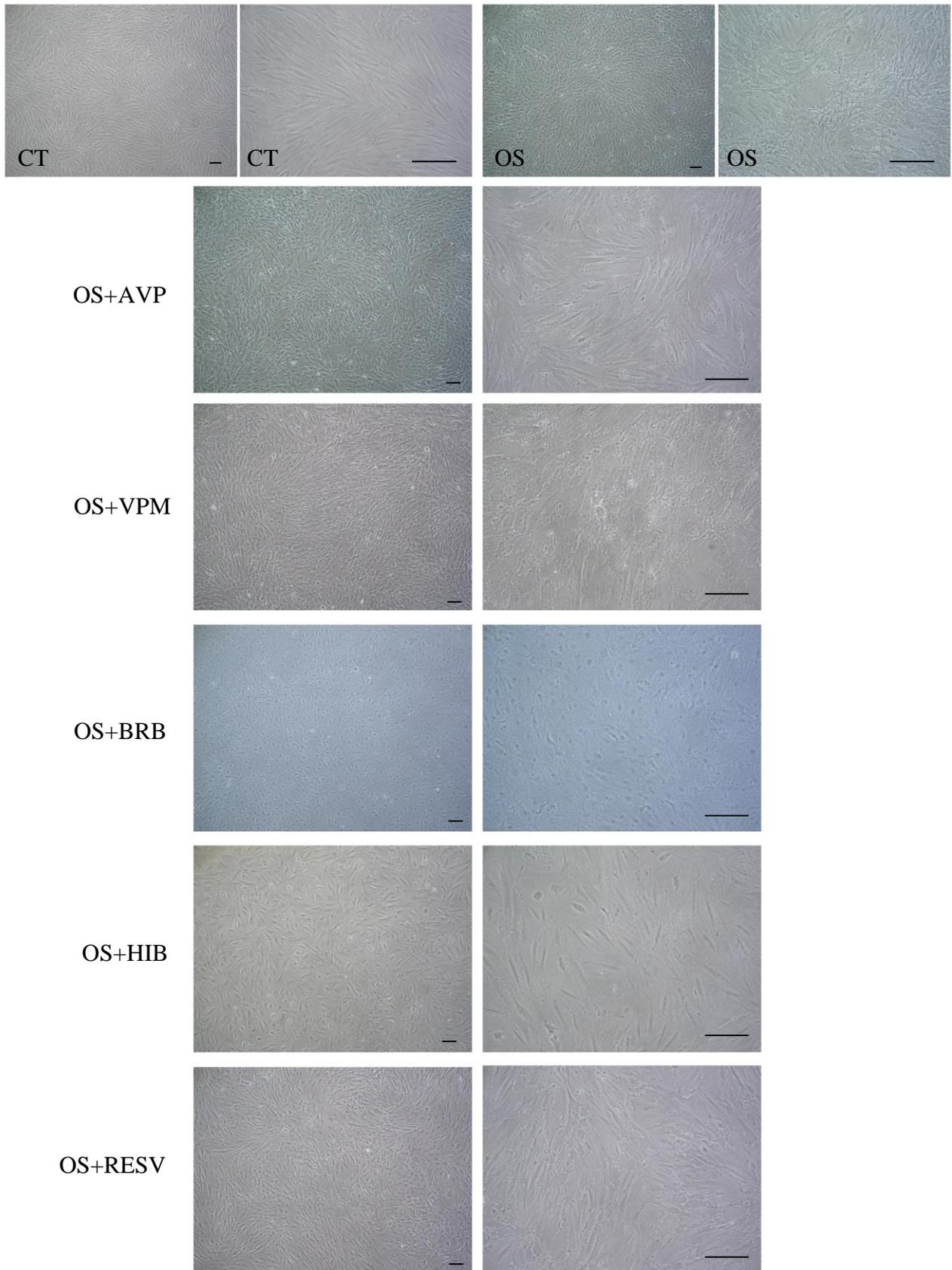
## ***6. EFFETTO DI AVP, VPM, BRB, HIB E RESV SUL DIFFERENZIAMENTO OSTEOGENICO DI hMSC***

È stato valutato l'effetto di AVP, VPM, BRB, HIB e RESV sul differenziamento osteogenico di hMSC. Le sostanze in esame sono state aggiunte al terreno di differenziamento sin dal momento iniziale dell'induzione e mantenute per tutta la durata del trattamento. A tempi prestabiliti (7, 10, 14, 21, 28gg) le cellule sono state fotografate, fissate e colorate con Alizarin Red S e successivamente è stata effettuata una quantizzazione mediante analisi spettrofotometrica. Il controllo (CT) è rappresentato da cellule trattate solo con terreno di coltura DMEM-LG mentre l'OS corrisponde alle hMSC indotte con solo il terreno di induzione osteogenico.

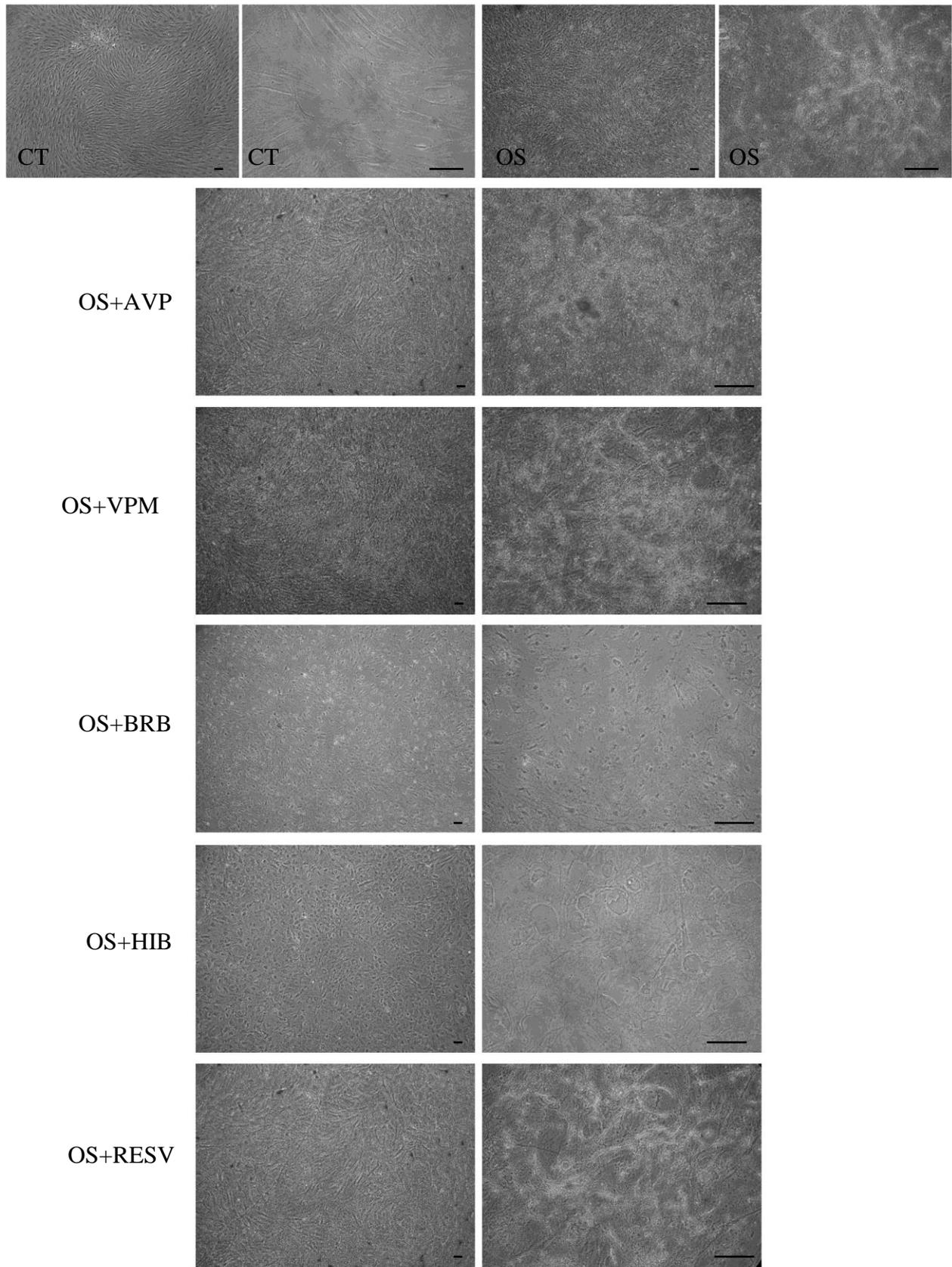
Dalle analisi al microscopio ottico e dalla colorazione con Alizarin Red S si osserva che a 14gg le hMSC OS+AVP e OS+VPM iniziano a depositare la matrice mineralizzata (Fig22) che in seguito alla colorazione istologica diventa visibilmente rossa mentre nell'OS il differenziamento non è ancora visibile (Fig24). A 14gg le hMSC OS+BRB, OS+HIB e OS+RESV hanno una morfologia paragonabile al CT, infatti la colorazione Alizarin Red S risulta negativa. A 28gg (Fig23) nelle hMSC OS+AVP, OS+VPM e OS+RESV si osservano numerosi depositi di matrice mineralizzata paragonabili all'OS che risultano positivi alla colorazione istologica (Fig24).

Dai grafici ottenuti con la quantizzazione dell'Alizarin Red S, si osserva che nelle hMSC indotte al differenziamento osteogenico (OS) e nelle cellule trattate con solo il terreno DMEM-LG (CT) non si osservano differenze significative a 7gg e 10gg di trattamento (Fig25A). Dal 14gg fino alla fine del trattamento, per tutti i tempi analizzati (21gg e 28gg), aumenta in maniera significativa l'assorbanza dell'Alizarin Red S nell'OS rispetto al CT. Dal grafico si può anche osservare che, con il proseguire del trattamento, le cellule trattate per il differenziamento osteogenico hanno un progressivo aumento della quantità di colorante che indica l'aumento della deposizione della matrice mineralizzata.

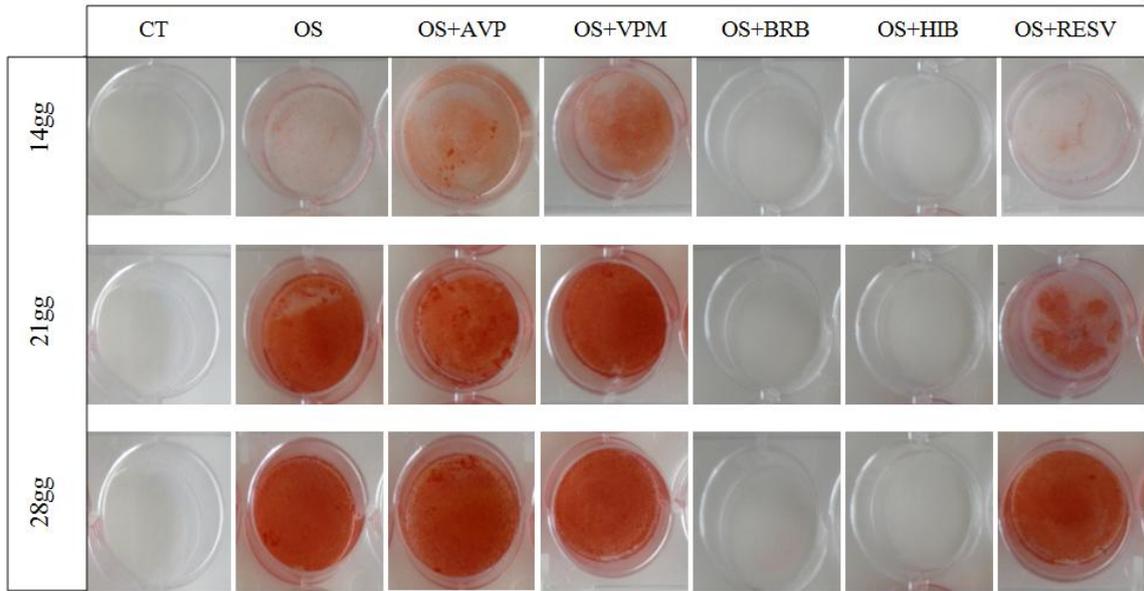
Dopo 7gg di induzione con il terreno osteogenico, non ci sono differenze statisticamente significative tra le hMSC trattate con solo il terreno di differenziamento (OS) e le hMSC indotte al differenziamento osteogenico con l'aggiunta delle sostanze (Fig25). A 10gg e 14gg si osserva che le hMSC OS+AVP e OS+VPM presentano un aumento significativo dell'assorbanza rispetto all'OS e questo dimostra che tali sostanze anticipano il differenziamento osteogenico. A 21gg l'assorbanza dell'Alizarin Red S delle hMSC OS+BRB, OS+HIB e OS+RESV è significativamente ridotta rispetto all'OS ma questa riduzione rimane tale solo per le hMSC OS+BRB e OS+HIB anche ai 28gg.



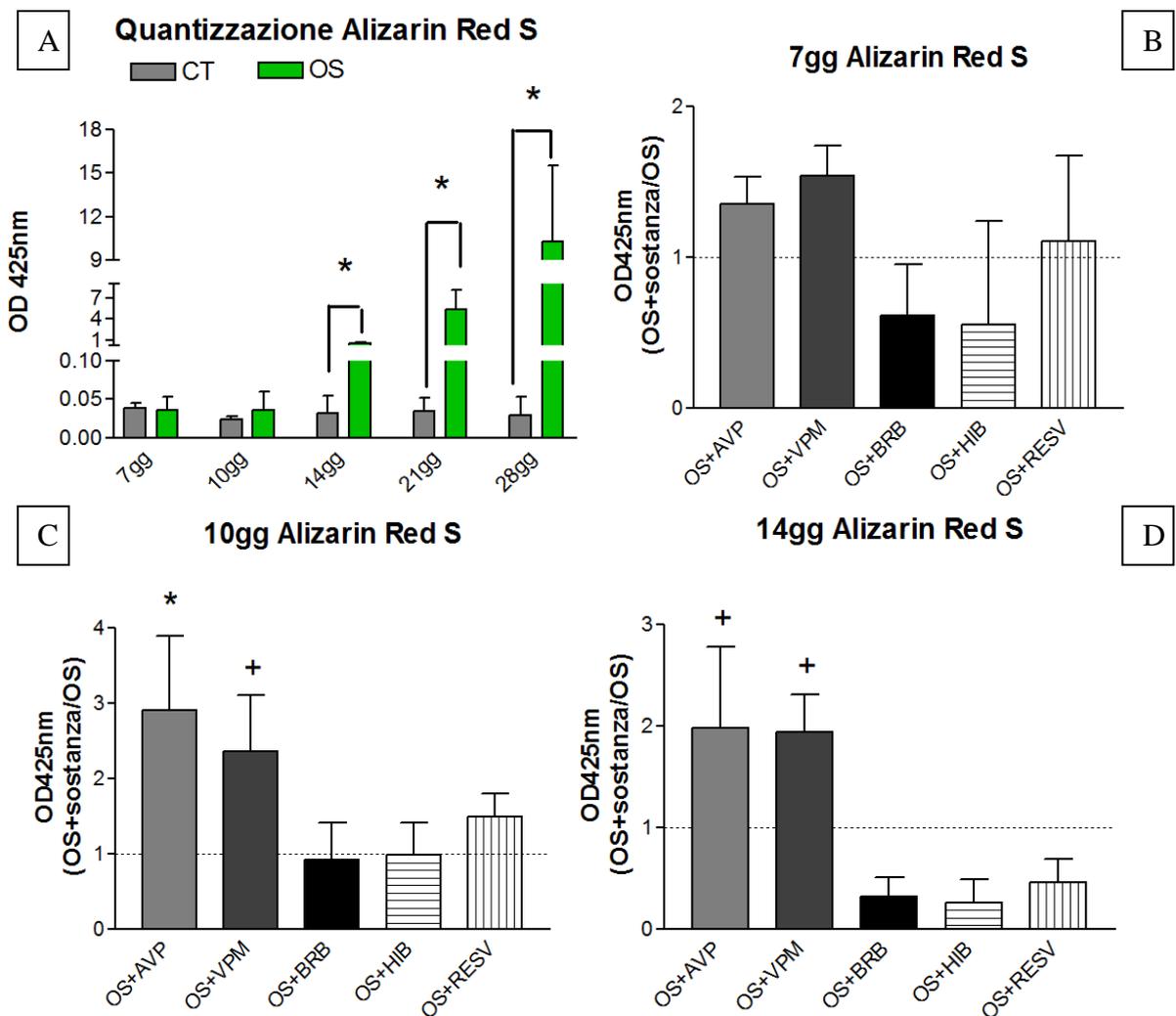
**Fig22 Immagine al microscopio ottico a 14gg.** hMSC indotte al differenziamento osteogenico in assenza (OS) o presenza delle diverse sostanze (OS+AVP5mM, OS+VPM 1mM, OS+BRB 4μM, OS+HIB 5mg/ml e OS+RESV 10μM). Il controllo (CT) è rappresentato da cellule trattate solo con terreno di coltura DMEM-LG. Barra 100μm

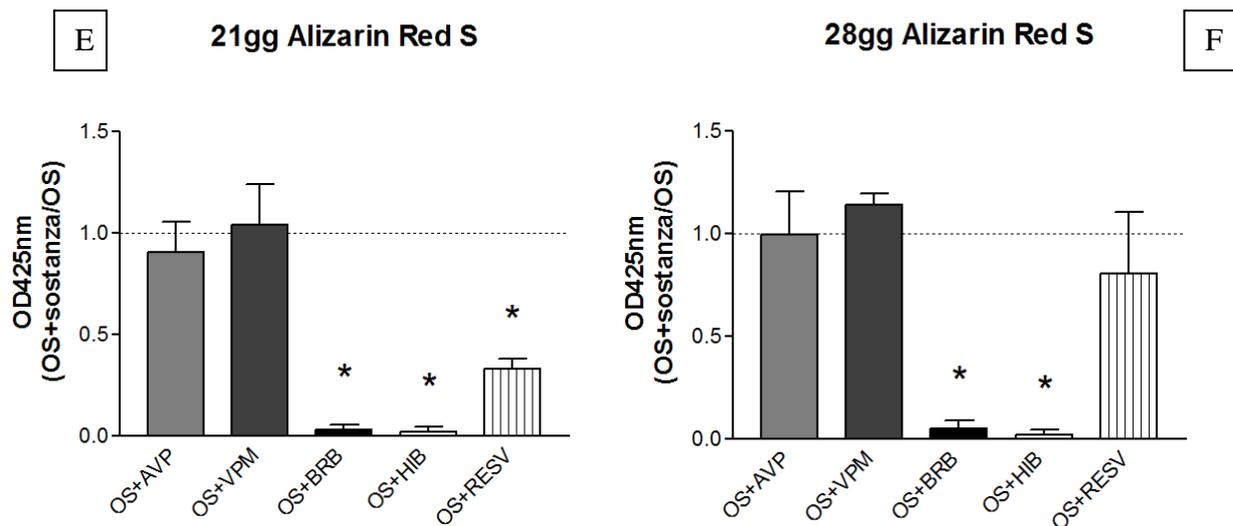


**Fig23 Immagine al microscopio ottico a 28gg.** hMSC indotte al differenziamento osteogenico in assenza (OS) o presenza delle diverse sostanze (OS+AVP5mM, OS+VPM 1mM, OS+BRB 4 $\mu$ M, OS+HIB 5mg/ml e OS+RESV 10 $\mu$ M). Il controllo (CT) è rappresentato da cellule trattate solo con terreno di coltura DMEM-LG. Barra 100 $\mu$ m



**Fig24** Dish colorate con Alizarin Red S a 14, 21 e 28 giorni. hMSC indotte al differenziamento osteogenico in assenza (OS) o presenza delle diverse sostanze (OS+AVP 5mM, OS+VPM 1mM, OS+BRB 4 $\mu$ M, OS+HIB 5mg/ml e OS+RESV 10 $\mu$ M). Il controllo (CT) è rappresentato da cellule trattate solo con terreno di coltura DMEM-LG.





**Fig25 Quantizzazione Alizarin Red S delle hMSC.** I dati sono espressi sotto forma di media  $\pm$  deviazione standard, calcolati sui valori ottenuti in 3 esperimenti indipendenti. La linea tratteggiata corrisponde alla media degli OD osservati in OS. (A) La significatività è stata valutata con il test t di Student per CT-OS (\*  $p < 0.01$ ), (B-F) confrontando per ciascun tempo i valori degli OD ottenuti, rispetto all'OD dell'OS mediante il Dunnett's Multiple Comparison Test (\*  $p < 0.01$ ; +  $p < 0.05$  VS OS).

Dai dati ottenuti si osserva che nelle hMSC indotte al differenziamento osteogenico:

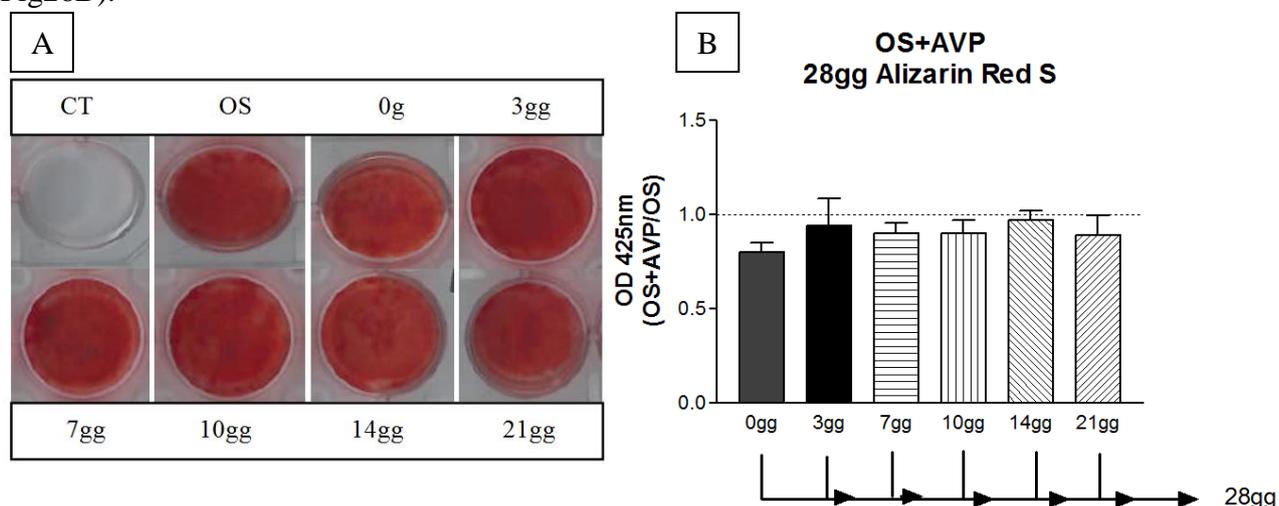
- AVP e VPM anticipano il differenziamento osteogenico
- HIB e BRB inibiscono il differenziamento osteogenico
- RESV ritarda il differenziamento osteogenico

## 7. EFFETTO DI AVP, VPM E HIB SUL DIFFERENZIAMENTO OSTEOGENICO AGGIUNTE A DIVERSI TEMPI

Negli esperimenti successivamente descritti, le diverse sostanze esaminate sono state aggiunte al terreno di differenziamento osteogenico a tempi diversi dall'inizio del trattamento. **0gg** indica che la sostanza è stata aggiunta contemporaneamente al terreno di differenziamento osteogenico ed è presente per tutta la durata del trattamento. **3gg, 7gg, 10gg, 14gg e 21gg** indicano che la sostanza è stata aggiunta dopo 3-7-10-14-21 giorni dall'induzione del differenziamento ed è presente fino alla fine del trattamento differenziativo. Le sostanze analizzate sono AVP5mM, VPM1mM e HIB5mg/ml perchè sono risultate le più interessanti.

### 7.1 ACIDO VALPROICO

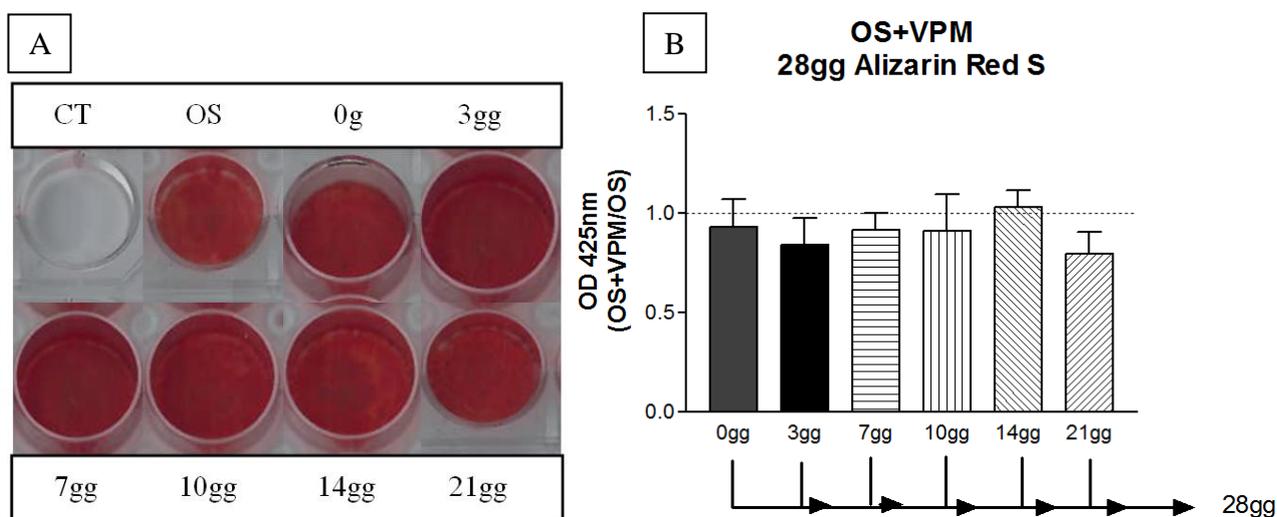
Dai dati ottenuti si osserva che l'aggiunta di AVP a 0-3-7-10-14-21 giorni dall'inizio del differenziamento osteogenico, se valutata a 28gg non porta ad alcuna differenza. Infatti la colorazione istologica fatta a 28gg non evidenzia l'effetto pro-osteogenico di AVP (Fig26A). Dal grafico infatti non si notano differenze statisticamente significative nell'assorbanza del colorante tra le hMSC indotte al differenziamento osteogenico e l'aggiunta di AVP a tempi diversi e OS (Fig26B).



**Fig26** Colorazione con Alizarin Red S (A) e quantizzazione (B) a 28gg in seguito al trattamento con AVP 5mM. 0gg indica che AVP è stata aggiunta contemporaneamente al terreno di differenziamento osteogenico ed è presente per tutta la durata del trattamento. 3gg, 7gg, 10gg, 14gg e 21gg indicano che AVP è stata aggiunta rispettivamente dopo 3-7-10-14-21 giorni dall'induzione con il terreno di differenziamento ed è presente fino alla fine del trattamento differenziativo. La linea tratteggiata corrisponde alla media degli OD osservati in OS. La significatività è stata valutata confrontando gli OD ottenuti a 28gg con i diversi trattamenti, rispetto all'OD dell'OS mediante il Dunnett's Multiple Comparison Test (\*  $p < 0.01$ ; +  $p < 0.05$  VS OS).

## 7.2 VALPROMIDE

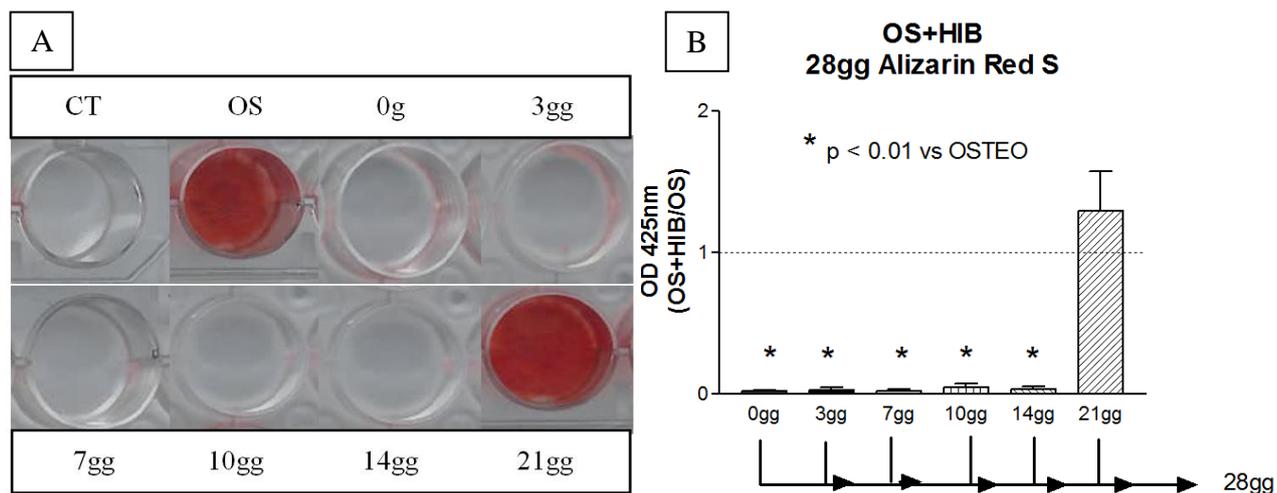
Dai dati ottenuti si osserva che l'aggiunta di VPM a 0-3-7-10-14-21 giorni dall'inizio del differenziamento osteogenico, se valutata a 28gg non porta ad alcuna differenza. Infatti la colorazione istologica fatta a 28gg non evidenzia l'effetto pro-osteogenico di VPM (Fig27A). Dal grafico infatti non si notano differenze statisticamente significative nell'assorbanza del colorante tra le hMSC indotte al differenziamento osteogenico e l'aggiunta di AVP a tempi diversi e OS (Fig27B).



**Fig27 Colorazione con Alizarin Red S (A) e quantizzazione (B) a 28gg in seguito al trattamento con VPM 1mM.** 0gg indica che VPM è stata aggiunta contemporaneamente al terreno di differenziamento osteogenico ed è presente per tutta la durata del trattamento. 3gg, 7gg, 10gg, 14gg e 21gg indicano che VPM è stata aggiunta rispettivamente dopo 3-7-10-14-21 giorni dall'induzione con il terreno di differenziamento ed è presente fino alla fine del trattamento differenziativo. La linea tratteggiata corrisponde alla media degli OD osservati in OS. La significatività è stata valutata confrontando gli OD ottenuti a 28gg con i diversi trattamenti, rispetto all'OD dell'OS mediante il Dunnett's Multiple Comparison Test (\*  $p < 0.01$ ; +  $p < 0.05$  VS OS).

## 7.3 HIBISCUS SABDARIFFA

L'effetto anti-osteogenico di HIB 5mg/ml si osserva sia quando questa sostanza viene aggiunta al tempo 0gg ma anche quando viene aggiunta dopo 3, 7, 10 e 14 giorni dal momento dell'induzione con il terreno osteogenico. Infatti non si vede il deposito di matrice mineralizzata (Fig28 A) e la quantizzazione risulta significativamente minore rispetto all'OS. Tale effetto inibitorio non si verifica se invece la sostanza viene aggiunta dopo 21gg di differenziamento (Fig28 B).



**Fig28** Colorazione con Alizarin Red S (A) e quantizzazione (B) a 28gg in seguito al trattamento con HIB 5mg/ml. 0gg indica che HIB è stata aggiunta contemporaneamente al terreno di differenziamento osteogenico ed è presente per tutta la durata del trattamento. 3gg, 7gg, 10gg, 14gg e 21gg indicano che HIB è stata aggiunta rispettivamente dopo 3-7-10-14-21 giorni dall'induzione con il terreno di differenziamento ed è presente fino alla fine del trattamento differenziativo. La linea tratteggiata corrisponde alla media degli OD osservati in OS. La significatività è stata valutata confrontando gli OD ottenuti a 28gg con i diversi trattamenti, rispetto all'OD dell'OS mediante il Dunnett's Multiple Comparison Test (\* p < 0.01; + p < 0.05 VS OS).

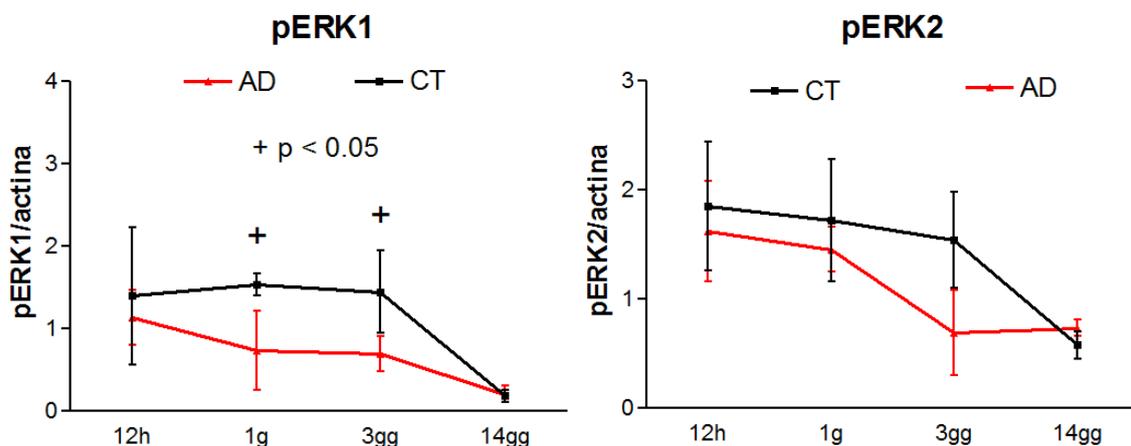
## 8. STUDIO DEL LIVELLO DI FOSFORILAZIONE DI ERK1/2

Al fine di valutare il ruolo di ERK1/2 nel differenziamento adipogenico e osteogenico, è stato analizzato a tempi diversi lo stato di fosforilazione di ERK1/2, cioè la forma attiva delle due chinasi, nel corso dei due tipi di differenziamento.

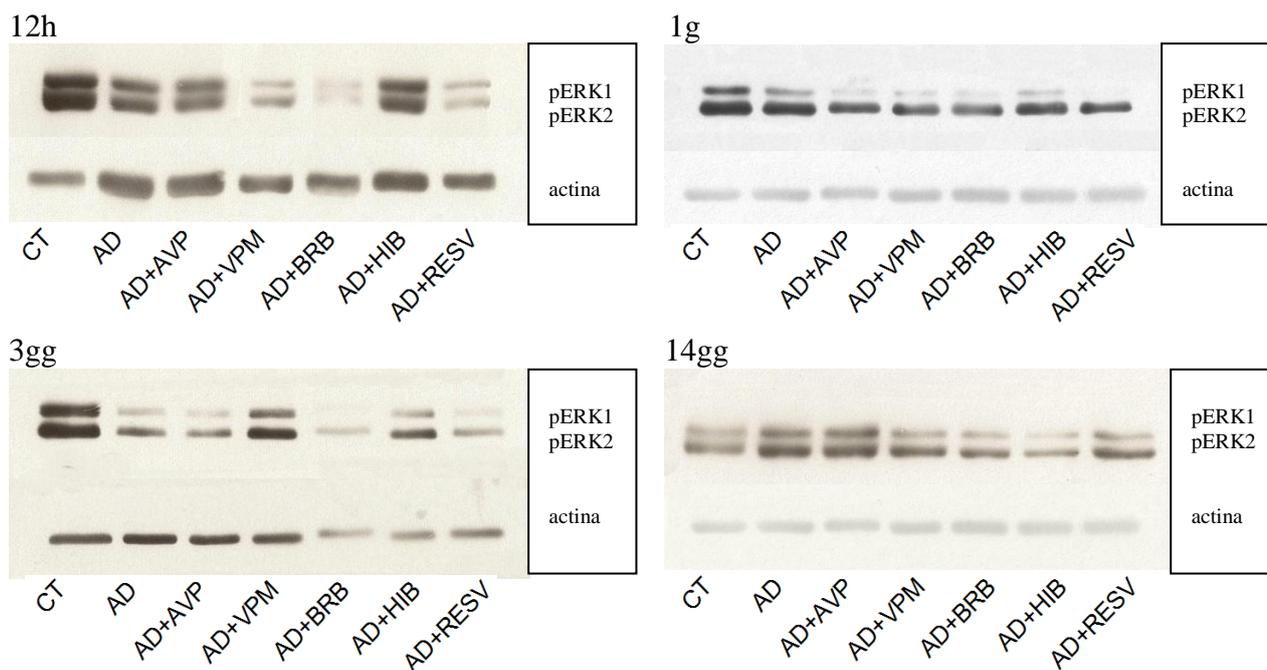
### 8. 1. DIFFERENZIAMENTO ADIPOGENICO

Le hMSC sono state trattate con il mezzo di differenziamento adipogenico in assenza (AD) o presenza di AVP 5mM, VPM 1mM, BRB 4 $\mu$ M, HIB 5mg/ml o RESV 10 $\mu$ M. Le cellule di controllo sono state coltivate in terreno DMEM-HG (CT). Dopo 12h, 1g, 3gg e 14gg dall'induzione sono stati preparati estratti proteici totali ed analizzati mediante immunoblotting utilizzando un anticorpo che riconosce in modo specifico le forme fosforilate e quindi attivate sia di ERK1 che di ERK2 (pERK1 e pERK2). Tali tempi sono stati scelti sulla base dei risultati ottenuti in un precedente lavoro effettuato presso il nostro laboratorio (*Donzelli et al., 2011*) in cui è stato dimostrato il ruolo di ERK1 ed ERK2 nel differenziamento adipogenico. Su ciascun filtro è stato effettuato un immunoblotting anti-actina che consente di confermare che sia stata caricata una confrontabile quantità di estratto proteico per ciascun campione.

Dall'immunoblotting (Fig30) si conferma quanto precedentemente dimostrato (*Donzelli et al., 2011*) e cioè che tra le cellule di controllo (CT) e le cellule trattate per il differenziamento adipogenico (AD) esiste una differente modulazione della fosforilazione sia di ERK1 che di ERK2. Dall'analisi quantitativa degli immunoblotting si può vedere sia ad 1g che a 3gg una riduzione significativa della forma fosforilata di ERK1/2 nelle cellule trattate per il differenziamento adipogenico (AD) rispetto alle cellule di controllo (CT) (Fig29).

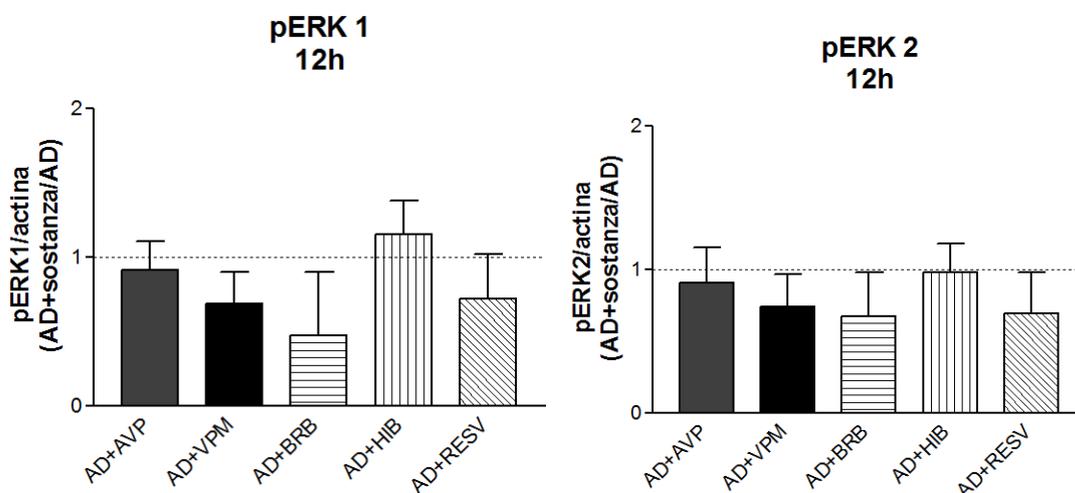


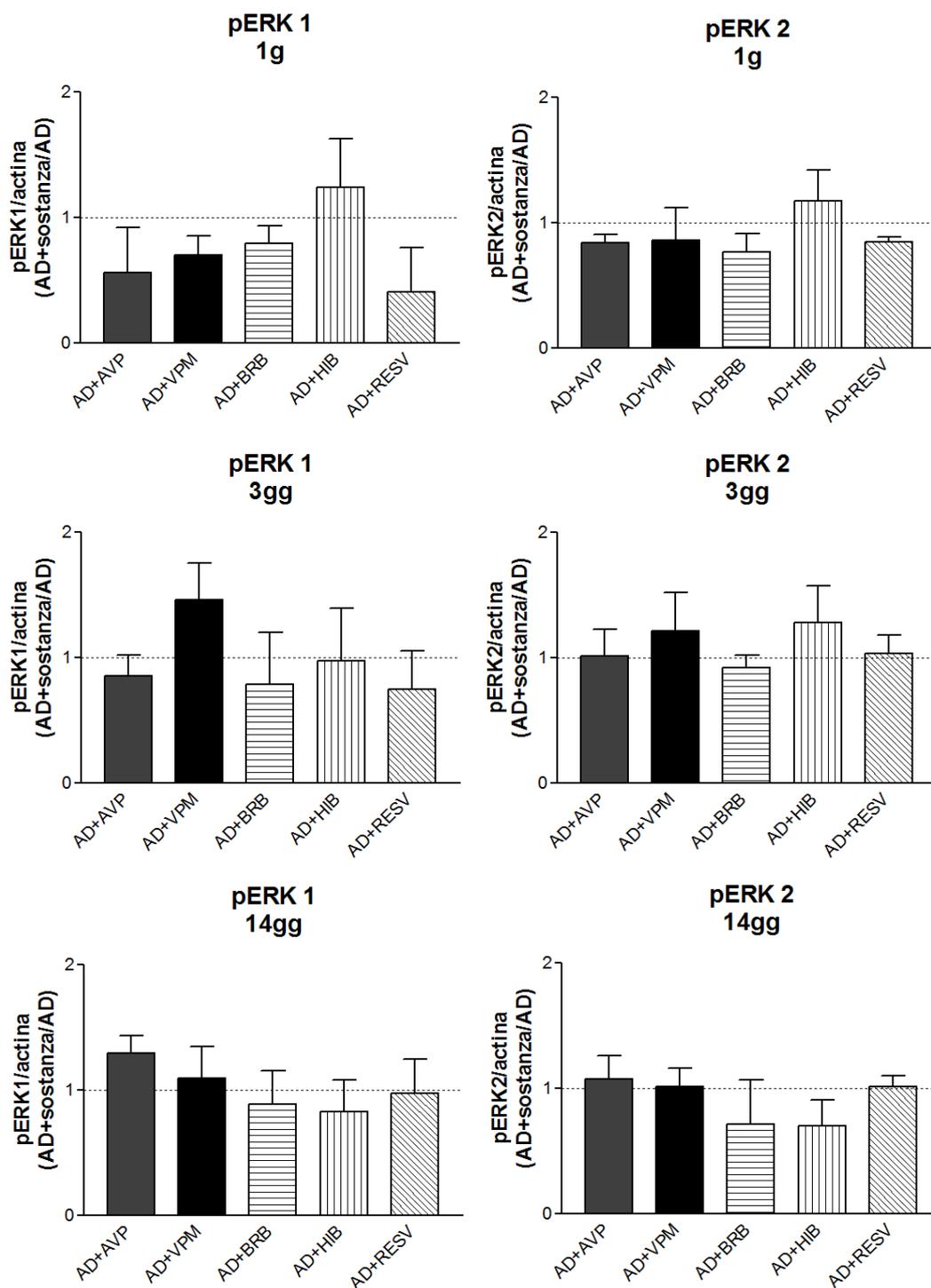
**Fig29** Analisi quantitativa di pERK1 e pERK2 a 12h, 1g, 3gg e 14gg. . Il controllo (CT) è rappresentato da cellule trattate con terreno di coltura DMEM-LG mentre l'AD corrisponde alle hMSC indotte con il terreno adipogenico. L'analisi statistica è stata valutata con il test t di Student per CT-AD (+ p < 0.05). I dati ottenuti in 3 esperimenti indipendenti sono stati normalizzati con l'actina ed espressi sotto forma di media  $\pm$  deviazione standard.



**Fig30 Immunoblotting di pERK1/2.** La fosforilazione di ERK1(pERK1) ed ERK2 (pERK2) è stata valutata a 3gg, 7gg, 10gg e 14gg in cellule di controllo (CT), trattate con terreno adipogenico (AD), con terreno adipogenico e l'aggiunta di AVP5mM (AD+AVP), VPM 1mM (AD+VPM), BRB 4 $\mu$ M (AD+BRB), HIB5mg/ml (AD+HIB) e RESV 10 $\mu$ M (AD+RESV). L'actina è stata utilizzata come controllo di caricamento. Le immagini riportate sono rappresentative di un esperimento che è stato ripetuto tre volte con cellule di tre donatori diversi.

Dai dati ottenuti con l'analisi quantitativa degli immunoblotting si dimostra che, per tutti i tempi analizzati (12h, 1g, 3gg e 14gg) non si osservano variazioni significative di pERK1 e pERK2 tra le cellule indotte al differenziamento adipogenico e l'aggiunta delle diverse sostanze (AD+AVP, AD+VPM, AD+BRB, AD+HIB e AD+RESV) e l'AD (Fig31).



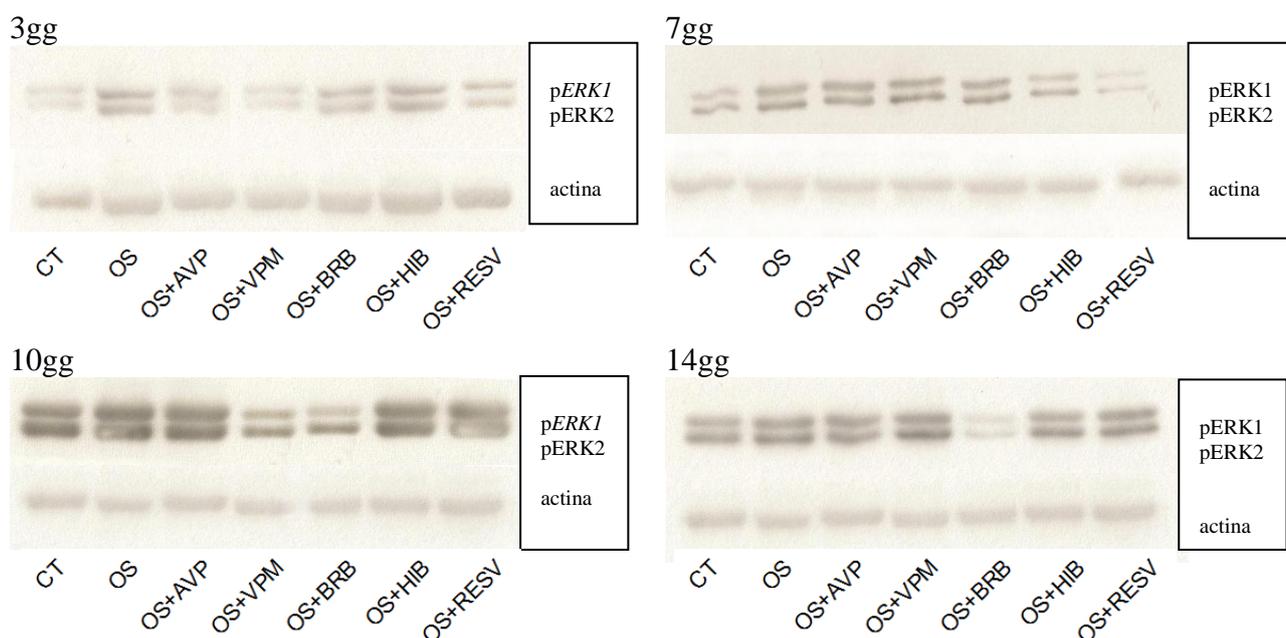


**Fig31 Analisi quantitativa di pERK1 e pERK2.** La fosforilazione di ERK1 ed ERK2 a 12h, 1g, 3gg e 14gg di induzione al differenziamento adipogenico è stata quantizzata mediante analisi densitometrica. I dati ottenuti in 3 esperimenti indipendenti sono stati normalizzati con l'actina ed espressi sotto forma di media  $\pm$  deviazione standard. La linea tratteggiata corrisponde ai valori di fosforilazione osservati in AD. La significatività è stata valutata confrontando per ciascun tempo i valori ottenuti rispetto all'AD mediante il Dunnett's Multiple Comparison Test (\*  $p < 0.01$ ; +  $p < 0.05$  vs AD).

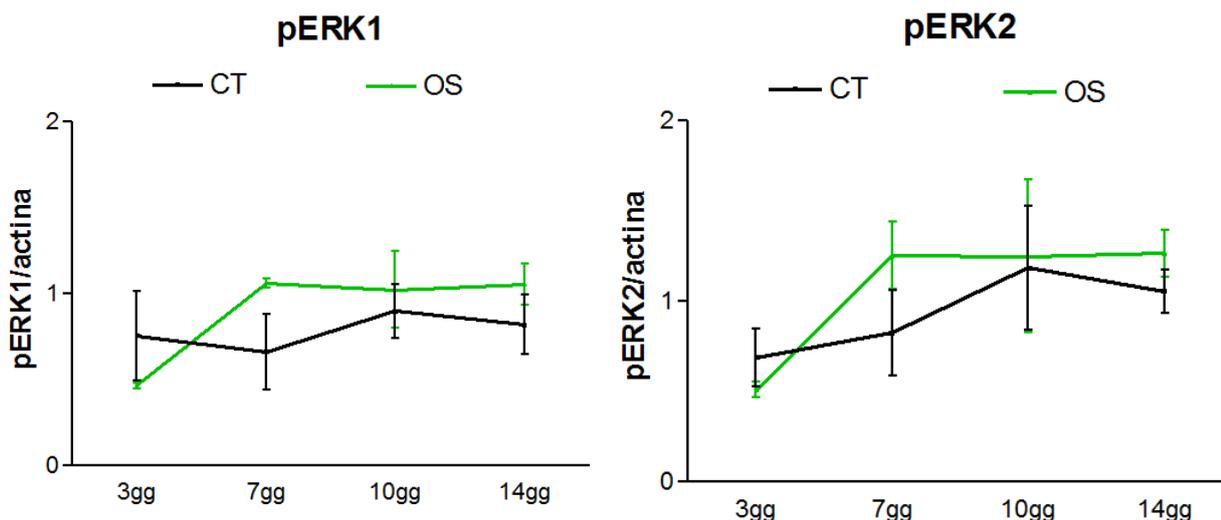
## 8. 2 DIFFERENZIAMENTO OSTEOGENICO

Le hMSC sono state trattate con il mezzo di differenziamento osteogenico in assenza (OS) o presenza di AVP 5mM (OS+AVP), VPM 1mM (OS+VPM), BRB 4 $\mu$ M (OS+BRB), HIB 5mg/ml (OS+BRB) o RESV 10 $\mu$ M (OS+RESV). Le cellule di controllo sono state coltivate in terreno DMEM-HG (CT). Dopo 3gg, 7gg, 10gg e 14gg dall'induzione sono stati preparati estratti proteici totali ed analizzati mediante immunoblotting utilizzando un anticorpo che riconosce in modo specifico le forme fosforilate e quindi attivate sia di ERK1 che di ERK2 (pERK1 e pERK2). Su ciascun filtro è stato effettuato un immunoblotting anti-actina che consente di confermare che sia stata caricata una confrontabile quantità di estratto proteico per ciascun campione.

Dall'immunoblotting (Fig32) si osserva che tra le cellule di controllo (CT) e le cellule trattate per il differenziamento osteogenico (OS) esiste una differente modulazione della fosforilazione sia di ERK1 che di ERK2. Dall'analisi quantitativa degli immunoblotting si può vedere a 7gg, 10gg e 14gg un aumento della forma fosforilata di ERK1/2 nelle cellule trattate per il differenziamento osteogenico (OS) rispetto alle cellule di controllo (CT) (Fig33).

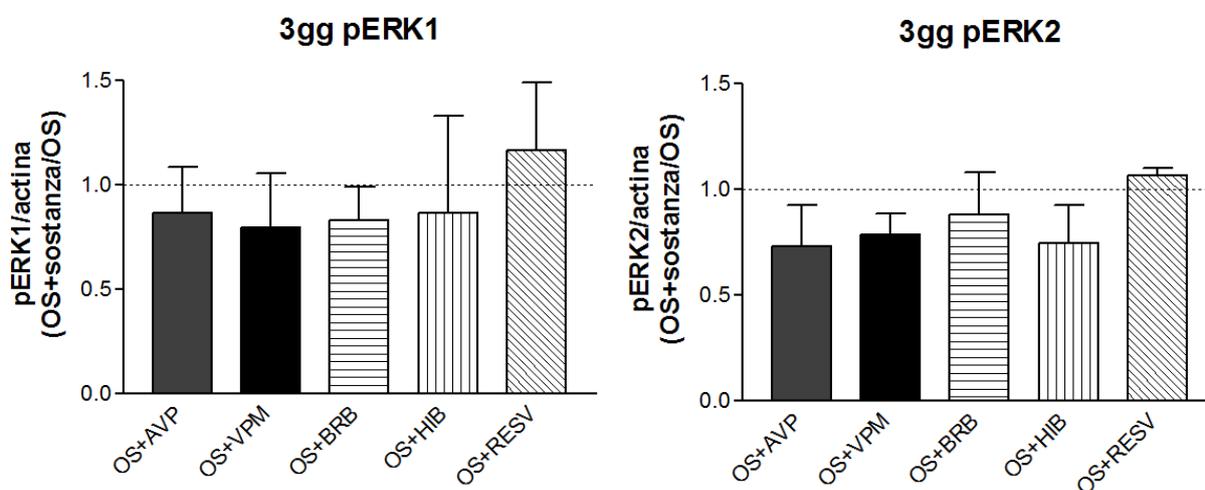


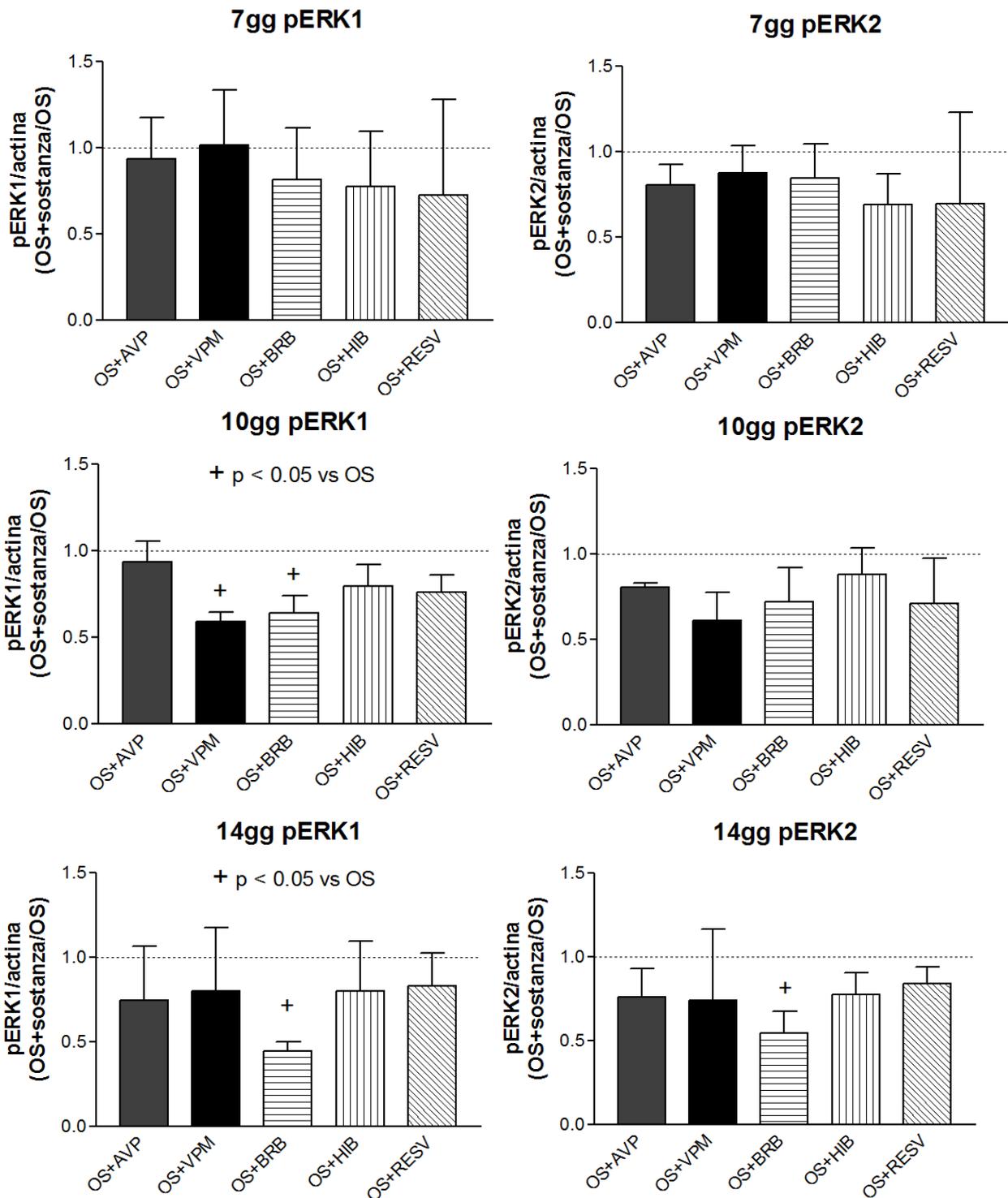
**Fig32 Immunoblotting di pERK1/2.** La fosforilazione di ERK1(pERK1) ed ERK2 (pERK2) è stata valutata a 3gg, 7gg, 10gg e 14gg in cellule di controllo (CT), trattate con OS medium (OS), con OS medium con aggiunta di AVP5mM (OS+AVP), VPM 1mM (OS+VPM), BRB 4 $\mu$ M (OS+BRB), HIB5mg/ml (OS+HIB) e RESV 10 $\mu$ M (OS+RESV). L'actina è stata utilizzata come controllo di caricamento. Le immagini riportate sono rappresentative di un esperimento che è stato ripetuto tre volte con cellule di tre donatori diversi.



**Fig33 Analisi quantitativa di pERK1 e pERK2 a 3gg, 7gg, 10gg e 14gg.** . Il controllo (CT) è rappresentato da cellule trattate con terreno di coltura DMEM-LG mentre l'OS corrisponde alle hMSC indotte con il terreno osteogenico. L'analisi statistica è stata valutata con il test t di Student per CT-OS (\*  $p < 0.01$ , +  $p < 0.05$ ). I dati ottenuti in 3 esperimenti indipendenti sono stati normalizzati con l'actina ed espressi sotto forma di media  $\pm$  deviazione standard.

Dai dati ottenuti con l'analisi quantitativa degli immunoblotting si osserva che a 3gg e a 7gg di trattamento, la forma fosforilata di ERK1/2 nelle cellule trattate con AVP 5mM, VPM 1mM, BRB 4 $\mu$ M, HIB 5mg/ml e RESV 10 $\mu$ M non varia rispetto alle cellule trattate con solo il terreno osteogenico. Dopo 10gg le cellule trattate con OS+VPM e OS+BRB hanno una riduzione significativa della forma fosforilata di ERK1 rispetto alle cellule trattate con solo terreno osteogenico mentre la forma fosforilata di pERK2 non varia. A 14gg solo le cellule trattate con OS+BRB presentano una riduzione significativa di entrambe le forme pERK1/2 rispetto alle cellule trattate con solo terreno di induzione osteogenico (Fig34).





**Fig34 Analisi quantitativa di pERK1 e pERK2.** La fosforilazione di ERK1 ed ERK2 a 3gg, 7gg, 10gg e 14gg di induzione al differenziamento osteogenico è stata quantizzata mediante analisi densitometrica. I dati ottenuti in 3 esperimenti indipendenti sono stati normalizzati con l'actina ed espressi sotto forma di media  $\pm$  deviazione standard. La linea tratteggiata corrisponde ai valori di fosforilazione osservati in OS. La significatività è stata valutata confrontando per ciascun tempo i valori ottenuti rispetto all'OS mediante il Dunnett's Multiple Comparison Test (\* p < 0.01; + p < 0.05 vs OS).

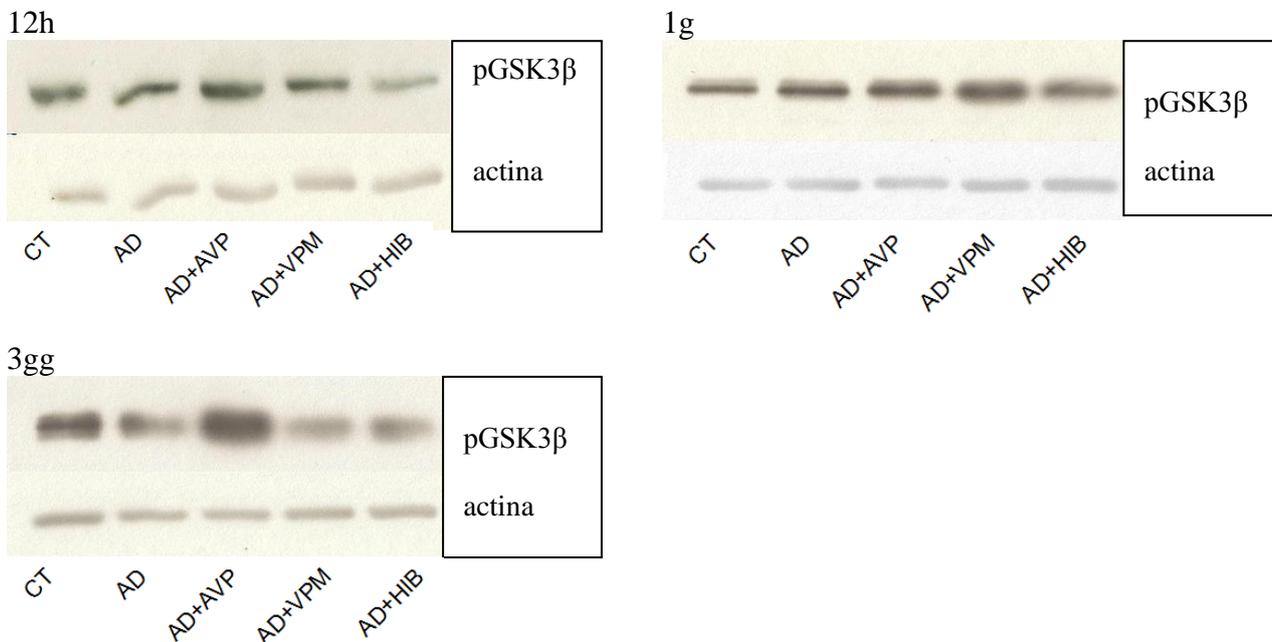
## 9. STUDIO DEL LIVELLO DI FOSFORILAZIONE DI GSK-3 $\beta$

Un pathway fondamentale risulta esser il pathway di Wnt (Kato et al., 2007) che promuove l'osteogenesi ed inibisce l'adipogenesi. Infatti attivando la cascata di Wnt, si ha l'inibizione di GSK3 $\beta$  tramite fosforilazione e questo porta ad un aumento nel citoplasma di  $\beta$ catenina. La  $\beta$ catenina stabilizzata, trasloca nel nucleo e va ad attivare fattori trascrizionali importanti per il differenziamento osteogenico.

Le sostanze testate sono AVP 5mM, VPM 1mM e HIB 5mg/ml perchè risultate le più interessanti.

### 9. 1. DIFFERENZIAMENTO ADIPOGENICO

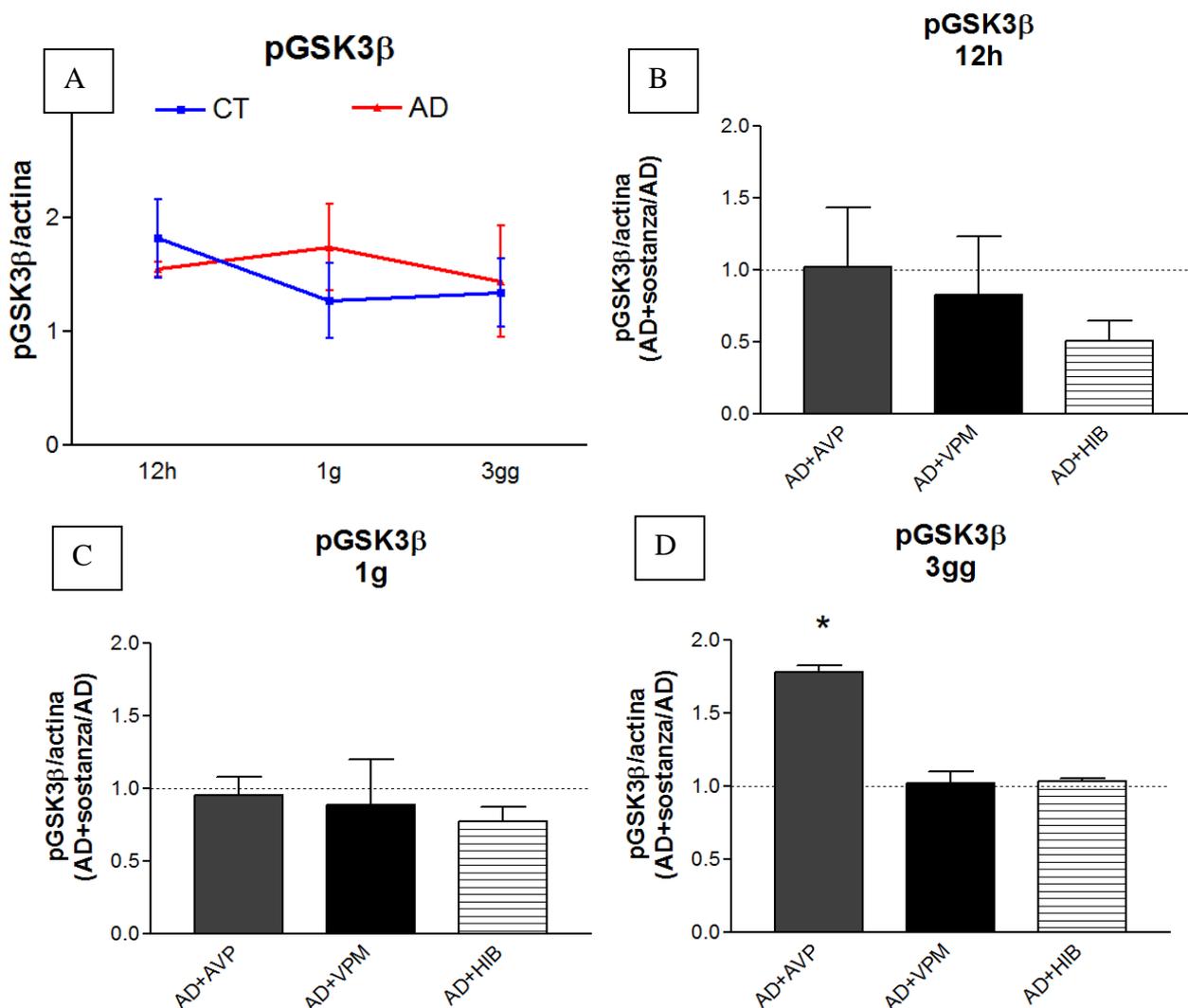
Le hMSC sono state trattate con il mezzo di differenziamento adipogenico in assenza (AD) o presenza di AVP 5mM (AD+AVP), VPM 1mM (AD+VPM) o HIB 5mg/ml (AD+HIB). Le cellule di controllo sono state coltivate in terreno DMEM-HG (CT). Dopo 12h, 1g e 3gg dall'induzione sono stati preparati estratti proteici totali ed analizzati mediante immunoblotting utilizzando un anticorpo che riconosce in modo specifico la forma fosforilata di GSK3 $\beta$ , che corrisponde alla forma inattiva. Su ciascun filtro è stato effettuato un immunoblotting anti-actina che consente di valutare se sia stata caricata una confrontabile quantità di estratto proteico per ciascun campione (Fig35).



**Fig35 Immunoblotting di pGSK3 $\beta$ .** La fosforilazione di GSK3 $\beta$  è stata valutata a 12h, 1g e 3gg, in cellule di controllo (CT), trattate con mezzo adipogenico (AD), AD con aggiunta di AVP5mM (AD+AVP), VPM 1mM (AD+VPM) e HIB 5mg/ml (AD+HIB). L'actina è stata utilizzata come controllo di caricamento. Le immagini riportate sono rappresentative di un esperimento che è stato ripetuto due volte con hMSC differenti.

Dai dati ottenuti con l'analisi quantitativa degli immunoblotting si osserva che tra le cellule trattate con il terreno DMEM-HG (CT) e le cellule trattate con il terreno di induzione adipogenico (AD), non si osservano variazioni significative nella fosforilazione di GSK3 $\beta$  in tutti i tempi analizzati (12h, 1g e 3gg) (Fig35, Fig36).

A 12h e 1g non si osservano variazioni significative della forma fosforilata di GSK3 $\beta$  tra hMSC trattate per il differenziamento adipogenico (AD) e le hMSC indotte al differenziamento con l'aggiunta delle sostanze AVP, VPM e HIB. A 3gg di trattamento si osserva un aumento significativo della forma fosforilata di GSK3 $\beta$  nelle cellule trattate con AD+AVP rispetto alle cellule indotte con solo il terreno di induzione (AD) (Fig36).



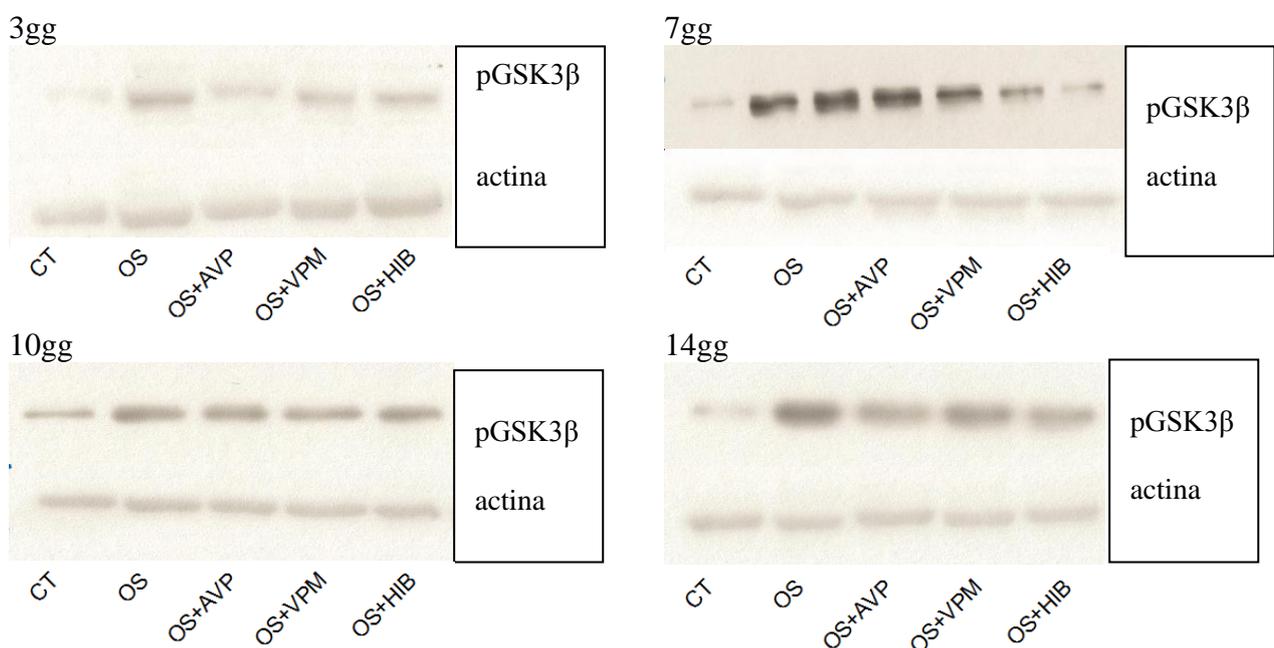
**Fig36 Analisi quantitativa di pGSK3 $\beta$ .** La fosforilazione di GSK3 $\beta$  a 12h, 1g e 3gg di induzione al differenziamento adipogenico è stata quantizzata mediante analisi densitometrica. I dati ottenuti in 2 esperimenti indipendenti sono stati normalizzati con l'actina ed espressi sotto forma di media  $\pm$  deviazione standard. La linea tratteggiata corrisponde ai valori di fosforilazione osservati in AD. La significatività è stata valutata (A) con il test t di Student per CT-AD (\*  $p < 0.01$ , +  $p < 0.05$ ), (B-C-D) confrontando per ciascun tempo i valori ottenuti rispetto all'AD mediante il Dunnett's Multiple Comparison Test (\*  $p < 0.01$ ; +  $p < 0.05$  vs AD).

## 9. 2. DIFFERENZIAMENTO OSTEOGENICO

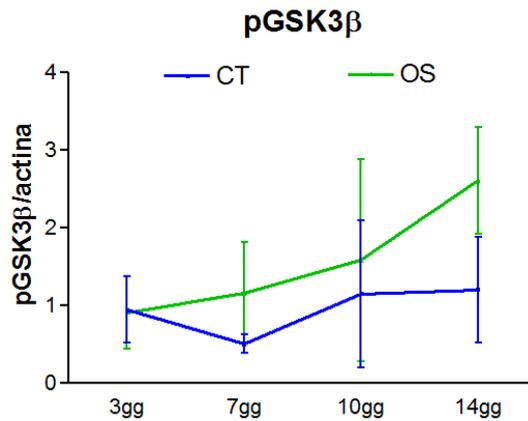
Le hMSC sono state trattate con il mezzo di differenziamento osteogenico in assenza (OS) o presenza di AVP 5mM (OS+AVP), VPM 1mM (OS+VPM) o HIB 5mg/ml (OS+BRB). Le cellule di controllo sono state coltivate in terreno DMEM-LG (CT). Dopo 3gg, 7gg, 10gg e 14gg dall'induzione sono stati preparati estratti proteici totali ed analizzati mediante immunoblotting utilizzando un anticorpo che riconosce in modo specifico la forma fosforilata di GSK3 $\beta$ , che corrisponde alla forma inattiva. Su ciascun filtro è stato effettuato un immunoblotting anti-actina che consente di valutare se sia stata caricata una confrontabile quantità di estratto proteico per ciascun campione (Fig37).

I risultati da noi ottenuti mostrano un aumento non significativo della forma fosforilata di GSK3 $\beta$  nelle hMSC indotte al differenziamento osteogenico (OS) rispetto alle hMSC in terreno DMEM-LG (CT) a 7gg, 10gg e 14gg di trattamento (Fig38).

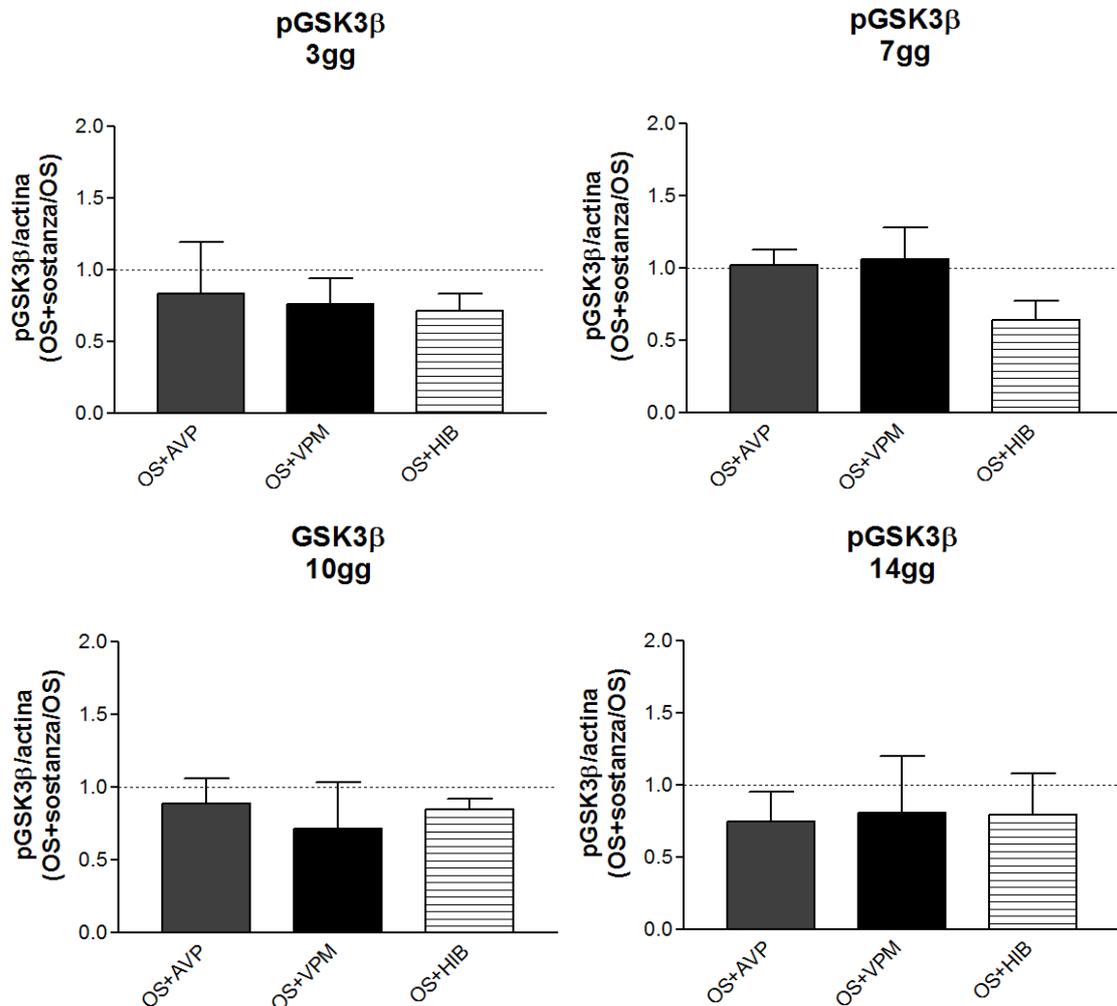
In tutti i tempi analizzati non abbiamo osservato differenze statisticamente significative nella forma fosforilata di GSK3 $\beta$  tra le hMSC indotte al differenziamento osteogenico (OS) e le hMSC trattate per il differenziamento e l'aggiunta delle tre sostanze, OS+AVP, OS+VPM e OS+HIB (Fig39).



**Fig37 Immunoblotting di pGSK3 $\beta$ .** La fosforilazione di GSK3 $\beta$  è stata valutata a 3gg, 7gg, 10gg e 14gg in cellule di controllo (CT), trattate con mezzo osteogenico (OS), OS con aggiunta di AVP5mM (OS+AVP), VPM 1mM (OS+VPM) e HIB 5mg/ml (OS+HIB). L'actina è stata utilizzata come controllo di caricamento. Le immagini riportate sono rappresentative di un esperimento che è stato ripetuto due volte con hMSC differenti.



**Fig38** Analisi quantitativa della forma fosforilata di GSK3β a 3gg, 7gg, 10gg e 14gg. . Il controllo (CT) è rappresentato da cellule trattate con terreno di coltura DMEM-LG mentre l'OS corrisponde alle hMSC indotte con il terreno osteogenico. L'analisi statistica è stata valutata con il test t di Student per CT-OS (\* p < 0.01, + p < 0.05). I dati ottenuti in 2 esperimenti indipendenti sono stati normalizzati con l'actina ed espressi sotto forma di media ± deviazione standard.

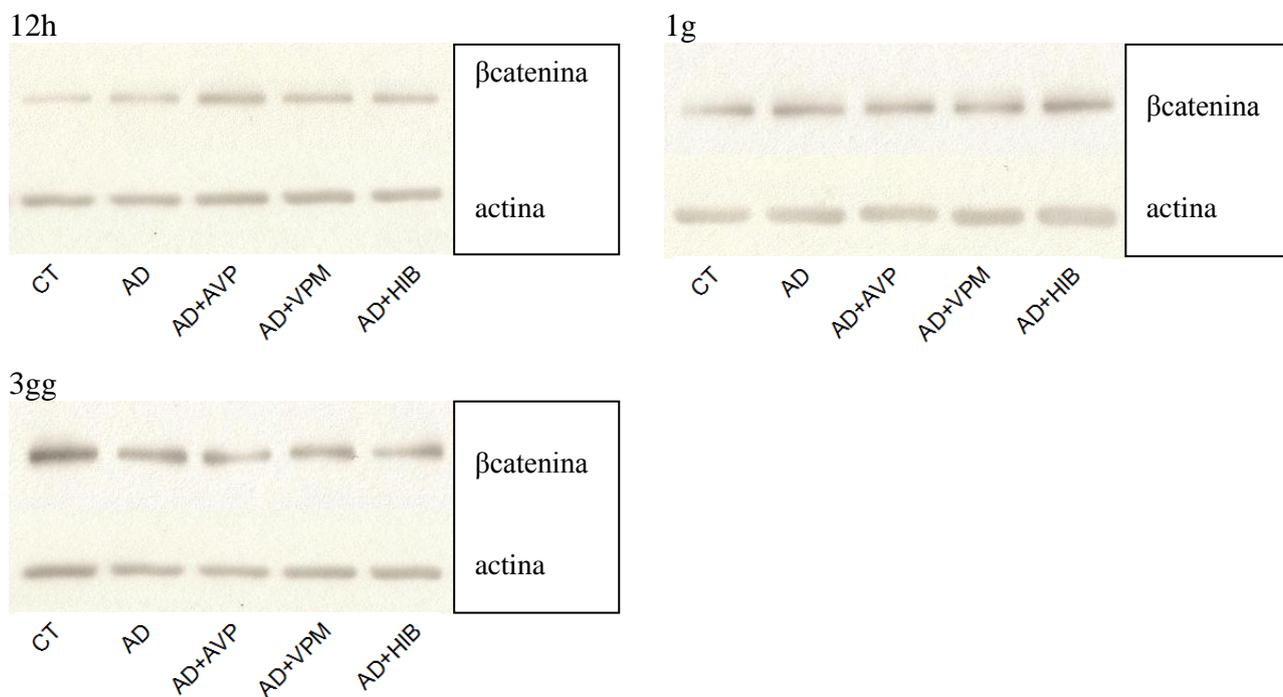


**Fig39** Analisi quantitativa di pGSK3β. La fosforilazione di GSK3β a 3gg, 7gg, 10gg e 14gg di induzione al differenziamento osteogenico è stata quantizzata mediante analisi densitometrica. I dati ottenuti in 2 esperimenti indipendenti sono stati normalizzati con l'actina ed espressi sotto forma di media ± deviazione standard. La linea tratteggiata corrisponde ai valori di fosforilazione osservati in OS. La significatività è stata valutata confrontando per ciascun tempo i valori ottenuti rispetto all'OS mediante il Dunnett's Multiple Comparison Test (\* p < 0.01; + p < 0.05 vs OS).

## 10. STUDIO DEL LIVELLO DI ESPRESSIONE DI $\beta$ -CATENINA

### 10. 1 DIFFERENZIAMENTO ADIPOGENICO

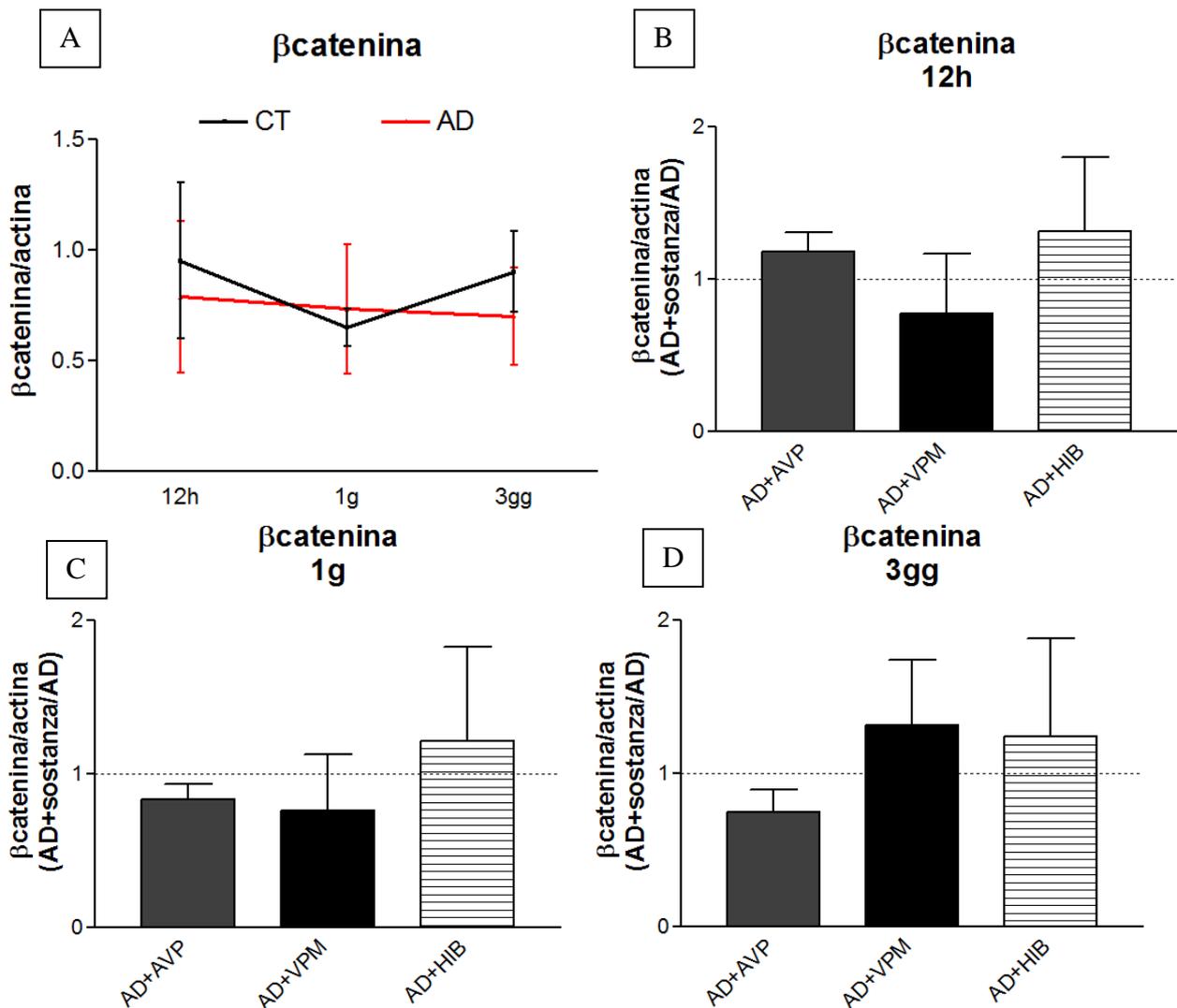
Le hMSC indirizzate verso il differenziamento adipogenico sono state coltivate con terreno adipogenico in assenza (AD) o presenza di AVP 5mM (AD+AVP), VPM 1mM (AD+VPM) e HIB 5mg/ml (AD+HIB). Le cellule di controllo sono state coltivate in terreno DMEM-HG (CT). L'analisi è stata effettuata dopo 12h, 1g, 3gg dall'induzione. Sono stati preparati estratti proteici totali analizzati mediante immunoblotting per valutare la quantità di  $\beta$ catenina presente nelle cellule ai tempi prestabiliti. Su ciascun filtro è stato effettuato un immunoblotting anti-actina che consente di valutare se è stata caricata una confrontabile quantità di estratto proteico per ciascun campione (Fig40).



**Fig40 Immunoblotting di  $\beta$ catenina.**  $\beta$ catenina è stata valutata a 12 h, 1 g e 3gg, in cellule di controllo (CT), trattate con mezzo adipogenico (AD), AD con aggiunta di AVP5mM (AD+AVP), VPM 1mM (AD+VPM) e HIB5mg/ml (AD+HIB). L'actina è stata utilizzata come controllo di caricamento. Le immagini riportate sono rappresentative di un esperimento che è stato ripetuto due volte con hMSC differenti.

I risultati da noi ottenuti mostrano che, in tutti i tempi analizzati, tra le cellule trattate con il terreno DMEM-HG (CT) e le cellule trattate con il terreno di induzione adipogenico (AD), non si osservano variazioni significative della quantità di  $\beta$ catenina (Fig41A).

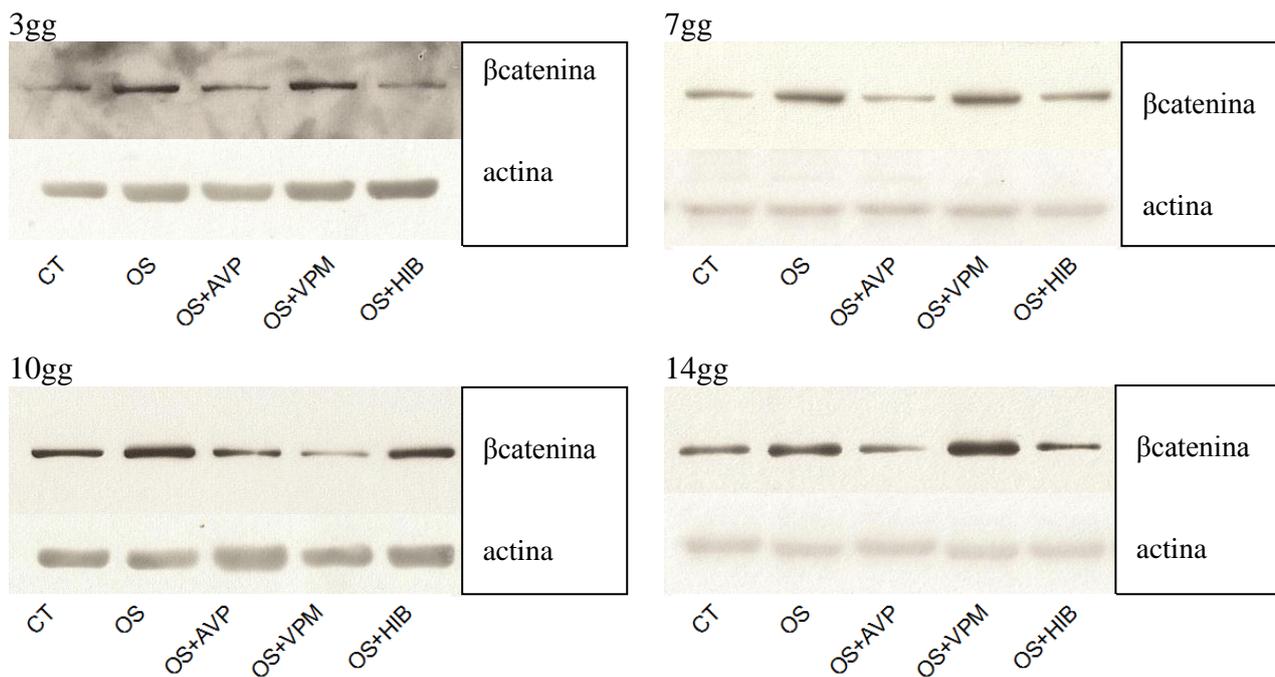
In tutti i tempi analizzati non abbiamo osservato differenze di  $\beta$ catenina tra le hMSC indotte al differenziamento adipogenico e le hMSC trattate per il differenziamento e l'aggiunta delle tre sostanze (Fig41B,C,D).



**Fig41 Analisi quantitativa di  $\beta$ catenina.**  $\beta$ catenina è stata valutata a 12h, 1g e 3gg, in cellule di controllo (CT), trattate con mezzo adipogenico (AD), AD con aggiunta di AVP5mM (AD+AVP), VPM 1mM (AD+VPM) e HIB5mg/ml (AD+HIB).  $\beta$ catenina è stata quantizzata mediante analisi densitometrica. I dati ottenuti in 2 esperimenti indipendenti sono stati normalizzati con l'actina ed espressi sotto forma di media  $\pm$  deviazione standard. La linea tratteggiata corrisponde ai valori di espressione osservati in AD. La significatività è stata valutata (A) con il test t di Student per CT-AD (\*  $p < 0.01$ , +  $p < 0.05$ ), (B-C-D) confrontando per ciascun tempo i valori ottenuti rispetto all'AD mediante il Dunnett's Multiple Comparison Test (\*  $p < 0.01$ ; +  $p < 0.05$  vs AD).

## 10. 2 DIFFERENZIAMENTO OSTEOGENICO

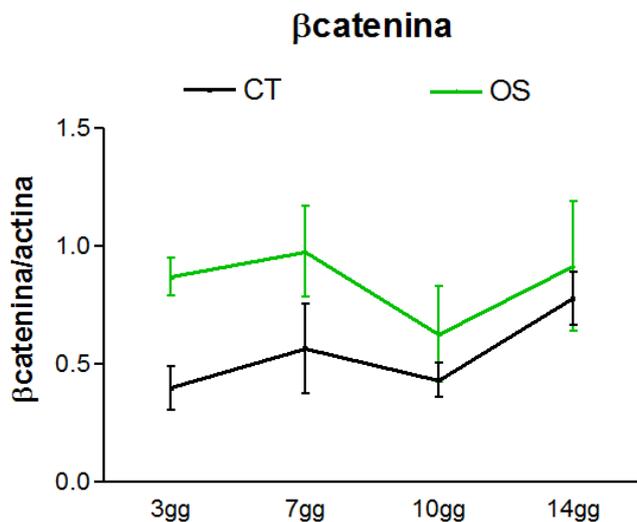
Le hMSC indirizzate verso il differenziamento osteogenico sono state coltivate con terreno osteogenico in assenza (OS) o presenza di AVP 5mM (OS+AVP), VPM 1mM (OS+VPM) e HIB 5mg/ml (OS+HIB). Le cellule di controllo sono state coltivate in terreno DMEM-LG (CT). L'analisi è stata effettuata dopo 3gg, 7gg, 10gg e 14gg dall'induzione. Sono stati preparati estratti proteici totali analizzati mediante immunoblotting per valutare la quantità di  $\beta$ catenina presente nelle cellule ai tempi prestabiliti. Su ciascun filtro è stato effettuato un immunoblotting anti-actina che consente di valutare se è stata caricata una confrontabile quantità di estratto proteico per ciascun campione (Fig42).



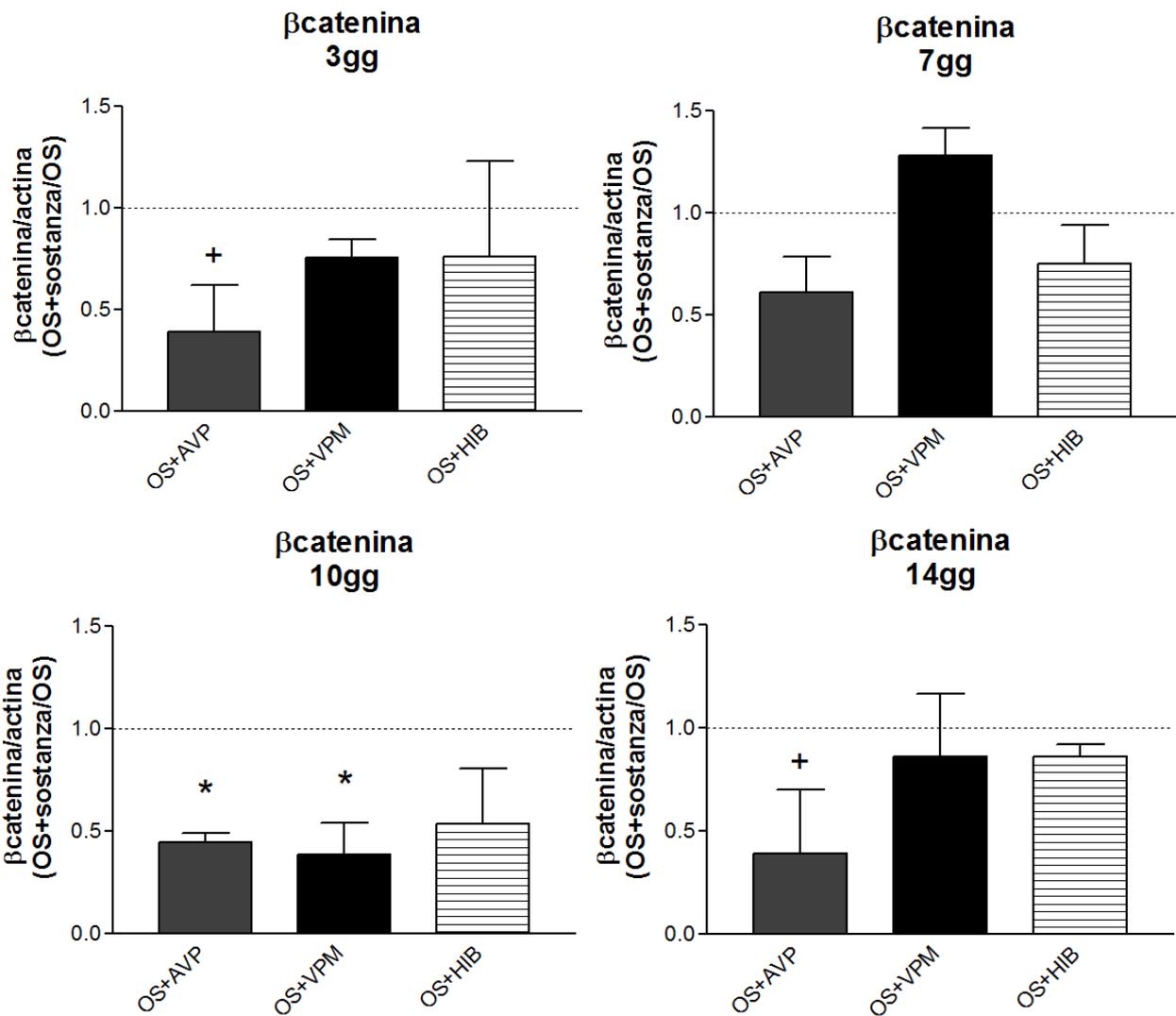
**Fig42 Immunoblotting di βcatenina.** βcatenina è stata valutata a 3gg, 7gg, 10gg e 14gg in cellule di controllo (CT), trattate con mezzo osteogenico (OS), OS con aggiunta di AVP5mM (OS+AVP), VPM 1mM (OS+VPM) e HIB5mg/ml (OS+HIB). L'actina è stata utilizzata come controllo di caricamento. Le immagini riportate sono rappresentative di un esperimento che è stato ripetuto due volte con hMSC differenti.

I risultati da noi ottenuti mostrano che, in tutti i tempi analizzati, le hMSC trattate con il terreno di induzione osteogenico (OS) hanno un'espressione maggiore ma non significativa della proteina βcatenina rispetto alle hMSC trattate con terreno DMEM-LG (Fig43).

A 3gg, 10gg e 14gg si osserva una diminuzione significativa di βcatenina in hMSC trattate per il differenziamento osteogenico e l'aggiunta di AVP (OS+AVP) rispetto alle hMSC trattate con solo terreno osteogenico (OS). Solo a 10gg si osserva anche per le hMSC trattate con VPM1mM una riduzione significativa di βcatenina rispetto alle hMSC indotte al differenziamento osteogenico (Fig44).



**Fig43 Analisi quantitativa di βcatenina a 3gg, 7gg, 10gg e 14gg.** Il controllo (CT) è rappresentato da cellule trattate con terreno di coltura DMEM-LG mentre l'OS corrisponde alle hMSC indotte con il terreno osteogenico. L'analisi statistica è stata valutata con il test t di Student per CT-OS (\* p<0.01, + p<0.05). I dati ottenuti in 2 esperimenti indipendenti sono stati normalizzati con l'actina ed espressi sotto forma di media ± deviazione standard.



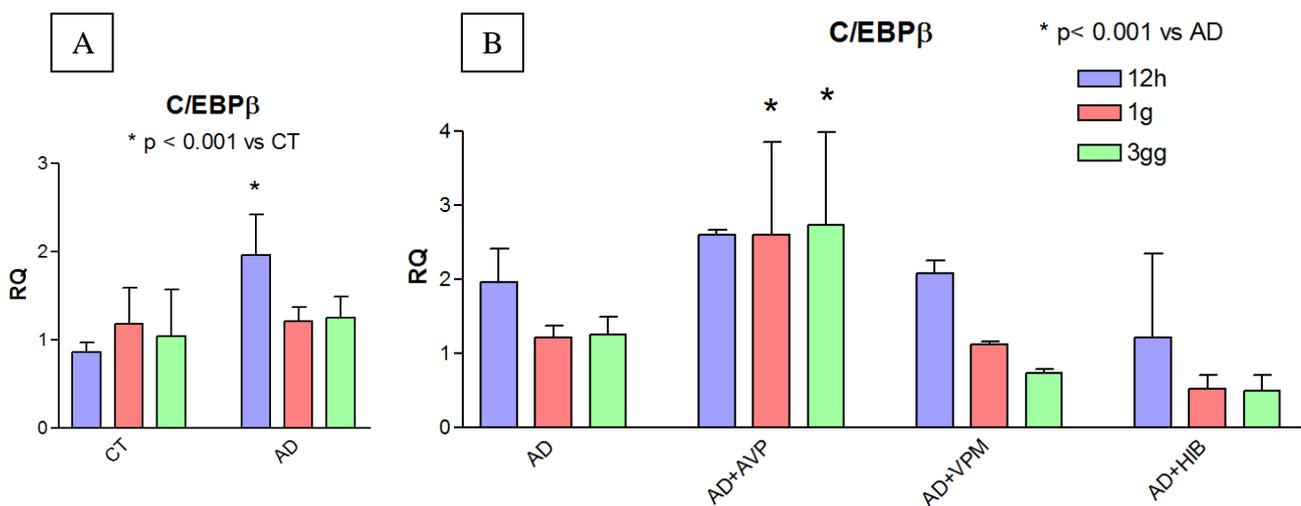
**Fig44 Analisi quantitativa di  $\beta$ catenina.**  $\beta$ catenina è stata valutata a 3gg, 7gg, 10gg e 14gg in cellule di controllo (CT), trattate con mezzo osteogenico (OS), OS con aggiunta di AVP5mM (OS+AVP), VPM 1mM (OS+VPM) e HIB5mg/ml (OS+HIB).  $\beta$ catenina è stata quantizzata mediante analisi densitometrica. I dati ottenuti in 2 esperimenti indipendenti sono stati normalizzati con l'actina ed espressi sotto forma di media  $\pm$  deviazione standard. La linea tratteggiata corrisponde ai valori di espressione osservati in AD. La significatività è stata valutata confrontando per ciascun tempo i valori ottenuti rispetto all'OS mediante il Dunnett's Multiple Comparison Test (\*  $p < 0.01$ ; +  $p < 0.05$  vs OS).

## 11. ANALISI qPCR - DIFFERENZIAMENTO ADIPOGENICO

È stato valutato l'effetto di AVP, VPM e HIB sull'espressione genica di C/EBP $\beta$ , PPAR $\gamma$ , RUNX2 e OSTERIX durante il differenziamento adipogenico di hMSC. A tal fine le hMSC sono state piastrate e trattate per tutto il tempo del differenziamento con terreno contenente i fattori adipogenici addizionato delle tre sostanze alle concentrazioni scelte in base agli esperimenti di citotossicità: AVP 5mM, VPM 1mM, HIB 5mg/ml.

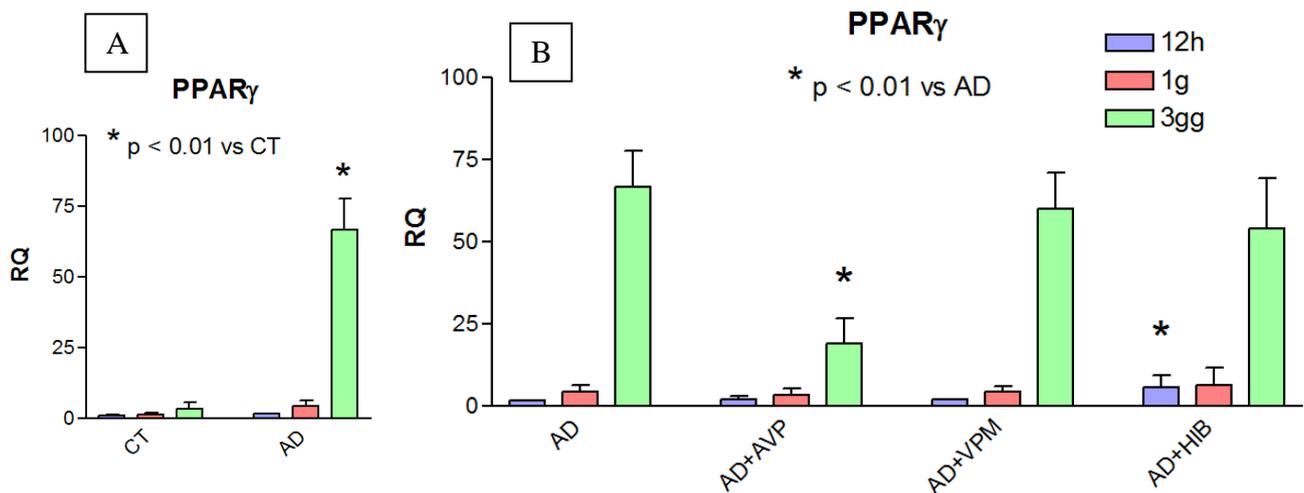
Ai tempi prestabiliti (12h, 1g e 3gg) sono stati preparati estratti di RNA totale e si è proceduto con la reazione di retrotrascrizione. Il cDNA dei diversi campioni è stato quindi analizzato mediante Real-Time PCR. I dati sono espressi sotto forma di media  $\pm$  deviazione standard calcolati sui valori degli RQ ottenuti in 2 esperimenti indipendenti. Il controllo (CT) è rappresentato da cellule trattate solo con terreno di coltura DMEM-HG mentre l'AD corrisponde alle hMSC indotte con solo il terreno di induzione adipogenico.

**CEBP $\beta$ :** A 12h le cellule AD hanno un aumento significativo dei livelli di espressione di C/EBP $\beta$  rispetto alle cellule CT (Fig45A). Dal grafico si osserva che le cellule trattate con mezzo adipogenico e AVP hanno un aumento significativo dei livelli di espressione di C/EBP $\beta$  rispetto all'AD sia ad 1g che a 3gg di trattamento. Per le cellule trattate con VPM e HIB non si osservano variazioni rispetto all'AD in tutti i tempi analizzati (Fig45B).



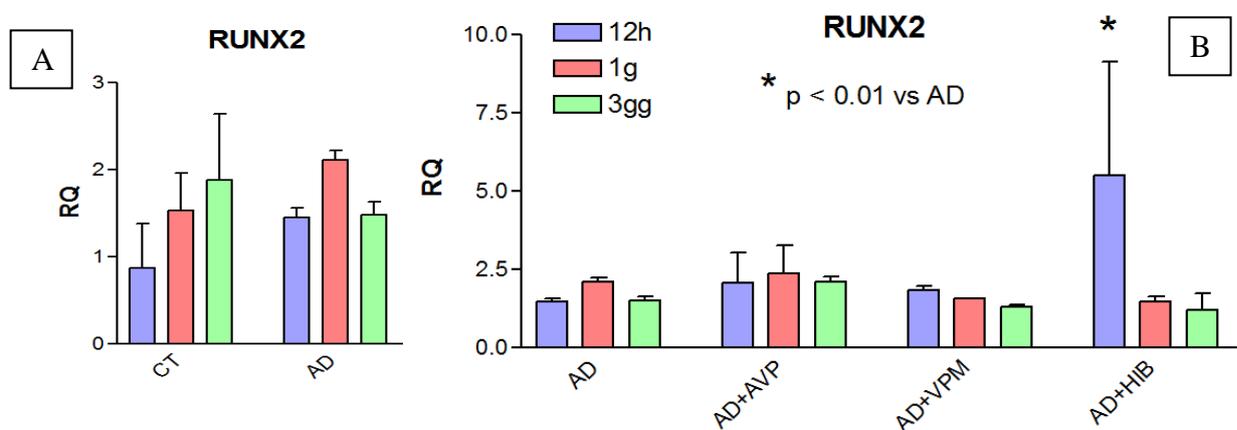
**Fig45 Analisi dell'espressione genica di C/EBP $\beta$ .** L'espressione genica di C/EBP $\beta$  è stata valutata mediante esperimenti di qPCR. La significatività è stata valutata (A) con il test t di Student per CT-AD (\*p<0.01, + p < 0.05), (B) confrontando per ciascun tempo i valori degli RQ ottenuti nelle cellule trattate AD+AVP, AD+VPM e AD+HIB rispetto all'RQ dell'AD (\* p < 0.01, + p < 0.05 VS AD). I dati sono espressi sotto forma di media  $\pm$  deviazione standard, calcolati sui valori ottenuti in 2 esperimenti indipendenti.

**PPAR $\gamma$** : I nostri risultati dimostrano che a 3 gg nell'AD si osserva un aumento significativo del livello di espressione di PPAR $\gamma$  rispetto al CT (Fig46A). L'indagine condotta analizzando i livelli di espressione di PPAR $\gamma$  evidenzia a 12h un aumento significativo nelle cellule trattate con AD+HIB rispetto all'AD. A 3gg i livelli di espressione di PPAR $\gamma$  diminuiscono in modo significativo nelle cellule trattate con AD+AVP rispetto all'AD (Fig46 B).



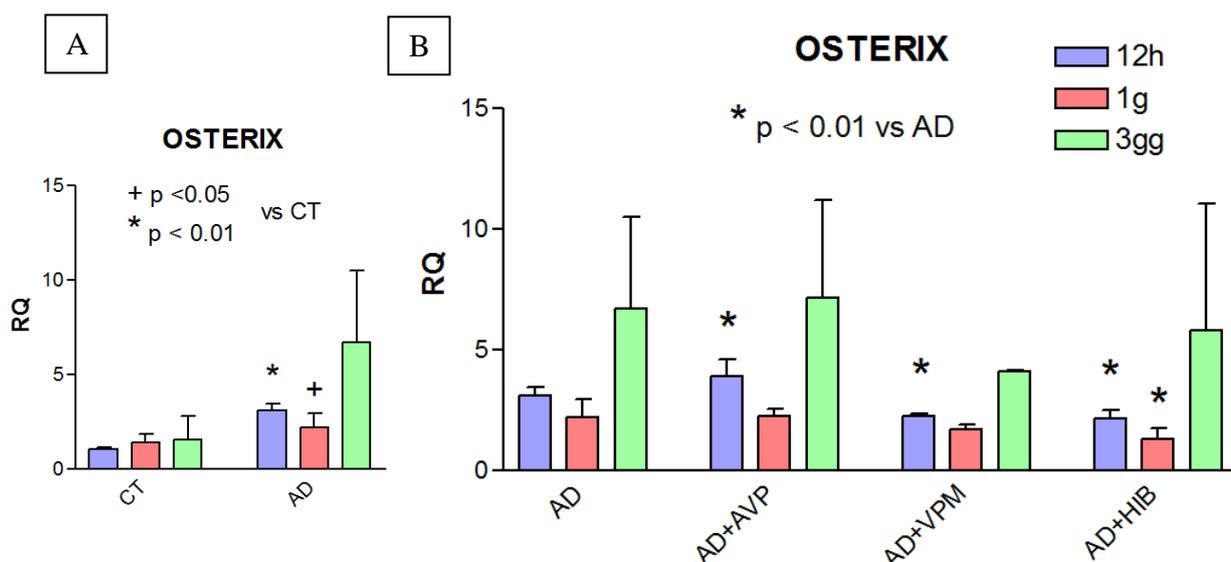
**Fig46 Analisi dell'espressione genica di PPAR $\gamma$ .** L'espressione genica di PPAR $\gamma$  è stata valutata mediante esperimenti di qPCR. La significatività è stata valutata (A) con il test t di Student per CT-AD (\*p<0.01, + p < 0.05), (B) confrontando per ciascun tempo i valori degli RQ ottenuti nelle cellule trattate AD+AVP, AD+VPM e AD+HIB rispetto all'RQ dell'AD (\* p < 0.01, + p < 0.05 VS AD). I dati sono espressi sotto forma di media  $\pm$  deviazione standard, calcolati sui valori ottenuti in 2 esperimenti indipendenti.

**RUNX2:** In tutti i tempi analizzati non si osservano variazioni significative dei livelli di espressione di RUNX2 tra CT e AD (Fig47A). Le cellule trattate con AD+HIB hanno un livello di espressione di RUNX2 significativamente maggiore rispetto all'AD a 12h di trattamento. Per le cellule trattate con AVP e VPM non si osservano variazioni significative rispetto all'AD per tutti i tempi analizzati (Fig47B).



**Fig47 Analisi dell'espressione genica di RUNX2.** L'espressione genica di RUNX2 è stata valutata mediante esperimenti di qPCR. La significatività è stata valutata (A) con il test t di Student per CT-AD (\*p<0.01, + p < 0.05), (B) confrontando per ciascun tempo i valori degli RQ ottenuti nelle cellule trattate AD+AVP, AD+VPM e AD+HIB rispetto all'RQ dell'AD (\* p < 0.01, + p < 0.05 VS AD). I dati sono espressi sotto forma di media  $\pm$  deviazione standard, calcolati sui valori ottenuti in 2 esperimenti indipendenti.

**OSTERIX:** L'indagine condotta analizzando i livelli di espressione di OSTERIX evidenzia a 12h e a 1g un aumento significativo nell'AD rispetto al CT (Fig48A). Nelle cellule trattate con AD+AVP si osserva a 12h un aumento dei livelli di espressione di OSTERIX rispetto all'AD mentre nelle cellule trattate con AD+VPM e AD+HIB l'espressione di OSTERIX è significativamente ridotta. Solo per le cellule trattate con AD+HIB tale riduzione si osserva anche dopo 1g di induzione (Fig48B).



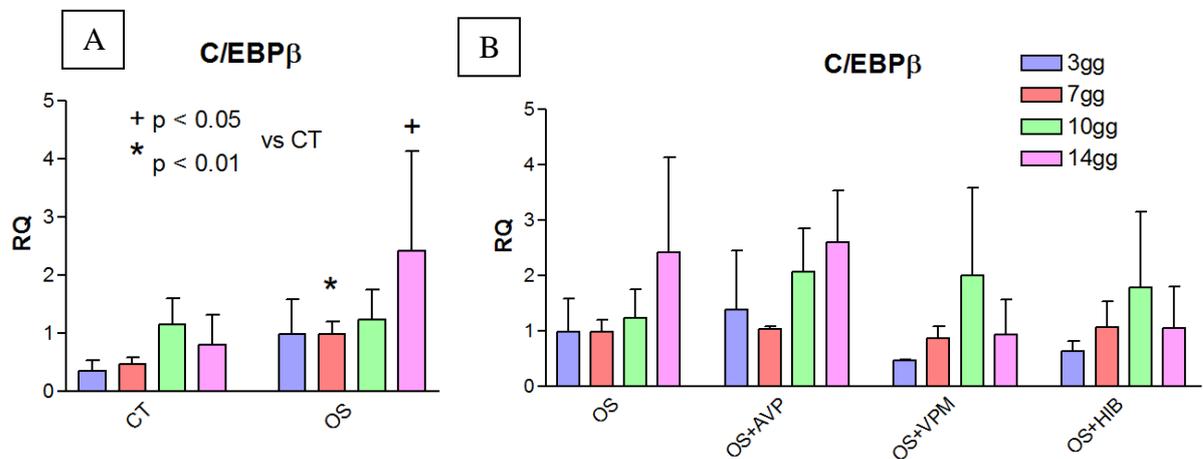
**Fig48 Analisi dell'espressione genica di OSTERIX.** L'espressione genica di OSTERIX è stata valutata mediante esperimenti di qPCR. La significatività è stata valutata (A) con il test t di Student per CT-AD (\*p<0.01, + p < 0.05), (B) confrontando per ciascun tempo i valori degli RQ ottenuti nelle cellule trattate AD+AVP, AD+VPM e AD+HIB rispetto all'RQ dell'AD (\* p < 0.01, + p < 0.05 VS AD). I dati sono espressi sotto forma di media ± deviazione standard, calcolati sui valori ottenuti in 2 esperimenti indipendenti.

## 12. ANALISI RT-PCR - DIFFERENZIAMENTO OSTEOGENICO

È stato valutato l'effetto di AVP, VPM e HIB sull'espressione genica di C/EBPβ, PPARγ, RUNX2 e OSTERIX durante il differenziamento osteogenico di hMSC. A tal fine le hMSC sono state piastrate e trattate per tutto il tempo del differenziamento con terreno contenente i fattori osteogenici addizionato delle tre sostanze alle concentrazioni scelte in base agli esperimenti di citotossicità: AVP 5mM, VPM 1mM e HIB 5mg/ml.

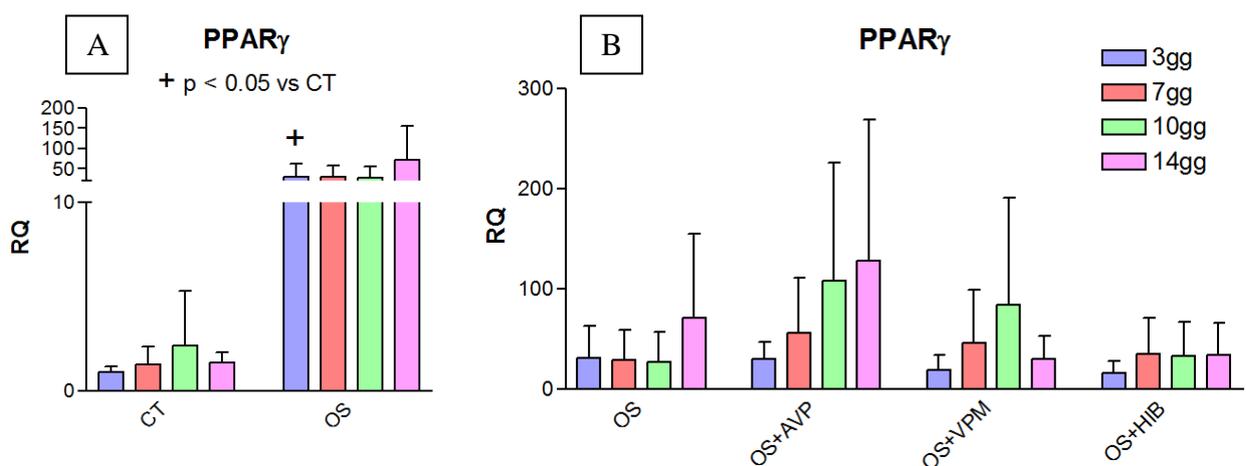
Ai tempi prestabiliti (3gg, 7gg, 10gg, 14gg) sono stati preparati estratti di RNA totale e si è proceduto con la reazione di retrotrascrizione. Il cDNA dei diversi campioni è stato quindi analizzato mediante Real-Time PCR. I dati sono espressi sotto forma di media ± deviazione standard calcolati sui valori degli RQ ottenuti in 2 esperimenti indipendenti. Il controllo (CT) è rappresentato da cellule trattate solo con terreno di coltura DMEM-LG mentre l'OS corrisponde alle hMSC indotte con solo il terreno di induzione osteogenico.

**C/EBP $\beta$** : Dai dati ottenuti si osserva che a 7gg e 14gg le cellule indotte al differenziamento osteogenico (OS) hanno un livello di espressione di C/EBP $\beta$  significativamente aumentato rispetto al CT (Fig49A). Per le cellule trattate con OS+AVP, OS+VPM e OS+HIB non si osservano variazioni rispetto all'OS in tutti i tempi analizzati (Fig49B).



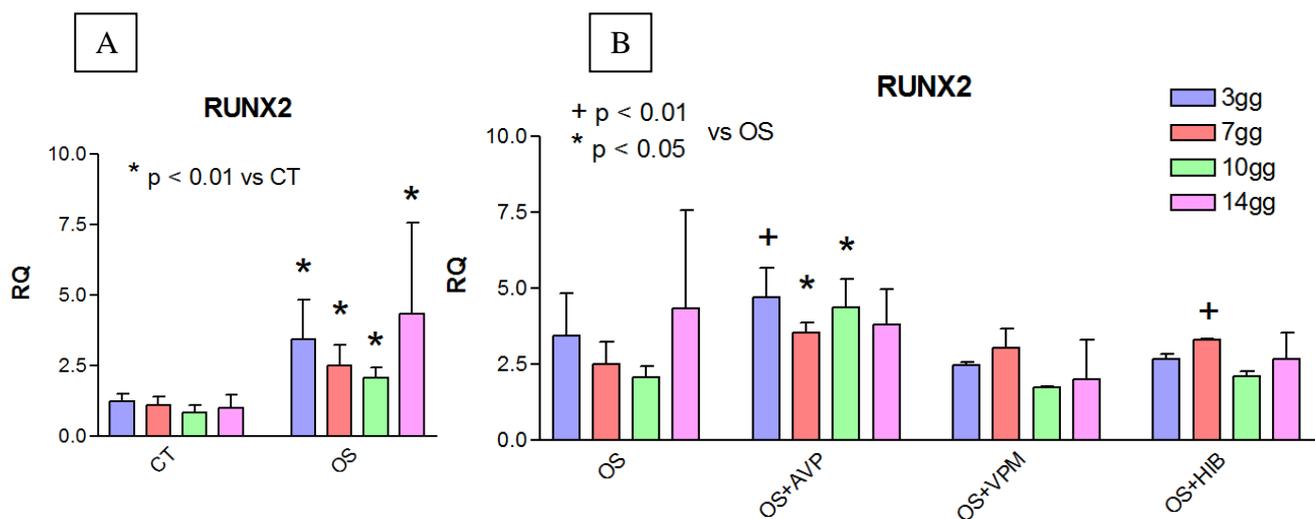
**Fig49 Analisi dell'espressione genica di C/EBP $\beta$ .** L'espressione genica di C/EBP $\beta$  è stata valutata mediante esperimenti di qPCR. La significatività è stata valutata (A) con il test t di Student per CT-OS (\*p<0.01, + p < 0.05), (B) confrontando per ciascun tempo i valori degli RQ ottenuti nelle cellule trattate OS+AVP, OS+VPM e OS+HIB rispetto all'RQ dell'OS (\* p < 0.01, + p < 0.05 VS OS). I dati sono espressi sotto forma di media  $\pm$  deviazione standard, calcolati sui valori ottenuti in 2 esperimenti indipendenti.

**PPAR $\gamma$** : A 3gg le cellule indotte al differenziamento osteogenico hanno un livello di espressione di PPAR $\gamma$  significativamente maggiore rispetto al CT (Fig50A). In tutti i tempi analizzati le cellule trattate con OS+AVP, OS+VPM e OS+HIB non hanno variazioni significative nell'espressione di PPAR $\gamma$  rispetto all'OS (Fig50B).



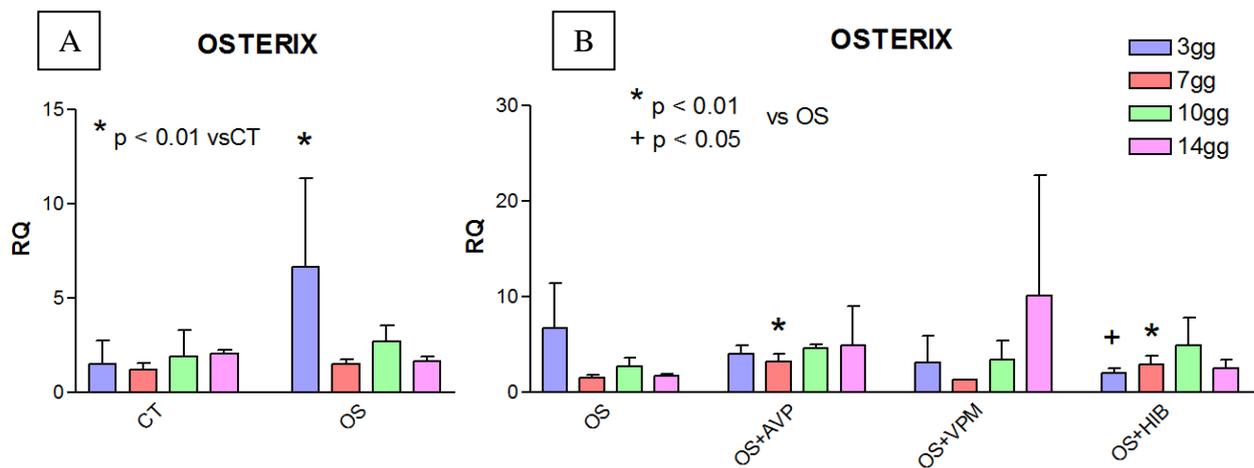
**Fig50 Analisi dell'espressione genica di PPAR $\gamma$ .** L'espressione genica di PPAR $\gamma$  è stata valutata mediante esperimenti di qPCR. La significatività è stata valutata (A) con il test t di Student per CT-OS (\*p<0.01, + p < 0.05), (B) confrontando per ciascun tempo i valori degli RQ ottenuti nelle cellule trattate OS+AVP, OS+VPM e OS+HIB rispetto all'RQ dell'OS (\* p < 0.01, + p < 0.05 VS OS). I dati sono espressi sotto forma di media  $\pm$  deviazione standard, calcolati sui valori ottenuti in 2 esperimenti indipendenti.

**RUNX2:** Per tutti i tempi analizzati, le cellule indotte al differenziamento osteogenico (OS) hanno dei livelli di espressione di RUNX2 significativamente aumentati rispetto al CT (Fig51A). Le cellule trattate con OS+AVP a 3gg, 7gg e 10gg hanno dei livelli di espressione significativamente maggiori rispetto all'OS mentre a 14gg non si osservano differenze. Per tutti i tempi analizzati, le cellule trattate con OS+VPM non hanno variazioni significative nell'espressione di RUNX2 rispetto all'OS. Analizzando i dati relativi al confronto tra OS e OS+HIB , si osserva un'unica variazione significativa a 7gg in cui i livelli di RUNX2 espresso nelle cellule OS+HIB supera quello dell'OS (Fig51B).



**Fig51 Analisi dell'espressione genica di RUNX2.** L'espressione genica di RUNX2 è stata valutata mediante esperimenti di qPCR. La significatività è stata valutata (A) con il test t di Student per CT-OS (\* $p < 0.01$ , +  $p < 0.05$ ), (B) confrontando per ciascun tempo i valori degli RQ ottenuti nelle cellule trattate OS+AVP, OS+VPM e OS+HIB rispetto all'RQ dell'OS (\*  $p < 0.01$ , +  $p < 0.05$  VS OS). I dati sono espressi sotto forma di media  $\pm$  deviazione standard, calcolati sui valori ottenuti in 2 esperimenti indipendenti.

**OSTERIX:** A 3gg di trattamento le cellule indotte al differenziamento osteogenico (OS) hanno un valore di espressione di OSTERIX significativamente maggiore rispetto al CT, mentre ai tempi successivi (7gg, 10gg e 14gg) non si osservano differenze significative (Fig52A). Analizzando i dati relativi al confronto tra OS e OS+AVP , si osserva un'unica variazione significativa a 7gg in cui il livello di OSTERIX espresso nelle cellule OS+AVP supera quello dell'OS. Per le cellule OS+VPM non si osservano variazioni significative nell'espressione genica di OSTERIX rispetto all'OS. Analizzando i dati relativi al confronto tra OS e OS+HIB si osserva, nei livelli di espressione di OSTERIX, una riduzione significativa a 3gg ed un aumento significativo a 7gg nelle cellule OS+HIB rispetto all'OS (Fig52B).



**Fig52 Analisi dell'espressione genica di OSTERIX.** L'espressione genica di OSTERIX è stata valutata mediante esperimenti di qPCR. La significatività è stata valutata (A) con il test t di Student per CT-OS (\* $p < 0.01$ , +  $p < 0.05$ ), (B) confrontando per ciascun tempo i valori degli RQ ottenuti nelle cellule trattate OS+AVP, OS+VPM e OS+HIB rispetto all'RQ dell'OS (\*  $p < 0.01$ , +  $p < 0.05$  VS OS). I dati sono espressi sotto forma di media  $\pm$  deviazione standard, calcolati sui valori ottenuti in 2 esperimenti indipendenti.

# DISCUSSIONE

Tra obesità e osteoporosi esiste una stretta correlazione infatti l'osteoporosi è spesso accompagnata da un aumento dell'adipogenesi midollare mentre l'obesità è caratterizzata da una maggiore fragilità ossea ed ad un malassorbimento di calcio a livello intestinale (Cao 2011). L'obesità e l'osteoporosi appartengono alle malattie croniche dei paesi industrializzati e sono diventate una delle principali voci di spesa per i servizi sanitari. E' per questo motivo che in questi ultimi anni, un'area della ricerca scientifica si è concentrata sullo studio di nuovi farmaci/sostanze in grado di agire sull'adipogenesi o sull'osteoblastogenesi in quanto è fondamentale trovare nuove terapie che prevenivano tali patologie. Conoscendo la correlazione tra obesità e osteoporosi è importante controllare che un farmaco contro l'obesità non abbia effetti sul metabolismo delle ossa, che in pazienti obesi risulta già compromesso, mentre un farmaco per l'osteoporosi non dovrebbe avere effetti sull'adipogenesi. Per valutare l'efficacia e la sicurezza di questi farmaci/sostanze e comprendere il loro meccanismo d'azione, è indispensabile effettuare studi *in vitro* ed *in vivo*.

Per quanto riguarda i modelli cellulari per gli studi *in vitro*, le cellule staminali mesenchimali (MSC) rappresentano senza dubbio un ottimo modello poiché sono i precursori fisiologici sia degli adipociti che degli osteoblasti ed essendo cellule indifferenziate, ci permettono di studiare l'effetto di questi farmaci/sostanze sull'intero processo adipogenico e osteogenico.

Nel corso di questa tesi è stato valutato l'effetto di Acido Valproico (AVP), Valpromide (VPM), Berberina (BRB), Hibiscus Sabdariffa (HIB) e Resveratrolo (RESV) sul differenziamento adipogenico e osteogenico di cellule staminali mesenchimali umane (hMSC).

Abbiamo valutato la citotossicità di AVP, VPM, BRB, HIB e RESV sulle hMSC indifferenziate e le hMSC indotte al differenziamento adipogenico e osteogenico, per poter determinare le concentrazioni da usare nei successivi esperimenti. In base ai risultati ottenuti, per ogni sostanza è stata scelta una concentrazione che non risultava tossica sia sulle hMSC indifferenziate che sulle hMSC differenziate in senso adipogenico e osteogenico. Le concentrazioni scelte sono AVP 5mM, VPM 1mM, BRB 4 $\mu$ M, HIB 5mg/ml e RESV10 $\mu$ M.

Le sostanze sono state aggiunte al terreno di differenziamento adipogenico delle hMSC al fine di valutare il loro effetto sull'adipogenesi. Dai dati ottenuti abbiamo dimostrato che AVP, BRB, HIB e RESV hanno un effetto anti-adipogenico mentre il trattamento con VPM non determina variazioni significative nell'adipogenesi. In letteratura l'effetto anti-adipogenico di queste sostanze è già stato descritto in modelli murini o umani utilizzando concentrazioni differenti alle nostre in quanto è diverso il modello cellulare utilizzato. Il vantaggio di utilizzare le hMSC isolate da midollo osseo

rispetto ai preadipociti è dovuto al fatto che le hMSC ci consentono di studiare i diversi aspetti del processo adipogenico sin dalle fasi iniziali.

Le suddette sostanze, alle stesse concentrazioni, sono state testate anche sulle hMSC differenziate in senso osteogenico ed il dato interessante è che sia AVP che VPM anticipano il differenziamento osteogenico, HIB e BRB hanno un effetto inibitorio mentre il trattamento con RESV non determina variazioni significative nell'osteoblastogenesi.

In letteratura i lavori che valutano gli effetti di queste sostanze sul differenziamento osteogenico, utilizzano concentrazioni differenti dalle nostre in quanto tali sostanze vengono testate su hMSC che derivano da tessuti differenti dal midollo osseo o su preosteoblasti murini.

Volendo analizzare i meccanismi alla base di tali effetti siamo andati a studiare un pathway importante nella regolazione del differenziamento adipogenico e osteogenico: ERK1/2. Infatti ERK1/2 nel differenziamento adipogenico agisce regolando i principali fattori di trascrizione come C/EBP $\beta$ , primo fattore di trascrizione ad essere espresso durante le fasi iniziali del differenziamento adipogenico e PPAR $\gamma$ , fattore trascrizionale tardivo (*Elber et al. 2000; Bost et al., 2005*). Anche nel differenziamento osteogenico ERK1/2 porta all'espressione di fattori trascrizionali importanti per il differenziamento come Runx2 e osteopontina (*Xiao et al., 2000, Schindeler et al., 2006; Jaiswal et al., 2000*). Diversi studi *in vitro* hanno valutato la modulazione della fosforilazione di ERK1/2 nel processo di differenziamento adipocitico e osteogenico, con risultati spesso contraddittori. Al fine di valutare il ruolo svolto da ERK1/2 nel differenziamento adipogenico di hMSC, è stato analizzato lo stato di fosforilazione di ERK1/2 durante le diverse fasi del differenziamento. I risultati da noi ottenuti mostrano, nelle fasi precoci, una riduzione della fosforilazione di ERK1 e di ERK2 nelle hMSC indotte al differenziamento adipogenico rispetto alle cellule di controllo. Questi dati concordano con quelli già ottenuti presso il nostro laboratorio in cui inoltre sono stati utilizzati specifici inibitori di ERK1 ed ERK2 (*Donzelli et al., 2011*) suggerendo quindi che al fine di un corretto differenziamento delle hMSC, sia necessaria una riduzione della fosforilazione di ERK1/2 durante le fasi precoci.

Abbiamo quindi valutato lo stato di fosforilazione e quindi di attivazione di ERK1 ed ERK2 nelle hMSC indotte al differenziamento adipogenico in presenza delle cinque sostanze esaminate. I risultati ottenuti non mostrano variazioni significative nella fosforilazione di ERK1 ed ERK2 tra le cellule indotte al differenziamento adipogenico e le cellule indotte al differenziamento adipogenico in presenza di AVP, VPM, BRB, HIB e RESV, dimostrando che l'effetto esercitato da tali sostanze non avviene mediante la modulazione di questo pathway.

Al fine di valutare il ruolo svolto da ERK1/2 nel differenziamento osteogenico di hMSC, è stato analizzato lo stato di fosforilazione di ERK1/2 durante le diverse fasi del differenziamento. Anche

se non sono risultati statisticamente significativi, i dati da noi ottenuti mostrano che durante le fasi iniziali del differenziamento nelle hMSC indotte al differenziamento osteogenico si osserva un aumento della fosforilazione che, seppur in misura diversa, interessa entrambe le isoforme di ERK rispetto alle cellule di controllo. Nelle fasi tardive del differenziamento invece i livelli di fosforilazione di ERK1/2 nelle cellule indotte al differenziamento risultano paragonabili alle cellule di controllo. Questi dati consentono di ipotizzare che nelle hMSC sia necessario un aumento della fosforilazione di ERK1/2 durante le fasi precoci del differenziamento osteogenico ma per poter confermare tale dato saranno necessari ulteriori studi probabilmente con un maggior numero di campioni e con l'impiego di inibitori specifici di pERK1/2. I nostri dati sono in accordo con alcuni lavori presenti in letteratura nei quali si dimostra che un aumento della forma fosforilata di ERK1/2 si osserva nel corso del differenziamento delle hMSC verso il lineage osteogenico, mentre l'inibizione di questo pathway conduce le cellule verso il differenziamento adipogenico (*Jaiswal et al., 2000*). Tuttavia in un altro studio è stato dimostrato che un'inibizione continua del pathway di ERK1/2 stimoli invece il differenziamento osteogenico (*Higuchi et al., 2002*) ma la causa di questa discordanza potrebbe essere dovuta al diverso modello cellulare utilizzato (linee murine C2C12 e MC3T3-E1).

Per quanto riguarda il differenziamento osteogenico non abbiamo osservato variazioni significative di pERK1/2 nelle cellule indotte al differenziamento e trattate con AVP, HIB e RESV rispetto alle cellule non trattate. Si osserva una riduzione significativa di pERK1/2 nelle cellule trattate con VPM dopo 10gg di trattamento mentre per le cellule trattate con BRB, tale riduzione è presente sia a 10gg che a 14gg di trattamento. Questo dato potrebbe giustificare l'effetto anti-osteogenico della BRB in quanto osserviamo una riduzione della forma fosforilata di ERK1/2 più prolungata rispetto alle cellule indotte con solo il terreno osteogenico. I nostri dati sull'effetto della BRB, però, discordano dalla letteratura; infatti Lee e collaboratori hanno dimostrato che la BRB porta ad un aumento dell'espressione di osteocalcina, osteopontina e Runx2 su cellule murine (*Lee et al., 2008*). Studi *in vivo* hanno anche dimostrato che in ratti con osteoporosi indotta da glucocorticoidi si ha un'inibizione dell'osteoclastogenesi ed un aumento della formazione ossea (*Xu et al., 2010*).

I nostri dati dimostrano che RESV ha un effetto anti-adipogenico e non agisce sul pathway di pERK1/2. Anche gli studi in letteratura confermano questo effetto dimostrando che RESV sulle 3T3-L1 (*Picard et al., 2004*) e preadipociti umani (*Fischer-Posovszky et al., 2010*) causa un'inibizione della proliferazione e del differenziamento adipogenico, attivando l'over-espressione di SIRT1 che a sua volta promuove la mobilizzazione di lipidi. I dati in letteratura hanno dimostrato l'effetto anti-adipogenico di RESV associato ad una down-regolazione di diversi fattori trascrizionali adipogenici come PPAR $\gamma$ , C/EBP $\alpha$  e SREBP-1c (*Rayalam et al., 2007*; *Shakibaei et*

*al.*, 2009; *Athar et al.*, 2009). Per quanto riguarda l'effetto di RESV sul differenziamento osteogenico, non abbiamo osservato differenze significative nell'osteoblastogenesi ma questo nostro dato non è conforme con i dati presenti in letteratura che dimostrano l'effetto di RESV come antagonista dell'osteoclastogenesi e promotore dell'osteoblastogenesi (*Boissy et al.*, 2005). Infatti in uno studio effettuato su una linea cellulare murina di preosteoblasti (MC3T3-E1) è stata dimostrata la capacità di RESV di stimolare la proliferazione e il differenziamento di queste cellule ed aumentare l'attività della fosfatasi alcalina (ALP) (*Mizutani et al.*, 1998). Studi recenti sulle hMSC da tessuto adiposo suggeriscono che RESV abbia un effetto su Sirt1, influenzando l'interazione con il recettore attivatore di RUNX2 (*Shakibaei et al.*, 2012). L'effetto differente che abbiamo osservato potrebbe essere giustificato dal diverso modello cellulare utilizzato.

Nella seconda parte di questa ricerca, abbiamo approfondito lo studio dell'effetto di AVP, VPM e HIB sul differenziamento adipogenico e osteogenico valutandone l'eventuale modulazione del pathway di Wnt rilevante per i due differenziamenti (*Katoh et al.*, 2007). La scelta di AVP e VPM è dovuta al fatto che pur avendo una struttura molecolare simile, agiscono in maniera differente sul differenziamento adipogenico e osteogenico. Infatti AVP è un inibitore delle istoni deacetilasi (HDAC) ed ha un effetto anti-adipogenico e pro-osteogenico mentre VPM ha solo un effetto pro-osteogenico e non è un inibitore delle HDAC. Inoltre in letteratura non sono ancora descritti nè l'effetto di HIB sul differenziamento osteogenico nè i meccanismi molecolari attraverso cui agisce.

In breve attivando la cascata di Wnt, si ha l'inibizione di GSK3 $\beta$  tramite fosforilazione e questo porta ad un aumento nel citoplasma di  $\beta$ catenina. La  $\beta$ catenina stabilizzata, trasloca nel nucleo e va ad attivare fattori trascrizionali osteogenici come Runx2 e Osterix mentre inibisce l'espressione di fattori adipogenici quali PPAR $\gamma$  e C/EBP $\alpha$  (*Kim et al.*, 2013; *Christodoulides et al.*, 2008).

Al fine di valutare il ruolo di GSK3 $\beta$  e di  $\beta$ catenina nel differenziamento adipogenico di hMSC, è stato analizzato lo stato di fosforilazione e quindi di inattivazione di GSK3 $\beta$  e di espressione di  $\beta$ catenina durante le diverse fasi del differenziamento. Dai dati ottenuti non abbiamo osservato variazioni significative nei livelli di pGSK3 $\beta$  e di  $\beta$ catenina tra le hMSC differenziate e non differenziate per tutti i tempi analizzati. Inoltre non abbiamo osservato variazioni significative nei livelli di pGSK3 $\beta$  e di  $\beta$ catenina nelle hMSC indotte al differenziamento adipogenico trattate con VPM e HIB rispetto alle hMSC indotte e non trattate. Solo a 3gg abbiamo osservato un aumento significativo di pGSK3 $\beta$  nelle hMSC trattate con terreno adipogenico e AVP rispetto alle hMSC indotte con solo il terreno adipogenico. Questo risultato potrebbe spiegare l'effetto anti-adipogenico di AVP, infatti dati in letteratura dimostrano che nei primi due giorni dopo l'induzione adipogenica, GSK3 $\beta$  viene inibita e  $\beta$ catenina va ad attivare la ciclina D1 che porta ad una progressione del ciclo cellulare (*Tang et al.*, 2012). Infatti durante il differenziamento adipogenico i pre-adipociti

subiscono una fase di espansione che consente di aumentare il numero di cellule che andranno in contro alle fasi di differenziamento (Fève 2005). Successivamente si ha una down-regolazione di  $\beta$ catenina a livello post-trascrizionale che coincide con l'espressione di PPAR $\gamma$ . Se l'attività di GSK3 $\beta$  viene ridotta,  $\beta$ catenina non viene degradata e in questo caso inibisce l'espressione di PPAR $\gamma$  e di adiponectina (Farmer 2005).

Per quanto riguarda il differenziamento osteogenico, abbiamo osservato una modulazione nei livelli di fosforilazione di GSK3 $\beta$  e di espressione di  $\beta$ catenina tra le hMSC indifferenziate e le hMSC differenziate. Infatti, anche se non è statisticamente significativo, abbiamo osservato un aumento del livello di pGSK3 $\beta$  e di  $\beta$ catenina nelle hMSC indotte al differenziamento osteogenico rispetto alle hMSC indifferenziate. Questo dato è in accordo con la letteratura in quanto è dimostrato che dopo l'inattivazione di GSK3 $\beta$  mediante fosforilazione viene attivata  $\beta$ catenina che porta alla trascrizione di geni osteogenici (Baron *et al.*, 2007).

Non abbiamo osservato invece variazioni significative nei livelli di fosforilazione di GSK3 $\beta$  tra le hMSC trattate con terreno osteogenico in presenza o assenza di AVP, VPM e HIB per tutti i tempi analizzati. Questi dati suggeriscono che l'effetto esercitato dalle sostanze valutate sul differenziamento osteogenico non avviene probabilmente mediante tale pathway.

L'analisi condotta sui livelli di espressione di  $\beta$ catenina ha evidenziato un aumento non significativo dei livelli di questa proteina in hMSC indotte al differenziamento osteogenico rispetto alle hMSC indifferenziate per tutti i tempi analizzati. Solo per le hMSC trattate per il differenziamento osteogenico con l'aggiunta di AVP e VPM abbiamo osservato una diminuzione significativa di  $\beta$ catenina rispetto alle hMSC trattate con solo terreno osteogenico. Probabilmente i tempi analizzati sono troppo tardivi per vedere l'aumento di questa proteina a livello citoplasmatico.

Come ultima analisi abbiamo studiato i livelli di espressione di fattori trascrizionali importanti per il differenziamento adipogenico (C/EBP $\beta$  e PPAR $\gamma$ ) e per il differenziamento osteogenico (RUNX2 e OSTERIX). Nei dati presenti in letteratura C/EBP $\beta$  è il primo fattore trascrizionale ad essere attivato in seguito alla fosforilazione da parte di ERK1/2 e GSK3 $\beta$ . Successivamente viene attivato PPAR $\gamma$  che è in grado di attivare i promotori di geni specifici delle cellule adipose. Runx2 è un fattore trascrizionale tipico delle prime fasi del differenziamento osteogenico mentre Osterix ha un ruolo importante nella fase finale della maturazione degli osteoblasti (Zhang 2012). In accordo con la letteratura, anche nei nostri esperimenti abbiamo dimostrato che le hMSC indotte al differenziamento adipogenico presentano un aumento significativo di C/EBP $\beta$  nelle prime fasi del differenziamento seguito da un aumento significativo di PPAR $\gamma$  rispetto alle hMSC indifferenziate. Per quanto riguarda il differenziamento osteogenico abbiamo osservato un aumento significativo

dei livelli di espressione di RUNX2 nelle hMSC trattate con terreno osteogenico e solo a 3gg un aumento significativo di Osterix rispetto alle hMSC indifferenziate.

Dall'analisi ottenuta mediante qPCR abbiamo ottenuto dei dati interessanti per le hMSC indotte al differenziamento adipogenico e trattate con AVP in quanto abbiamo osservato un aumento significativo dei livelli di espressione di C/EBP $\beta$  e contemporaneamente una diminuzione significativa di PPAR $\gamma$  rispetto alle hMSC trattate con solo il terreno adipogenico. Questo dato potrebbe spiegare l'effetto anti-adipogenico della sostanza in quanto rimanendo alti i livelli di espressione di C/EBP $\beta$ , le cellule non riescono a passare alla fase successiva che è l'attivazione di PPAR $\gamma$  in quanto non viene rispettato il timing. Questo porta ad una modulazione dell'espressione dei fattori trascrizionali importanti per un corretto differenziamento adipogenico. Anche dati in letteratura dimostrano che in preadipociti murini si è osservata una riduzione del differenziamento adipogenico e dei livelli di mRNA e proteici di PPAR $\gamma$  e SREBP1a quando trattati con AVP (Lagace et al., 2004).

Inoltre dai nostri risultati abbiamo osservato che, durante il differenziamento osteogenico, le hMSC trattate con AVP presentano un aumento dell'espressione di RUNX2 a 3, 7, 10 giorni rispetto alle cellule trattate con solo il terreno osteogenico e questo potrebbe spiegare l'anticipo del differenziamento. Infatti i nostri risultati sono in accordo con quelli presenti in letteratura anche se il metodo di somministrazione di AVP e il modello cellulare utilizzato cambia. Infatti un pre-trattamento o il trattamento per i primi 3giorni di differenziamento osteogenico con AVP in cellule stromali derivate da midollo osseo e tessuto adiposo porta ad un aumento della deposizione di calcio e dell'espressione di geni osteogenici come RUNX2, OSTERIX, osteopontina e BMP-2 (Cho et al., 2005). Tale effetto pro-osteogenico è stato dimostrato anche in cellule murine (MC3T3-E1 e C3H10T1/2) infatti l'iperacetilazione dell'istone H3 induce un aumento del fattore trascrizionale RUNX2 (Schroeder et al., 2005).

Dai nostri studi sulle hMSC indotte al differenziamento osteogenico la VPM, si comporta come l'AVP, infatti si osserva un anticipo della deposizione di calcio, senza però portare delle modifiche sui livelli di espressione dei fattori RUNX2 e Osterix dimostrando che questa sostanza non agisce su questi pathway. In letteratura solo un gruppo ha studiato l'effetto di VPM sul differenziamento osteogenico dimostrando un effetto della VPM opposto al nostro. Infatti hanno osservato che un pre-trattamento o il trattamento per i primi 3giorni di differenziamento osteogenico con VPM in cellule stromali derivate da tessuto adiposo (hADSC) non porta alcun effetto sul differenziamento (Cho et al 2005). Questo effetto opposto potrebbe essere causato dal diverso disegno sperimentale in quanto nel nostro lavoro VPM è stato aggiunto sin dal momento dell'induzione osteogenica e mantenuto per tutta la durata dell'esperimento ed al tipo diverso di cellule staminali impiegate.

Per quanto riguarda il differenziamento osteogenico anche se AVP e VPM hanno lo stesso effetto pro-osteogenico sulle hMSC, non osserviamo la stessa modalità d'azione sui fattori trascrizionali osteogenici dimostrando che queste sostanze agiscono attraverso meccanismi d'azione differenti.

In letteratura è stato dimostrato l'effetto anti-adipogenico dell'estratto di Hibiscus Sabdariffa sui preadipociti murini 3T3-L1 anche se i meccanismi molecolari attraverso cui agisce questo estratto non sono ancora stati del tutto chiariti. Anche i nostri risultati confermano l'effetto anti-adipogenico dell'HIB sulle hMSC indotte al differenziamento adipogenico ma, non abbiamo osservato modifiche a livello di espressione dei fattori trascrizionali adipogenici (C/EBP $\beta$  e PPAR $\gamma$ ) e dei pathway (ERK1/2 e GSK3 $\beta$ ) coinvolti durante il differenziamento. Altri lavori presenti in letteratura hanno dimostrato che l'estratto di HIB ha un effetto anti-adipogenico in preadipociti murini immortalizzati e tale inibizione è data dalla riduzione proteica e di mRNA dei fattori trascrizionali PPAR $\gamma$  e C/EBP $\alpha$  (Kim *et al.*, 2007). Per capire il meccanismo molecolare di HIB hanno studiato il pathway delle MAPK durante l'adipogenesi utilizzando specifici inibitori di PI3-K/Akt e MEK1 e dai risultati si osserva che l'HIB inibisce la fosforilazione di PI3-K e pERK1/2 suggerendo che tale estratto blocca il pathway PI3-K/Akt e delle MAPK. Questo porta ad una inibizione dei fattori trascrizionali adipogenici.

Quindi dai nostri risultati e dai dati presenti in letteratura possiamo dire che l'HIB ha lo stesso effetto anti-adipogenico sia sui preadipociti murini che sulle hMSC indotte al differenziamento adipogenico ma agisce in maniera differente sui due diversi modelli cellulari.

Non esistono in letteratura studi sull'effetto di HIB sul differenziamento osteogenico e dai nostri risultati preliminari si dimostra che HIB ha un effetto anti-osteogenico sulle hMSC. Analizzando i livelli di espressione dei fattori trascrizionali osteogenici (RUNX2 e OSTERIX) e studiando i pathway principali del differenziamento osteogenico (pERK1/2 e pGSK3 $\beta$ ) non abbiamo osservato differenze significative. Inoltre abbiamo dimostrato che HIB aggiunto al terreno osteogenico dopo 3, 7, 10 e 14 giorni dal momento di induzione ha un effetto anti-osteogenico. Se aggiunto dopo 21 giorni di induzione osteogenica, l'HIB non ha più il suo effetto anti-osteogenico probabilmente perchè oramai le cellule sono già indirizzate e differenziate. Risulta fondamentale approfondire l'effetto anti-osteogenico dell'Hibiscus Sabdariffa studiando i meccanismi molecolari attraverso cui agisce questo estratto.

L'analisi dei nostri risultati ha dimostrato che la sostanza più promettente, per un eventuale uso terapeutico, sembra essere l'Acido Valproico perchè, oltre ad inibire il differenziamento adipogenico, ha un effetto pro-osteogenico sulle hMSC ma saranno necessari ulteriori studi per comprendere a pieno il meccanismo d'azione di tale sostanza. Uno dei meccanismi mediante il quale AVP potrebbe agire è sulla regolazione dei fattori trascrizionali coinvolti in questi due

processi differenziativi. Infatti AVP ha un effetto anti-adipogenico, in quanto aumenta l'espressione genica di C/EBP $\beta$  e riduce l'espressione di PPAR $\gamma$  e ha un effetto pro-osteogenico poiché aumenta i livelli di espressione di RUNX2 a 3, 7 e 10 giorni. Questa azione è in linea con il fatto che l'AVP è un inibitore delle istoni deacetilasi, enzimi che provocano alterazioni dello stato di acetilazione degli istoni e di conseguenza modifiche trascrizionali.

Sicuramente altri meccanismi sono coinvolti in questi effetti e studi futuri saranno necessari per poterli identificare. Inoltre l'assenza di una tossicità rilevante sulle hMSC non differenziate è un requisito importante per un possibile utilizzo clinico, poiché è necessario evitare di compromettere il pool delle cellule staminali mesenchimali presenti nell'organismo e che svolgono un ruolo fondamentale nell'omeostasi tissutale. Per poter ottenere un'ulteriore conferma dei nostri dati saranno necessari studi *in vivo* per verificare l'effetto di AVP sul tessuto adiposo e sul metabolismo dell'osso.

# ***BIBLIOGRAFIA***

- Adams M**, Reginato MJ, Shao D, Lazar MA, Chatterjee VK (1997). Transcriptional activation by peroxisome proliferator-activated receptor gamma is inhibited by phosphorylation at a consensus mitogen-activated protein kinase site. *J Biol Chem.* 21;272:5128-32.
- Ajay M**, Chai HJ, Mustafa AM, Gilani AH, Mustafa MR. (2007) Mechanisms of the anti-hypertensive effect of *Hibiscus sabdariffa* L. calyces. *J Ethnopharmacol.* 12;109:388-93.
- Akimoto T**, Ushida T, Miyaki S, Akaogi H, Tsuchiya K, Yan Z, Williams RS, Tateishi T (2005). Mechanical stretch inhibits myoblast-to-adipocyte differentiation through Wnt signaling. *Biochem Biophys Res Commun.* Apr 1;329:381-85.
- Akune T**, Ohba S, Kamekura S, Yamaguchi M, Chung UI, Kubota N, Terauchi Y, Harada Y, Azuma Y, Nakamura K, Kadowaki T, Kawaguchi H. (2004) PPARgamma insufficiency enhances osteogenesis through osteoblast formation from bone marrow progenitors. *J Clin Invest.* 113:846-55.
- Ali BH**, Al Wabel N, Blunden G (2005). Phytochemical, pharmacological and toxicological aspects of *Hibiscus sabdariffa* L.: a review. *Phytother Res.* 19(5):369-75.
- Almind K**, Kahn CR. (2004). Genetic determinants of energy expenditure and insulin resistance in diet-induced obesity in mice. *Diabetes.* 53(12):3274-85.
- Anandacoomarasamy A**, Caterson I, Sambrook P, Fransen M, March L. (2008) The impact of obesity on the musculoskeletal system. *Int J Obes (Lond).* 32:211-22.
- Arita Y**, Kihara S, Ouchi N, Takahashi M, Maeda K, Miyagawa J, Hotta K, Shimomura I, Nakamura T, Miyaoka K, Kuriyama H, Nishida M, Yamashita S, Okubo K, Matsubara K, Muraguchi M, Ohmoto Y, Funahashi T, Matsuzawa Y. (1999) Paradoxical decrease of an adipose-specific protein, adiponectin, in obesity. *Biochem Biophys Res Commun.* 2;257:79-83.
- Athar M**, Back JH, Kopelovich L, Bickers D, Kim AL. (2009) "Multiple molecular targets of resveratrol: anti-carcinogenic mechanisms" *Archives of Biochemistry and Biophysics.* 486:95-102.
- Aubert J**, Dessolin S, Belmonte N, Li M, McKenzie FR, Staccini L, Villageois P, Barhanin B, Vernallis A, Smith AG, Ailhaud G, Dani C. (1999) "Leukemia inhibitory factor and its receptor promote adipocyte differentiation via the mitogen-activated protein kinase cascade". *J Biol Chem* 274:24965–24972.
- Babij P**, Zhao W, Small C, Kharode Y, Yaworsky PJ, Bouxsein ML, Reddy PS, Bodine PV, Robinson JA, Bhat B, Marzolf J, Moran RA, Bex F. (2003) High bone mass in mice expressing a mutant LRP5 gene. *J Bone Miner Res.* 18:960-74.
- Bae S**, Yoon Y. (2013) Anti-adipogenic activity of berberine is not mediated by the WNT/ $\beta$ -catenin pathway. *Phytother Res.* Jun;27:937-43.
- Baron R**, Rawadi G. (2007) Wnt signaling and the regulation of bone mass. *Curr Osteoporos Rep.* 5:73-80.
- Baxter MA**, Wynn RF, Jowitt SN, Wraith JE, Fairbairn LJ, Bellantuono I (2004). Study of telomere length reveals rapid aging of human marrow stromal cells following in vitro expansion. *Stem Cells* 22: 675-682.
- Benito M**, Porrai A, Nebreda AR, Santos E (1991). "Differentiation of 3T3-L1 fibroblasts to adipocytes induced by transfection of ras oncogenes". *Science*; 253:565–568.

- Bennett** CN, Hodge CL, MacDougald OA, Schwartz J. (2003) Role of Wnt10b and C/EBPalpha in spontaneous adipogenesis of 243 cells. *Biochem Biophys Res Commun.* 28;302:12-26.
- Bennett** CN, Longo KA, Wright WS, Suva LJ, Lane TF, Hankenson KD, MacDougald OA. (2005) Regulation of osteoblastogenesis and bone mass by Wnt10b. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1;102:3324-29.
- Bennett** CN, Ouyang H, Ma YL, Zeng Q, Gerin I, Sousa KM, Lane TF, Krishnan V, Hankenson KD, MacDougald OA. (2007) Wnt10b increases postnatal bone formation by enhancing osteoblast differentiation. *J Bone Miner Res.* 22:1924-32.
- Bennett** CN, Ross SE, Longo KA, Bajnok L, Hemati N, Johnson KW, Harrison SD, MacDougald OA. (2002) Regulation of Wnt signaling during adipogenesis. *J Biol Chem.*23;277:30998-1004.
- Bermudez** DM, Pories WJ (2013). New technologies for treating obesity. *Minerva Endocrinol.*;38:165-72.
- Bialer** M. (1991) Clinical pharmacology of valpromide. *Clin Pharmacokinet.*20:114-22. Review.
- Bilkovski** R, Schulte DM, Oberhauser F, Gomolka M, Udelhoven M, Hettich MM, Roth B, Heidenreich A, Gutschow C, Krone W, Laudes M. (2010) Role of WNT-5a in the determination of human mesenchymal stem cells into preadipocytes. *J Biol Chem.* 26;285:6170-78.
- Blaheta** RA, Cinatl J Jr. (2002) Anti-tumor mechanisms of valproate: a novel role for an old drug. *Med Res Rev.* 22:492-511. Review.
- Bodine** PV, Komm BS. (2006) Wnt signaling and osteoblastogenesis. *Rev Endocr Metab Disord.* 7:33-39.
- Boissy** P, Andersen TL, Abdallah BM, Kassem M, Plesner T, Delaissé JM. (2005) Resveratrol inhibits myeloma cell growth, prevents osteoclast formation, and promotes osteoblast differentiation. *Cancer Res.*1;65:9943-52.
- Bonyadi** M, Waldman SD, Liu D, Aubin JE, Grynopas MD, Stanford WL (2003). Mesenchymal progenitor self-renewal deficiency leads to age-dependent osteoporosis in Sca-1/Ly-6A null mice. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 13;100:5840-45.
- Bornstein** SR, Uhlmann K, Haidan A, Ehrhart-Bornstein M, Scherbaum WA (1997). "Evidence for a novel peripheral action of leptin as a metabolic signal to the adrenal gland: leptin inhibits cortisol release directly." *Diabetes.* 46:1235-38.
- Bost** F, Aouadi M, Caron L, Binétruy B. (2005) The role of MAPKs in adipocyte differentiation and obesity. *Biochimie.* 87:51-56.
- Boyden** LM, Mao J, Belsky J, Mitzner L, Farhi A, Mitnick MA, Wu D, Insogna K, Lifton RP. (2002) High bone density due to a mutation in LDL-receptor-related protein 5. *N Engl J Med.* 16;346:1513-21.
- Brisdelli** F, D'Andrea G, Bozzi A. (2009) "Resveratrol: a natural polyphenol with multiple chemopreventive properties." *Curr Drug Metab.* ;10:530-46.
- Bruder** SP, Jaiswal N, Haynesworth SE (1997). Growth kinetics, self-renewal, and the osteogenic potential of purified human mesenchymal stem cells during extensive subcultivation and following cryopreservation. *J Cell Biochem* 64:278-294.
- Calaf Alsina** J, Coronado Martín PJ. (2013) [Third generation selective estrogen receptor modulators: benefits beyond bone. II, endometrial action *Med Clin (Barc).* 16;140:266-71.

- Cao Z**, Umek RM, McKnight SL (1991). "Regulated expression of three C/EBP isoforms during adipose conversion of 3T3-L1 cells." *Genes Dev.* 5:1538-52.
- Caplan AI** (2004). Mesenchymal Stem Cells, In: *Handbook of Stem Cells*, Vol 2, Academic Press, pp. 299-308.
- Carvajal-Zarrabal O**, Hayward-Jones PM, Orta-Flores Z, Nolasco-Hipólito C, Barradas-Dermitz DM, Aguilar-Uscanga MG, Pedroza-Hernández MF. (2009) Effect of Hibiscus sabdariffa L. dried calyx ethanol extract on fat absorption-excretion, and body weight implication in rats. *J Biomed Biotechnol.*;2009:394592.
- Case N**, Rubin J. (2010) Beta-catenin--a supporting role in the skeleton. *J Cell Biochem.* Jun 1;110:545-53.
- Cao JJ**. (2011) Effects of obesity on bone metabolism. *J Orthop Surg Res.*15;6:30.
- Cavaletti G**, Miloso M, Nicolini G, Scuteri A, and Tredici G (2007). Emerging role of mitogen-activated protein kinases in peripheral neuropathies, *Journal of the Peripheral Nervous System* 12:175–194.
- Chapman JB**, Cutler MG. (1984) Sodium valproate: effects on social behaviour and physical development in the mouse. *Psychopharmacology (Berl)*. 83:390-96.
- Chen CC**, Hsu JD, Wang SF, Chiang HC, Yang MY, Kao ES, Ho YC, Wang CJ. (2003) Hibiscus sabdariffa extract inhibits the development of atherosclerosis in cholesterol-fed rabbits. *J Agric Food Chem.* 27;51:5472-77.
- Cho GW**, Kang BY, Kim KS, Kim SH. (2012) Effects of valproic acid on the expression of trophic factors in human bone marrow mesenchymal stromal cells. *Neurosci Lett.* 27;526:100-05.
- Cho HH**, Park HT, Kim YJ, Bae YC, Suh KT, Jung JS. (2005) Induction of osteogenic differentiation of human mesenchymal stem cells by histone deacetylase inhibitors. *J Cell Biochem.* 15;96:533-42.
- Choi BH**, Ahn IS, Kim YH, Park JW, Lee SY, Hyun CK, Do MS. (2006) Berberine reduces the expression of adipogenic enzymes and inflammatory molecules of 3T3-L1 adipocyte. *Exp Mol Med.* 31;38:599-605.
- Christodoulides C**, Scarda A, Granzotto M, Milan G, Dalla Nora E, Keogh J, De Pergola G, Stirling H, Pannacciulli N, Sethi JK, Federspil G, Vidal-Puig A, Farooqi IS, O'Rahilly S, Vettor R. (2006) WNT10B mutations in human obesity. *Diabetologia.* 49:678-84.
- Christodoulides C**, Lagathu C, Sethi JK, Vidal-Puig A. (2008) Adipogenesis and WNT signalling. *Trends Endocrinol Metab.* 2009 Jan;20:16-24.
- Clevers H**, Nusse R. (2012) Wnt/ $\beta$ -catenin signaling and disease. *Cell.* 8;149:1192-205.
- Cohen B**, Novick D, Rubinstein M (1996). "Modulation of insulin activities by leptin" *Science* 15;274:1185-88.
- Csiszar A**. (2011) Anti-inflammatory effects of resveratrol: possible role in prevention of age-related cardiovascular disease. *Ann N Y Acad Sci.* 1215:117-22.
- Darlington GJ.**, Ross SE, MacDougald OA (1998). "The role of C/EBP genes in adipocyte differentiation". *J. Biol. Chem.* 273: 30057-30060.
- De A**. (2011) Wnt/Ca<sup>2+</sup> signaling pathway: a brief overview. *Acta Biochim Biophys Sin (Shanghai).* 43:745-56.

- de Heredia FP**, Gómez-Martínez S, Marcos A. (2012) Obesity, inflammation and the immune system. *Proc Nutr Soc.* 71:332-38.
- Devine SM**, Hoffman R (2000). Role of mesenchymal stem cells in hematopoietic stem cell transplantation. *Curr Opin Hematol.* 7:358-63.
- Dimarino AM**, Caplan AI, Bonfield TL (2013). Mesenchymal Stem Cells in Tissue Repair. *Front Immunol* 4;4:201.
- Dingwall M**, Marchildon F, Gunanayagam A, Louis CS, Wiper-Bergeron N. (2011) Retinoic acid-induced Smad3 expression is required for the induction of osteoblastogenesis of mesenchymal stem cells. *Differentiation.* 82:57-65.
- Dominici M**, Le Blanc K, Mueller I, Slaper-Cortenbach I, Marini F, Krause D, Deans R, Keating A, Prockop Dj, Horwitz E (2006). Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement. *Cytotherapy*; 8:315-17.
- Donzelli E**, Lucchini C, Ballarini E, Scuteri A, Carini F, Tredici G, Miloso M. (2011) ERK1 and ERK2 are involved in recruitment and maturation of human mesenchymal stem cells induced to adipogenic differentiation. *J Mol Cell Biol*; 3:123-31.
- Eghbali-Fatourehchi G**, Khosla S, Sanyal A, Boyle WJ, Lacey DL, Riggs BL. (2003) Role of RANK ligand in mediating increased bone resorption in early postmenopausal women. *J Clin Invest.* 111:1221-30.
- Elberg G**, Gimble JM, Tsai SY (2000). "Modulation of the murine peroxisome proliferator-activated receptor-gamma2 promoter activity by CCAAT/enhancer binding proteins" *J Biol Chem* 275: 27815-27822.
- Elks ML**, Manganiello VC (1985)." A role for soluble cAMP phosphodiesterases in differentiation of 3T3-L1 adipocytes." *J Cell Physiol.* 124:191-98.
- Enomoto H**, Furuichi T, Zanma A, Yamana K, Yoshida C, Sumitani S, Yamamoto H, Enomoto-Iwamoto M, Iwamoto M, Komori T (2004). Runx2 deficiency in chondrocytes causes adipogenic changes in vitro. *J Cell Sci.* 26;117:417-25.
- Farmer SR** (2005). Regulation of PPARgamma activity during adipogenesis. *Int J Obes (Lond).* 29 Suppl 1:S13-6.
- Farombi EO**, Ige OO. (2007) Hypolipidemic and antioxidant effects of ethanolic extract from dried calyx of *Hibiscus sabdariffa* in alloxan-induced diabetic rats. *Fundam Clin Pharmacol.* 21:601-09.
- Farooq A**, Zhou MM (2004) "Structure and regulation of MAPK phosphatases". *Cell Signal*;16:769-779.
- Ferin M**, Morrell M, Xiao E, Kochan L, Qian F, Wright T, Sauer M. (2003) Endocrine and metabolic responses to long-term monotherapy with the antiepileptic drug valproate in the normally cycling rhesus monkey. *J Clin Endocrinol Metab*; 88:2908-15.
- Fève B.** (2005) "Adipogenesis: cellular and molecular aspects." *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab.* 19:483-99.
- Fischer-Posovszky P**, Kukulius V, Tews D, Unterkircher T, Debatin KM, Fulda S, Wabitsch M. (2010) Resveratrol regulates human adipocyte number and function in a Sirt1-dependent manner. *Am J Clin Nutr.* 92(1):5-15.
- Foudah D**, Redondo J, Caldara C, Carini F, Tredici G, Miloso M. (2013) Human mesenchymal stem cells express neuronal markers after osteogenic and adipogenic differentiation. *Cell Mol Biol Lett.* 18:163-86.

- Frankel** EN, Kanner J, German JB, Parks E, Kinsella JE. (1993) "Inhibition of oxidation of human low-density lipoprotein by phenolic substances in red wine". *Lancet*. 20;341:454-57.
- Frankel** EN, Waterhouse AL, Kinsella JE. (1993) "Inhibition of human LDL oxidation by resveratrol." *Lancet*. 24;341:1103-4.
- Friedman** JM, Halaas JL (1998). "Leptin and the regulation of body weight in mammals" *Nature* 22; 395:763-70.
- Galli** C., G. Passeri, G.M. Macaluso. (2010) «Osteocytes and WNT: the Mechanical Control of Bone Formation.» *J Dent Res* 89: 331-343.
- Ge** C, Yang Q, Zhao G, Yu H, Kirkwood KL, Franceschi RT (2012). Interactions between extracellular signal-regulated kinase 1/2 and p38 MAP kinase pathways in the control of RUNX2 phosphorylation and transcriptional activity. *J Bone Miner Res*; 27:538-51.
- Gimble** JM, Robinson CE, Wu X, Kelly KA. (1996) The function of adipocytes in the bone marrow stroma: an update. *Bone*. 19:421-8.
- Gimble** JM, Zvonic S, Floyd ZE, Kassem M, Nuttall ME. (2006) Playing with bone and fat. *J Cell Biochem*. 15;98:251-66.
- Gimble** JM. (1990) The function of adipocytes in the bone marrow stroma. *New Biol*. 2:304-12. Review.
- Glass** DA 2nd, Bialek P, Ahn JD, Starbuck M, Patel MS, Clevers H, Taketo MM, Long F, McMahon AP, Lang RA, Karsenty G. (2005) Canonical Wnt signaling in differentiated osteoblasts controls osteoclast differentiation. *Dev Cell*. 8:751-64.
- Gong** Y, Slee RB, Fukai N, Rawadi G, Roman-Roman S, Reginato AM, Wang H, Cundy T, Glorieux FH, Lev D, Zacharin M, Oexle K, Marcelino J, Suwairi W, Heeger S, Sabatakos G, Apte S, Adkins WN, Allgrove J, Arslan-Kirchner M, Batch JA, Beighton P, Black GC, Boles RG, Boon LM, Borrone C, Brunner HG, Carle GF, Dallapiccola B, De Paepe A, Floege B, Halfhide ML, Hall B, Hennekam RC, Hirose T, Jans A, Jüppner H, Kim CA, Keppler-Noreuil K, Kohlschuetter A, LaCombe D, Lambert M, Lemyre E, Letteboer T, Peltonen L, Ramesar RS, Romanengo M, Somer H, Steichen-Gersdorf E, Steinmann B, Sullivan B, Superti-Furga A, Swoboda W, van den Boogaard MJ, Van Hul W, Vikkula M, Votruba M, Zabel B, Garcia T, Baron R, Olsen BR, Warman ML; (2001) Osteoporosis-Pseudoglioma Syndrome Collaborative Group. LDL receptor-related protein 5 (LRP5) affects bone accrual and eye development. *Cell*. 16;107:513-23.
- Green** H. and Kehinde O (1974). "Sublines of mouse 3T3 cells that accumulate lipid" . *Cell*. 1 : 113-116.
- Gregory** CA, Gunn WG, Peister A, Prockop DJ (2004). An Alizarin red-based assay of mineralization by adherent cells in culture: comparison with cetylpyridinium chloride extraction. *Anal Biochem*. 1;329:77-84.
- Gurrola-Díaz** CM, García-López PM, Sánchez-Enríquez S, Troyo-Sanromán R, Andrade-González I, Gómez-Leyva JF. (2010) Effects of Hibiscus sabdariffa extract powder and preventive treatment (diet) on the lipid profiles of patients with metabolic syndrome (MeSy). *Phytomedicine*. 17:500-05.
- Habas** R, Dawid IB. (2005) Dishevelled and Wnt signaling: is the nucleus the final frontier? *J Biol*;4:2.
- Halade** GV, El Jamali A, Williams PJ, Fajardo RJ, Fernandes G. (2011) Obesity-mediated inflammatory microenvironment stimulates osteoclastogenesis and bone loss in mice. *Exp Gerontol*. 46:43-52.

- Hamm JK, Park BH, Farmer SR (2001).** A role for C/EBPbeta in regulating peroxisome proliferator-activated receptor gamma activity during adipogenesis in 3T3-L1 preadipocytes. *J Biol Chem.* 25;276:18464-71.
- Harada S, Rodan GA (2003).** Control of osteoblast function and regulation of bone mass. *Nature.* 15;423:349-55.
- Hatakeyama Y, Hatakeyama J, Takahashi A, Oka K, Tsuruga E, Inai T, Sawa Y. (2011)** The effect of valproic Acid on mesenchymal pluripotent cell proliferation and differentiation in extracellular matrices. *Drug Target Insights.* 5:1-9.
- Herrera-Arellano A, Flores-Romero S, Chávez-Soto MA, Tortoriello J. (2004)** Effectiveness and tolerability of a standardized extract from *Hibiscus sabdariffa* in patients with mild to moderate hypertension: a controlled and randomized clinical trial. *Phytomedicine.* 11:375-82
- Herrera-Arellano A, Miranda-Sánchez J, Avila-Castro P, Herrera-Alvarez S, Jiménez-Ferrer JE, Zamilpa A, Román-Ramos R, Ponce-Monter H, Tortoriello J. (2007)** Clinical effects produced by a standardized herbal medicinal product of *Hibiscus sabdariffa* on patients with hypertension. A randomized, double-blind, lisinopril-controlled clinical trial. *Planta Med.* 73:6-12.
- Higuchi C, Myoui A, Hashimoto N, Kuriyama K, Yoshioka K, Yoshikawa H, Itoh K. (2002)** Continuous inhibition of MAPK signaling promotes the early osteoblastic differentiation and mineralization of the extracellular matrix. *J Bone Miner Res.* 17:1785-94.
- Hill T.P. (2005)** «Canonical Wnt/beta catenin signaling prevents osteoblasts from differentiating into chondrocytes.» *Dev Cell* 8, n. 5 727-736.
- Hirunpanich V, Utaipat A, Morales NP, Bunyapraphatsara N, Sato H, Herunsale A, Suthisisang C. (2006)** Hypocholesterolemic and antioxidant effects of aqueous extracts from the dried calyx of *Hibiscus sabdariffa* L. in hypercholesterolemic rats. *J Ethnopharmacol.* 16;103:252-60.
- Hoepfner LH, Secreto FJ, Westendorf JJ. (2009)** Wnt signaling as a therapeutic target for bone diseases. *Expert Opin Ther Targets.* 13:485-96.
- Holes-Lewis KA, Malcolm R, O'Neil PM. (2013)** Pharmacotherapy of obesity: clinical treatments and considerations. *Am J Med Sci.* 345:284-88.
- Hopkins AL, Lamm MG, Funk JL, Ritenbaugh C. (2013)** *Hibiscus sabdariffa* L. in the treatment of hypertension and hyperlipidemia: a comprehensive review of animal and human studies. *Fitoterapia.* 85:84-94.
- Hu Y, Davies GE. (2009)** Berberine increases expression of GATA-2 and GATA-3 during inhibition of adipocyte differentiation. *Phytomedicine.* 16:864-73.
- Hu Y, Davies GE. (2010)** Berberine inhibits adipogenesis in high-fat diet-induced obesity mice. *Fitoterapia.* 81:358-66.
- Hu Y, Fahmy H, Zjawiony JK, Davies GE. (2010)** Inhibitory effect and transcriptional impact of berberine and evodiamine on human white preadipocyte differentiation. *Fitoterapia.* 81:259-68.
- Huang C, Zhang Y, Gong Z, Sheng X, Li Z, Zhang W, Qin Y. (2006)** Berberine inhibits 3T3-L1 adipocyte differentiation through the PPARgamma pathway. *Biochem Biophys Res Commun.* 22;348:571-78.

- Ikarashi** N, Tajima M, Suzuki K, Toda T, Ito K, Ochiai W, Sugiyama K. (2012) Inhibition of preadipocyte differentiation and lipid accumulation by Oregedokuto treatment of 3T3-L1 cultures. *Phytother Res.* 26:91-100.
- Jaiswal** RK, Jaiswal N, Bruder SP, Mbalaviele G, Marshak DR, Pittenger MF. (2000) Adult human mesenchymal stem cell differentiation to the osteogenic or adipogenic lineage is regulated by mitogen-activated protein kinase. *J Biol Chem.* 31;275:9645-52.
- Jallon** P, Picard F. (2001) Bodyweight gain and anticonvulsants: a comparative review. *Drug Saf;* 24:969-78.
- Janderová** J, McNeil M, Murrell AN, Mynatt RL, Smith SR. (2003) “Human mesenchymal stem cells as an in vitro model for human adipogenesis” *Obesity research;*11:65-74.
- Javed** A, MSc, PhD,<sup>a</sup> Haiyan Chen, PhD,<sup>b</sup> and Farah Y. Ghori, MD<sup>c</sup> (2010). Genetic and Transcriptional Control of Bone Formation *Oral Maxillofac Surg Clin North Am.* 22: 283–293.
- Jiang** Y, Jahagirdar BN, Reinhardt RL, Schwartz RE, Keene CD, Ortiz-Gonzalez XR, Reyes M, Lenvik T, Lund T, Blackstad M, Du J, Aldrich S, Lisberg A, Low WC, Largaespada DA, Verfaillie CM (2002). Pluripotency of mesenchymal stem cells derived from adult marrow. *Nature* 418:41-49.
- Johannessen** CU, Johannessen SI. (2003) Valproate: past, present, and future. *CNS Drug Rev.* Summer;9:199-216. Review.
- Kang** S, Bennett CN, Gerin I, Rapp LA, Hankenson KD, Macdougald OA. (2007) Wnt signaling stimulates osteoblastogenesis of mesenchymal precursors by suppressing CCAAT/enhancer-binding protein alpha and peroxisome proliferator-activated receptor gamma *J Biol Chem.* 11;282:14515-24.
- Kato** M, Patel MS, Levasseur R, Lobov I, Chang BH, Glass DA 2nd, Hartmann C, Li L, Hwang TH, Brayton CF, Lang RA, Karsenty G, Chan L. (2002) Cbfa1-independent decrease in osteoblast proliferation, osteopenia, and persistent embryonic eye vascularization in mice deficient in Lrp5, a Wnt coreceptor. *J Cell Biol.* 15;157:303-14.
- Katoh** M, Katoh M. (2007) WNT signaling pathway and stem cell signaling network. *Clin Cancer Res.* 15;13:4042-45.
- Kawai** M, Mushiake S, Bessho K, Murakami M, Namba N, Kokubu C, Michigami T, Ozono K. (2007) Wnt/Lrp/beta-catenin signaling suppresses adipogenesis by inhibiting mutual activation of PPARgamma and C/EBPalph. *Biochem Biophys Res Commun.* 16;363:276-82.
- Kim** JB, Wright HM, Wright M, Spiegelman BM (1998). ADD1/SREBP1 activates PPARgamma through the production of endogenous ligand. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 14;95:4333-37.
- Kim** JH, Liu X, Wang J, Chen X, Zhang H, Kim SH, Cui J, Li R, Zhang W, Kong Y, Zhang J, Shui W, Lamplot J, Rogers MR, Zhao C, Wang N, Rajan P, Tomal J, Statz J, Wu N, Luu HH, Haydon RC, He TC. (2013) Wnt signaling in bone formation and its therapeutic potential for bone diseases. *Ther Adv Musculoskelet Dis.* 5:13-31.
- Kim** JK, So H, Youn MJ, Kim HJ, Kim Y, Park C, Kim SJ, Ha YA, Chai KY, Kim SM, Kim KY, Park R. (2007) Hibiscus sabdariffa L. water extract inhibits the adipocyte differentiation through the PI3-K and MAPK pathway. *J Ethnopharmacol.* 1;114:260-70.
- Kim** SH, Shin EJ, Kim ED, Bayaraa T, Frost SC, Hyun CK. (2007) Berberine activates GLUT1-mediated glucose uptake in 3T3-L1 adipocytes. *Biol Pharm Bull.* 30:2120-25.

- Kim SW**, Muise AM, Lyons PJ, Ro HS. (2002) "Regulation of adipogenesis by a transcriptional repressor that modulates MAPK activation". *J Biol Chem* 276: 10199-10206.
- Kirton JP**, Crofts NJ, George SJ, Brennan K, Canfield AE. (2007) Wnt/beta-catenin signaling stimulates chondrogenic and inhibits adipogenic differentiation of pericytes: potential relevance to vascular disease? *Circ Res.* 14;101:581-89.
- Kohno M**, Pouyssegur J. (2003) "Pharmacological inhibitors of the ERK signaling pathway: application as anticancer drugs" *Prog. Cell. Cycle Res.* 5: 219-224.
- Komori T.** (2006) Regulation of osteoblast differentiation by transcription factors. *J Cell Biochem.* 1;99:1233-39.
- Kong W**, Wei J, Abidi P, Lin M, Inaba S, Li C, Wang Y, Wang Z, Si S, Pan H, Wang S, Wu J, Wang Y, Li Z, Liu J, Jiang JD. (2004) "Berberine is a novel cholesterol-lowering drug working through a unique mechanism distinct from statins." *Nat Med* 10:1344–1351.
- Kopelman PG.** (2000) Obesity as a medical problem. *Nature.* 6;404:635-43.
- Krings A**, Rahman S, Huang S, Lu Y, Czernik PJ, Lecka-Czernik B. (2012) Bone marrow fat has brown adipose tissue characteristics, which are attenuated with aging and diabetes. *Bone.* 50:546-52.
- Lagace DC**, Nachtigal MW. (2004) Inhibition of histone deacetylase activity by valproic acid blocks adipogenesis. *J Biol Chem.* 30;279:18851-60.
- Lee HW**, Suh JH, Kim HN, Kim AY, Park SY, Shin CS, Choi JY, Kim JB. (2008) Berberine promotes osteoblast differentiation by Runx2 activation with p38 MAPK. *J Bone Miner Res.* 23:1227-37.
- Lee MH**, Kim YJ, Kim HJ, Park HD, Kang AR, Kyung HM, Sung JH, Wozney JM, Kim HJ, Ryoo HM (2003). BMP-2-induced Runx2 expression is mediated by Dlx5, and TGF-beta 1 opposes the BMP-2-induced osteoblast differentiation by suppression of Dlx5 expression. *J Biol Chem.* 5;278:34387-94.
- Lee S**, Park JR, Seo MS, Roh KH, Park SB, Hwang JW, Sun B, Seo K, Lee YS, Kang SK, Jung JW, Kang KS. (2009) Histone deacetylase inhibitors decrease proliferation potential and multilineage differentiation capability of human mesenchymal stem cells. *Cell Prolif.* 42:711-20.
- Li H**, Miyahara T, Tezuka Y, Tran QL, Seto H, Kadota S. (2003) Effect of berberine on bone mineral density in SAMP6 as a senile osteoporosis model. *Biol Pharm Bull.* 26:110-11.
- Lin FT**, Lane MD (1992). Antisense CCAAT/enhancer-binding protein RNA suppresses coordinate gene expression and triglyceride accumulation during differentiation of 3T3-L1 preadipocytes. *Genes Dev.* 6:533-44.
- Lippuner K.** (2012) The future of osteoporosis treatment - a research update. *Swiss Med Wkly.* 19;142:w13624.
- Little RD**, Carulli JP, Del Mastro RG, Dupuis J, Osborne M, Folz C, Manning SP, Swain PM, Zhao SC, Eustace B, Lappe MM, Spitzer L, Zweier S, Braunschweiger K, Benchekroun Y, Hu X, Adair R, Chee L, FitzGerald MG, Tulig C, Caruso A, Tzellas N, Bawa A, Franklin B, McGuire S, Noguees X, Gong G, Allen KM, Anisowicz A, Morales AJ, Lomedico PT, Recker SM, Van Eerdewegh P, Recker RR, Johnson ML. (2002) A mutation in the LDL receptor-related protein 5 gene results in the autosomal dominant high-bone-mass trait. *Am J Hum Genet.* 70:11-9.

- Liu J, Farmer SR.** (2004) Regulating the balance between peroxisome proliferator-activated receptor gamma and beta-catenin signaling during adipogenesis. A glycogen synthase kinase 3beta phosphorylation-defective mutant of beta-catenin inhibits expression of a subset of adipogenic genes. *J Biol Chem.* 22;279:45020-27.
- Liu JY, Chen CC, Wang WH, Hsu JD, Yang MY, Wang CJ.**(2006) The protective effects of Hibiscus sabdariffa extract on CCl4-induced liver fibrosis in rats.*Food Chem Toxicol.*44:336-43.
- Liu LF, Shen WJ, Zhang ZH, Wang LJ, Kraemer FB.** (2010) Adipocytes decrease Runx2 expression in osteoblastic cells: roles of PPAR $\gamma$  and adiponectin. *J Cell Physiol.* 225:837-45.
- Liu W, Toyosawa S, Furuichi T, Kanatani N, Yoshida C, Liu Y, Himeno M, Narai S, Yamaguchi A, Komori T** (2001). Overexpression of Cbfa1 in osteoblasts inhibits osteoblast maturation and causes osteopenia with multiple fractures. *J Cell Biol.* 1;155:157-66.
- Liu ZP, Li WX, Yu B, Huang J, Sun J, Huo JS, Liu CX.** (2005) Effects of trans-resveratrol from Polygonum cuspidatum on bone loss using the ovariectomized rat model. *J Med Food.* Spring;8:14-19.
- Logan CY, Nusse R.** (2004) The Wnt signaling pathway in development and disease. *Annu Rev Cell Dev Biol.* 20:781-810.
- Long MW** (2001). Osteogenesis and bone-marrow-derived cells. *Blood Cells Mol Dis.* 27:677-90.
- Löscher W.** (1999) Valproate: a reappraisal of its pharmacodynamic properties and mechanisms of action. *Prog Neurobiol.* 58:31-59. Review.
- Lucas A, Quinlan P, Abrams S, Ryan S, Meah S, Lucas PJ.** (1997) Randomised controlled trial of a synthetic triglyceride milk formula for preterm infants. *Arch Dis Child Fetal Neonatal Ed.* 77:F178-84.
- Manolagas SC, Almeida M.** (2007) Gone with the Wnts: beta-catenin, T-cell factor, forkhead box O, and oxidative stress in age-dependent diseases of bone, lipid, and glucose metabolism. *Mol Endocrinol.* 21:2605-14.
- Mark L Johnson** (2012) LRP5 and bone mass regulation: Where are we now? *Bonekey Rep.* 2012; 1: 1. Published online
- Marshall CJ.** (1995) "Specificity of receptor tyrosine kinase signaling: transient versus sustained extracellular signal-regulated kinase activation". *Cell;* 80:179-185
- Matsubara T, Kida K, Yamaguchi A, Hata K, Ichida F, Meguro H, Aburatani H, Nishimura R, Yoneda T** (2008). BMP2 regulates Osterix through Msx2 and Runx2 during osteoblast differentiation. *J Biol Chem.* 24;283:29119-25.
- Minguell JJ, Erices A, Conget P** (2001). "Mesenchymal stem cells". *Exp Biol Med.* 266:507-520.
- Mizutani K, Ikeda K, Kawai Y, Yamori Y.** (1998) Resveratrol stimulates the proliferation and differentiation of osteoblastic MC3T3-E1 cells. *Biochem Biophys Res Commun.* 30;253:859-63.
- Mobasheri A, Shakibaei M.** (2013) Osteogenic effects of resveratrol in vitro: potential for the prevention and treatment of osteoporosis. *Ann N Y Acad Sci.* 1290:59-66.
- Monroe DG, McGee-Lawrence ME, Oursler MJ, Westendorf JJ.** (2012) Update on Wnt signaling in bone cell biology and bone disease. *Gene.* 15;492:1-18.
- Morrison RF, Farmer SR** (2000). Hormonal signaling and transcriptional control of adipocyte differentiation. *J Nutr.* 130:3116S-3121S.

**Mundy GR.** (2007) Osteoporosis and inflammation. *Nutr Rev.* 65:S147-51.

**Muraglia A, Cancedda R, Quarto R** (2000). "Clonal mesenchymal progenitors from human bone marrow differentiate in vitro according to a hierarchical model." *J Cell Sci.* 113 :1161-66.

**Müssig K, Remer T, Maser-Gluth C.** (2010) Brief review: glucocorticoid excretion in obesity. *J Steroid Biochem Mol Biol.* 121:589-93.

**Nakashima K, Zhou X, Kunkel G, Zhang Z, Deng JM, Behringer RR, de Crombrughe B** (2002). The novel zinc finger-containing transcription factor osterix is required for osteoblast differentiation and bone formation. *Cell.* 11;108:17-29.

**Neubauer M, Fischbach C, Bauer-Kreisel P, Lieb E, Hacker M, Tessmar J, Schulz MB, Goepferich A, Blunk T** (2004). "Basic fibroblast growth factor enhances PPARgamma ligand-induced adipogenesis of mesenchymal stem cells." *FEBS Lett.* 5;577:277-83.

**Nusse R, Varmus HE.** (1982) Many tumors induced by the mouse mammary tumor virus contain a provirus integrated in the same region of the host genome. *Cell.* 31:99-109.

**Nuttall ME, Patton AJ, Olivera DL, Nadeau DP, Gowen M** (1998). "Human trabecular bone cells are able to express both osteoblastic and adipocytic phenotype: implications for osteopenic disorders" *J Bone Miner Res.*;13:371-82.

**Okamura M, Kudo H, Wakabayashi K, Tanaka T, Nonaka A, Uchida A, Tsutsumi S, Sakakibara I, Naito M, Osborne TF, Hamakubo T, Ito S, Aburatani H, Yanagisawa M, Kodama T, Sakai J.** (2009) COUP-TFII acts downstream of Wnt/beta-catenin signal to silence PPARgamma gene expression and repress adipogenesis. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 7;106:5819-24.

**Onyenekwe PC, Ajani EO, Ameh DA, Gamaniel KS.** (1999) Antihypertensive effect of roselle (*Hibiscus sabdariffa*) calyx infusion in spontaneously hypertensive rats and a comparison of its toxicity with that in Wistar rats. *Cell Biochem Funct.* 17:199-206.

**Owens MJ, Nemeroff CB.** (2003) Pharmacology of valproate. *Psychopharmacol Bull;* 37 Suppl 2:17-24. Review.

**Palacios C.** (2006) The role of nutrients in bone health, from A to Z. *Crit Rev Food Sci Nutr.* 46:621-28.

**Papapoulos SE.** (2011) Targeting sclerostin as potential treatment of osteoporosis. *Ann Rheum Dis.* 70 Suppl 1:i119-22.

**Park BH, Qiang L, Farmer SR** (2004). Phosphorylation of C/EBPbeta at a consensus extracellular signal-regulated kinase/glycogen synthase kinase 3 site is required for the induction of adiponectin gene expression during the differentiation of mouse fibroblasts into adipocytes. *Mol Cell Biol.* 24:8671-80.

**Pavlin D, Dove SB, Zadro R, Gluhak-Heinrich J** (2000). Mechanical loading stimulates differentiation of periodontal osteoblasts in a mouse osteoinduction model: effect on type I collagen and alkaline phosphatase genes. *Calcif Tissue Int.* 67:163-72.

**Pavlin D, Zadro R, Gluhak-Heinrich J** (2001). Temporal pattern of stimulation of osteoblast-associated genes during mechanically-induced osteogenesis in vivo: early responses of osteocalcin and type I collagen. *Connect Tissue Res;* 42:135-48.

**Pazin MJ, Kadonaga JT.** (1997) What's up and down with histone deacetylation and transcription? *Cell.* 2;89:325-28.

- Pham TP, Kwon J, Shin J.** (2011) Berberine exerts anti-adipogenic activity through up-regulation of C/EBP inhibitors, CHOP and DEC2. *Biochem Biophys Res Commun.* 23;413:376-82.
- Picard F, Kurtev M, Chung N, Topark-Ngarm A, Senawong T, Machado De Oliveira R, Leid M, McBurney MW, Guarente L.** (2004) “ Sirt1 promotes fat mobilization in white adipocytes by repressing PPAR-gamma.” *Nature* 429:771-76.
- Pittenger MF, Mackay AM, Beck SC, Jaiswal RK, Douglas R, Mosca JD, Moorman MA, Simonetti DW, Craig S, Marshak DR** (1999). Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells. *Science.* 2;284:143-47.
- Prusty D, Park BH, Davis KE, Farmer SR** (2002) “Activation of MEK/ERK Signaling Promotes Adipogenesis by Enhancing Peroxisome Proliferator-activated receptor  $\gamma$  (PPAR $\gamma$ ) and C/EBP $\beta$  Gene Expression during the Differentiation of 3T3-L1 Preadipocytes”. *J Biol Chem* 48:46226-46232.
- Qi-Qun Tang, Mads Gronborg, Haiyan Huang, Jae-Woo Kim, Tamara C. Otto, Akhilesh Pandey and M. Daniel Lane.** (2005) “Sequential phosphorylation of CCAAT enhancer-binding protein  $\beta$  by MAPK and glycogen synthase kinase 3  $\beta$  is required for adipogenesis”. *Proc Natl Acad Sci USA*;102: 9767-9771.
- Rachner TD, Khosla S, Hofbauer LC.** (2011) Osteoporosis: now and the future. *Lancet.* 2011 Apr 9;377:1276-87.
- Rangwala SM, Lazar MA** (2000). “Transcriptional control of adipogenesis”. *Annu. Rev Nutr.* 20:535-559.
- Rao TP, Kühl M.** (2010) An updated overview on Wnt signaling pathways: a prelude for more. *Circ Res.* 25;106:1798-806.
- Rayalam S, Della-Fera MA, Baile CA.** (2007) “Phytochemicals and regulation of the adipocyte life cycle.” *J Nutr Biochem.* 19:717-26.
- Rosen CJ, Ackert-Bicknell C, Rodriguez JP, Pino AM.** (2009) Marrow fat and the bone microenvironment: developmental, functional, and pathological implications. *Crit Rev Eukaryot Gene Expr.* 19:109-24.
- Rosen ED** (2002). “The molecular control of adipogenesis with special reference to lymphatic pathology”. *Ann. NY. Acad. Sci.* 979:143-158.
- Rosen ED, MacDougald OA.** (2006) Adipocyte differentiation from the inside out. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 7:885-96.
- Rosen ED, Spiegelman BM** (2000). Molecular regulation of adipogenesis. *Annu Rev Cell Dev Biol.* 16:145-71.
- Rosen ED, Spiegelman BM** (2001). “PPARgamma: a nuclear regulator of metabolism, differentiation, and cell growth”. *J Biol Chem.* 276: 37731-37734.
- Rosen ED.** (2005) “The transcriptional basis of adipocyte development”. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids.* 73:31-34.
- Ross IA** (2003) Hibiscus Sabdariffa. In *Medicinal Plants of the World, Vol1, 2nd edn.* Humana Press: New Jersey, 267-275.
- Ross SE, Hemati N, Longo KA, Bennett CN, Lucas PC, Erickson RL, MacDougald OA.** (2000) Inhibition of adipogenesis by Wnt signaling. *Science.* 11;289:950-53.

**Rubinfeld**, B.; Souza, B.; Albert, I.; Muller, O.; Chamberlain, S.H.; Masiarz, F.R.; Munemitsu, S.; Polakis, P. (1993) Association of the APC gene product with beta-catenin. *Science*, 262,1731-1734.

**Sadie-Van Gijzen** H, Crowther NJ, Hough FS, Ferris WF. (2013) The interrelationship between bone and fat: from cellular see-saw to endocrine reciprocity. *Cell Mol Life Sci*. 70:2331-49.

**Sale** EM, Atkinson PG, Sale GJ. (1995) "Requirement of MAP kinase for differentiation of fibroblasts to adipocytes, for insulin activation of p90 S6 kinase and for insulin or serum stimulation of DNA synthesis". *EMBO J*. 1995; 14:674-684.

**Salvadè** A, Belotti D, Donzelli E, D'Amico G, Gaipa G, Renoldi G, Carini F, Baldoni M, Pogliani E, Tredici G, Biondi A, Biagi E. (2007) GMP-grade preparation of biomimetic scaffolds with osteo-differentiated autologous mesenchymal stromal cells for the treatment of alveolar bone resorption in periodontal disease. *Cytotherapy*. 9:427-38.

**Sarr** M, Ngom S, Kane MO, Wele A, Diop D, Sarr B, Gueye L, Andriantsitohaina R, Diallo AS. (2009) In vitro vasorelaxation mechanisms of bioactive compounds extracted from *Hibiscus sabdariffa* on rat thoracic aorta. *Nutr Metab (Lond)*. 2;6:45. doi: 10.1186/1743-7075-6-45.

**Schindeler** A, Little DG (2006). Ras-MAPK signaling in osteogenic differentiation: friend or foe? *J Bone Miner Res*.21:1331-38

**Schroeder** TM, Westendorf JJ. (2005) Histone deacetylase inhibitors promote osteoblast maturation. *J Bone Miner Res*. 20:2254-63.

**Segura-Carretero** A, Puertas-Mejía MA, Cortacero-Ramírez S, Beltrán R, Alonso-Villaverde C, Joven J, Dinelli G, Fernández-Gutiérrez A. (2008) Selective extraction, separation, and identification of anthocyanins from *Hibiscus sabdariffa* L. using solid phase extraction-capillary electrophoresis-mass spectrometry (time-of-flight /ion trap). *Electrophoresis*. 2008 Jul;29:2852-61.

**Sekiya** I, Vuoristo JT, Larson BL, Prockop DJ (2002). In vitro cartilage formation by human adult stem cells from bone marrow stroma defines the sequence of cellular and molecular events during chondrogenesis. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2;99:4397-402.

**Shakibaei** M, Buhrmann C, Mobasheri A. (2011) Resveratrol-mediated SIRT-1 interactions with p300 modulate receptor activator of NF-kappaB ligand (RANKL) activation of NF-kappaB signaling and inhibit osteoclastogenesis in bone-derived cells. *J Biol Chem*. 1;286:11492-505.

**Shakibaei** M, Harikumar KB, Aggarwall BB. (2009) "Resveratrol addiction: to die or not to die" *Mol. Nutr. Food Res*. 53: 115-128.

**Shakibaei** M, Shayan P, Busch F, Aldinger C, Buhrmann C, Lueders C, Mobasheri A. (2012) Resveratrol mediated modulation of Sirt-1/Runx2 promotes osteogenic differentiation of mesenchymal stem cells: potential role of Runx2 deacetylation. *PLoS One*. 7:e35712.

**Shao** D, Rangwala SM, Bailey ST, Krakow SL, Reginato MJ, Lazar MA (1998). Interdomain communication regulating ligand binding by PPAR-gamma. *Nature*. 26;396:377-80.

**Shockley** KR, Lazarenko OP, Czernik PJ, Rosen CJ, Churchill GA, Lecka-Czernik B. (2009) PPARgamma2 nuclear receptor controls multiple regulatory pathways of osteoblast differentiation from marrow mesenchymal stem cells. *J Cell Biochem*. 1;106:232-46.

**Siersbaek** R, Nielsen R, Mandrup S. (2010). PPARgamma in adipocyte differentiation and metabolism--novel insights from genome-wide studies. *FEBS Lett*. 4;584:3242-49.

- Sugimura R, Li L.** (2010) Noncanonical Wnt signaling in vertebrate development, stem cells, and diseases. *Birth Defects Res C Embryo Today.* 90:243-56.
- St Leger AS, Cochrane AL, Moore F.** (1979) Factors associated with cardiac mortality in developed countries with particular reference to the consumption of wine. *Lancet,* 1:1017–20.
- Stunkard AJ, Sørensen TI, Hanis C, Teasdale TW, Chakraborty R, Schull WJ, Schulsinger F.** (1986) An adoption study of human obesity. *N Engl J Med.* 23;314:193-98.
- Takada I, Mihara M, Suzawa M, Ohtake F, Kobayashi S, Igarashi M, Youn MY, Takeyama K, Nakamura T, Mezaki Y, Takezawa S, Yogiashi Y, Kitagawa H, Yamada G, Takada S, Minami Y, Shibuya H, Matsumoto K, Kato S.** (2007) A histone lysine methyltransferase activated by non-canonical Wnt signalling suppresses PPAR-gamma transactivation. *Nat Cell Biol.* 9:1273-85.
- Tanaka T, Yoshida N, Kishimoto T, Akira S** (1997). Defective adipocyte differentiation in mice lacking the C/EBPbeta and/or C/EBPdelta gene. *EMBO J.* 15;16:7432-43.
- Tang QQ, Otto TC, Lane MD.** (2003) “Mitotic clonal expansion: a synchronous process required for adipogenesis” *Proc Natl Acad Sci;*100:44–49
- Tang QQ, Lane MD.** (2012) Adipogenesis: from stem cell to adipocyte. *Annu Rev Biochem;*81:715-36.
- Tedesco L, M.O. Carruba, E. Nisoli** (2008) Tessuto adiposo come organo endocrino. *G It Diabetol Metab* 2008;28:90-100.
- Tominaga S, Yamaguchi T, Takahashi SI, Hirose F, Osumia T.** (2005) “Negative regulation of adipogenesis from human mesenchymal stem cells by Jun N-terminal kinase”. *Biochem Biophys Res Commun* 326:499-504.
- Tondreau T, Meuleman N, Delforge A, Dejefeffe M, Leroy R, Massy M, Mortier C, Bron D, Lagneaux L** (2005). Mesenchymal stem cells derived from CD133-positive cells in mobilized peripheral blood and cord blood: proliferation, Oct4 expression, and plasticity. *Stem Cells.* 23:1105-12.
- Tontonoz P, Hu E, Devine J, Beale EG, Spiegelman BM** (1995). PPAR gamma 2 regulates adipose expression of the phosphoenolpyruvate carboxykinase gene. *Mol Cell Biol.* 15:351-57.
- Tontonoz P, Hu E, Spiegelman BM.** (1994) Stimulation of adipogenesis in fibroblasts by PPAR gamma 2, a lipid-activated transcription factor. *Cell.* 30;79:1147-56.
- Tontonoz P, Spiegelman BM.** (2008) Fat and beyond: the diverse biology of PPARgamma. *Annu Rev Biochem.* 2008;77:289-312.
- Tsai AG, Wadden TA.** (2013) In the clinic: obesity. *Ann Intern Med.* 2013 Sep 3;159:ITC3-1-ITC3-15; quiz ITC3-16.
- van Dielen FM, van't Veer C, Schols AM, Soeters PB, Buurman WA, Greve JW.** (2001) Increased leptin concentrations correlate with increased concentrations of inflammatory markers in morbidly obese individuals. *Int J Obes Relat Metab Disord.* 25:1759-66.
- Verrotti A, Basciani F, Morresi S, de Martino M, Morgese G, Chiarelli F.** (1999) Serum leptin changes in epileptic patients who gain weight after therapy with valproic acid. *Neurology.* 13;53:230-32.
- Vladar, E.K., Antic, D. and Axelrod, J.D.** (2009) Planar cell polarity signaling: the developing cell's compass. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology* 1: a002964.

- Vuddanda PR**, Chakraborty S, Singh S. (2010) Berberine: a potential phytochemical with multispectrum therapeutic activities. *Expert Opin Investig Drugs*. 19:1297-307.
- Wagner ER**, Zhu G, Zhang BQ, Luo Q, Shi Q, Huang E, Gao Y, Gao JL, Kim SH, Rastegar F, Yang K, He BC, Chen L, Zuo GW, Bi Y, Su Y, Luo J, Luo X, Huang J, Deng ZL, Reid RR, Luu HH, Haydon RC, He TC. (2011) The therapeutic potential of the Wnt signaling pathway in bone disorders *Curr Mol Pharmacol*. 4:14-25.
- Wang CJ**, Wang JM, Lin WL, Chu CY, Chou FP, Tseng TH. (2000) Protective effect of Hibiscus anthocyanins against tert-butyl hydroperoxide-induced hepatic toxicity in rats. *Food Chem Toxicol*. 38:411-16.
- Warriner AH**, Saag KG. (2013) Osteoporosis diagnosis and medical treatment. *Orthop Clin North Am*. 44:125-35.
- Weissman IL**, Anderson DJ, Gage F (2001). Stem and progenitor cells: Origins, phenotypes, lineage commitments, and transdifferentiations. *Annu Rev Cell Dev Biol* 17:387-403.
- Wellen KE**, Hotamisligil GS. (2003) Obesity-induced inflammatory changes in adipose tissue. *J Clin Invest*. 112:1785-88.
- Wolden-Hanson T**, Gidal BE, Atkinson RL. (1998) Evaluation of a rat model of valproate-induced obesity. *Pharmacotherapy*. 18:1075-81.
- Wright WS**, Longo KA, Dolinsky VW, Gerin I, Kang S, Bennett CN, Chiang SH, Prestwich TC, Gress C, Burant CF, Susulic VS, MacDougald OA. (2007) Wnt10b inhibits obesity in ob/ob and agouti mice. *Diabetes*. 56:295-303.
- Wu Z**, Bucher NL, Farmer SR (1996). "Induction of peroxisome proliferator-activated receptor gamma during the conversion of 3T3 fibroblasts into adipocytes is mediated by C/EBPbeta, C/EBPdelta, and glucocorticoids." *Mol Cell Biol*. 16:4128-36.
- Xiao G**, Jiang D, Thomas P, Benson MD, Guan K, Karsenty G, Franceschi RT. (2000) MAPK pathways activate and phosphorylate the osteoblast-specific transcription factor, Cbfa1. *J Biol Chem*. 11;275:4453-59.
- Xu D**, Yang W, Zhou C, Liu Y, Xu B. (2010) Preventive effects of berberine on glucocorticoid-induced osteoporosis in rats. *Planta Med*. 76:1809-13.
- Yin J**, Zhang H, Ye J. (2008) Traditional chinese medicine in treatment of metabolic syndrome. *Endocr Metab Immune Disord Drug Targets*. 8:99-111.
- Yoon S**, Seger R. (2006) "The extracellular signal-regulated kinase: multiple substrates regulate diverse cellular functions". *Growth Factors*; 24:21-44.
- Zachow RJ**, Magoffin DA (1997). "Direct intraovarian effects of leptin: impairment of the synergistic action of insulin-like growth factor-I on follicle-stimulating hormone-dependent estradiol-17 beta production by rat ovarian granulosa cells". *Endocrinology*. 138:847-50.
- Zarubin T**, Han J. (2005) "Activation and signaling of the p38 MAP kinase pathway". *Cell Res*; 15:11–18.
- Zhang Y**, Khan D, Delling J, Tobiasch E (2012). Mechanisms underlying the osteo- and adipodifferentiation of human mesenchymal stem cells. *ScientificWorldJournal*; 2012:793823.
- Zhao LJ**, Jiang H, Papasian CJ, Maulik D, Drees B, Hamilton J, Deng HW. (2008) Correlation of obesity and osteoporosis: effect of fat mass on the determination of osteoporosis. *J Bone Miner Res*;23:17-29.

**Zhou S**, Eid K, Glowacki J. (2004) Cooperation between TGF-beta and Wnt pathways during chondrocyte and adipocyte differentiation of human marrow stromal cells. *J Bone Miner Res*; 19:463-70.

**Zimmermann S**, Voss M, Kaiser S, Kapp U, Waller CF, Martens UM (2003). Lack of telomerase activity in human mesenchymal stem cells. *Leukemia* 17:1146-1149.

**Zippel N**, Limbach CA, Ratajski N, Urban C, Luparello C, Pansky A, Kassack MU, Tobiasch E (2012). Purinergic receptors influence the differentiation of human mesenchymal stem cells. *Stem Cells Dev.* 10;21:884-900.

**Zuo Y**, Qiang L, Farmer SR. (2006) Activation of CCAAT/enhancer-binding protein (C/EBP) alpha expression by C/EBP beta during adipogenesis requires a peroxisome proliferator-activated receptor-gamma-associated repression of HDAC1 at the C/ebp alpha gene promoter. *J Biol Chem.* 24;281:7960-67.

# ***PRESENTAZIONI A CONGRESSI***

Nel corso dei tre anni di Scuola di Dottorato in Neuroscienze, il lavoro svolto nell'ambito di questo progetto è stato presentato ai seguenti congressi:

*“Evaluation of Valproic Acid, Valpromide and Hibiscus sabdariffa effects on adipogenic and osteogenic differentiation of human Mesenchymal Stem Cells”*. C. Caldara, E. Donzelli, D. Foudah, G. Tredici, M. Miloso. Stem Cell Research Italy, Brescia 27-29 giugno 2013

*“Evaluation of Hibiscus Sabdariffa effects on adipogenic and osteogenic differentiation of human Mesenchymal Stem Cells (hMSC)”*, Caldara Cristina, Donzelli Elisabetta, Dana Foudah, Tredici Giovanni, Miloso Mariarosaria. Stem Cell Research Italy, Ferrara 20-22 giugno 2012.

*“Effects of valproic acid, berberin and resveratrol on human mesenchymal stem cells adipogenic differentiation”* Elisabetta Donzelli, Gabriella Nicoli, Cristina Caldara, Arianna Scuteri, Mariarosaria Miloso. 65° Congresso della società Italiana di Anatomia e Istologia, Padova 27-29 settembre 2011.

*“Evaluation of valproic acid, berberin and resveratrol effects on adipogenic differentiation of human mesenchymal stem cells”* Caldara C., Donzelli E., Tredici G., Miloso M. International Society For Cellular Therapy-Europe, Joint Meeting SCR ITALY, Montesilvano (PE) 10-11-12 giugno 2011.

*“Evaluation of Valproic Acid, Berberin and Resveratrol effects on adipogenic differentiation of human Mesenchymal Stem Cells”*  
Caldara Cristina, Donzelli Elisabetta, Tredici Giovanni, Miloso Mariarosaria. Third meeting of forum of italian researchers on mesenchymal and stromal stem cells (18 aprile 2011).