

Recettore cannabinoide 2 come bersaglio antiobesità: infiammazione, accumulo di grasso e modulazione di brunitura

Astratto

Contesto:

L'obesità è associata a uno stato infiammatorio di basso grado e iperplasia / ipertrofia degli adipociti (ADP). L'obesità inibisce la "doratura" del tessuto adiposo bianco. Gli agonisti del recettore cannabinoide 2 (CB2) riducono l'assunzione di cibo e inducono l'effetto antiobesità nei topi. Una variante CB2 missenso comune, Q63R, causa la funzione ridotta di CB2.

Obbiettivo:

Valutare l'influenza del recettore CB2 sulla modulazione dell'obesità infantile e dell'attività e della morfologia dell'ADP.

Design:

La variante CB2-Q63R è stata analizzata in bambini obesi italiani. Gli effetti di uno stimolo infiammatorio e quelli dei farmaci che agiscono selettivamente su CB2 sono stati studiati su ADP in vitro ottenuti da cellule staminali mesenchimali di donatori adulti sani o da biopsie adipose sc di soggetti adulti non obesi e obesi.

Ambientazione:

Dipartimento di Donna, Bambino e Chirurgia Generale e Specialista della Seconda Università di Napoli.

Pazienti o altri partecipanti:

Un totale di 501 bambini italiani obesi (età $11 \pm 2,75$). Dodici donatori sani di midollo osseo (età $36,5 \pm 15$); e 17 soggetti, 7 magra (età 42 ± 10) e 10 obesi (età $37,8 \pm 12$) sono stati sottoposti a biopsie del tessuto adiposo sc.

Principali misure di esito:

Effetti della stimolazione CB2 su adipochina, perilipina e disaccoppiamento dell'espressione di protein-1.

risultati:

La variante CB2-R63 meno funzionale era significativamente associata ad un alto indice di massa corporea con punteggio z. Il blocco CB2 con agonista AM630 ha aumentato il rilascio di adipochine infiammatorie e l'accumulo di grasso e la riduzione della doratura. La stimolazione CB2

con agonista JWH-133 ha invertito tutti gli effetti correlati all'obesità.

Conclusione:

Il recettore CB2 è un nuovo bersaglio farmacologico che dovrebbe essere considerato per l'obesità.

Astratto

Le colture di adipociti ottenute da biopsie adipose di soggetti non obesi e obesi e trattate con farmaci che agiscono sul recettore CB2 hanno rivelato che la stimolazione CB2 inibisce l'infiammazione e il deposito di grasso e induce la doratura.

Sezione problema:

[Articoli originali](#)

L'obesità è associata a uno stato infiammatorio di basso grado nel tessuto adiposo bianco (WAT) e con aumenti eccessivi nella dimensione e nel numero degli adipociti bianchi (ADP) ([1](#)).

Gli ADP secernono un certo numero di molecole bioattive, adipochine e mantengono l'equilibrio energetico immagazzinando triacilgliceroli in gocce lipidiche citoplasmatiche (LD) sotto sovraccarico di energia e mobilizzandole durante la deprivazione di energia ([2](#)).

L'obesità disregola entrambi questi processi. L'aumento del rilascio di adipochine proinfiammatorie attira i macrofagi WAT e altre cellule immunitarie, che aumentano lo stato infiammatorio ([3](#) , [4](#)). Lo sviluppo di LD nella caratteristica morfologia uniloculare, promossa da specifiche proteine associate a LD, tra cui la perilipina-1 svolge un ruolo cruciale ([5](#) , [6](#)), porta all'ipertrofia e iperplasia di ADP ([7](#) , [8](#)).

Il tessuto adiposo comprende anche tessuto marrone "termogenico". Gli ADP bruni producono una grande quantità di calore attraverso l'attivazione della proteina di disaccoppiamento (UCP) -1. L'espressione di UCP-1 può anche essere indotta negli ADP del WAT, denominati ADP beige. Infatti, gli ADP beige possono agire come semplice accumulo di energia o attivare un programma termogenico in risposta a diversi stimoli che reclutano UCP-1 ([9](#)). L'obesità diminuisce il numero di cellule ADP beige ([10](#)).

Il sistema endocannabinoide (EC), che comprende 2 recettori metabotropici, il recettore 1 dei cannabinoidi (CB1) e CB2, i loro ligandi endogeni e gli enzimi per la sintesi e il metabolismo della CE ([11](#)), svolge un ruolo cruciale nella regolazione del metabolismo energetico ([12-14](#)). L'ablazione genetica di CB1 si traduce in un ridotto peso corporeo nei topi ([15](#)). Il blocco selettivo di CB1 diminuisce

l'assunzione di cibo e il peso corporeo nell'uomo ([16](#) - [19](#)).

È stato anche rivelato un ruolo del recettore CB2. Una variante CB2 comune, Q63R, che causa una ridotta funzione di CB2, è stata associata a disturbi alimentari nell'uomo ([20](#)). Gli agonisti CB2 riducono l'assunzione di cibo nei topi magri ([20](#)) e migliorano sia il peso corporeo che l'infiammazione associata all'obesità nei topi obesi indotti dalla dieta ([21](#)). Inoltre, l'ablazione genetica CB2 determina l'adiposità ([22](#)).

Per valutare le influenze del recettore CB2 sulla modulazione dell'obesità infantile abbiamo analizzato la variante CB2-Q63R in una coorte di 501 bambini e adolescenti italiani obesi. Per valutare l'attività e la morfologia dell'ADP abbiamo effettuato studi molecolari, biochimici e morfologici su ADP in vitro, differenziati da cellule staminali mesenchimali (MSC) di donatori adulti sani o derivati da tessuto adiposo sc di soggetti adulti obesi e nonob, trattati con l'agonista CB2 JWH-133 o con l'agonista inverso AM630.

Materiali e metodi

Dichiarazione etica

Tutte le procedure eseguite in questo studio erano conformi alla Dichiarazione di principi di Helsinki, alla legislazione nazionale italiana e al comitato etico della Seconda Università di Napoli, che ha formalmente approvato lo studio. Il consenso informato scritto è stato ottenuto dai genitori e il consenso è stato acquisito dai bambini prima che fossero eseguite le procedure.

pazienti

Sono stati arruolati un totale di 501 bambini e adolescenti caucasici obesi riferiti al Dipartimento di Donne, Bambini e Chirurgia Generale e Specializzata della Seconda Università di Napoli da gennaio 2010 ad agosto 2014.

L'esame fisico di ciascun paziente includeva valutazioni di peso corporeo, altezza, indice di massa corporea (BMI) z-score ([23](#)), circonferenza della vita, pressione arteriosa sistolica / diastolica e stadio puberale ([24](#)), come descritto in precedenza ([25](#)).

I pazienti venivano definiti obesi se il BMI superava il 95 ° percentile per età e sesso, secondo le classifiche italiane ([26](#)). Trigliceridi, colesterolo lipoproteico ad alta densità, insulina e livelli di glicemia sono stati misurati come descritto in precedenza ([27](#) , [28](#)). La resistenza

all'insulina è stata valutata utilizzando la valutazione del modello omeostatico, con un valore soglia di 3 ([29](#)).

Soggetti per colture cellulari

Le MSC differenziate in ADP sono state isolate dalle cellule residue di 12 soggetti sani (8 maschi, 4 femmine, età media $36,5 \pm 16$ anni) che hanno donato il midollo osseo per il trapianto all'ospedale pediatrico Bambino Gesù.

Le biopsie del tessuto adiposo sottocutaneo sono state raccolte da magra ($n = 7$, 4 maschi, 3 femmine, età media 42 ± 10 anni, BMI <25) e soggetti obesi ($n = 10$; 4 maschi, 6 femmine; età media $37,8 \pm 12$ y; BMI > 30), sottoposti a chirurgia per ernia ombelicale o inguinale presso il Dipartimento di Chirurgia Generale dell'Università di Napoli.

Analisi genetica

Il DNA genomico è stato estratto da cellule di sangue intero periferico utilizzando un kit di estrazione del DNA (Promega). Il rilevamento del polimorfismo CNR2 rs35761398, sottostante la sostituzione CB2-Q63R, è stato eseguito utilizzando un saggio TaqMan (Real Master Mix Probe, 5 PRIME) come descritto in precedenza ([30](#)).

Colture ADP umane derivate da MSC

Le MSC sono state ottenute da cellule mononucleate isolate da aspirati di midollo osseo come precedentemente descritto ([31](#)). Le MSC sono state raccolte fino a raggiungere il passaggio 2-3, suddivise dopo aver raggiunto più o uguale all'80% di confluenza per ciascun passaggio utilizzando tripsina (Euroclone) e sostituite per espansione. Al passaggio (P) 2-3, le MSC sono state differenziate in ADP. In breve, per indurre differenziazione adipogenica, le cellule sono state coltivate a una densità di 8000 / cm² in α -MEM (Lonza) integrata con siero fetale bovino al 10%, desametasone 10^{-7} M, acido ascorbico 50- μ g / mL, 100- μ g / mL insulina, (50 μ M) 3-isobutil-1-metilxantina, (0,5 mM) indometacina e (5 mM) β -glicerofosfato (Sigma), e quindi placcato in piastre di coltura cellulare a 12 pozzetti (Corning Costar; Celbio) per molecolari esperimenti biologici e in piastre Multiwell per colture cellulari a 24/96 pozzetti (Corning Costar; Celbio) per le altre procedure. Le culture furono mantenute per 14 giorni prima di qualsiasi trattamento.

Colture ADP umane sottocutanee derivate da tessuto adiposo

I tessuti adiposi sottocutanei sono stati raccolti in paraformaldeide al 10% in provette di propilene, frammentati meccanicamente e digeriti con collagenasi di tipo II (1 mg / ml, 37 ° C, 1 ora; Sigma-Aldrich). Filtrazione (filtro da 50 a 70 µm, FALCON) è stata eseguita dopo la digestione per separare gli ADP maturi dalla frazione vascolare stromale. La frazione filtrata, inclusa pre-ADPs, è stata centrifugata (1200 rpm, 10 min) e il pellet, risospeso in α-MEM, placcato in un Multiwellplate di coltura cellulare da 12/24 pozzetti (Corning Costar; Celbio) per l'isolamento di mRNA e proteine o in vetrini a 8 camere (BD Falcon, Becton, Dickinson & Co) per analisi morfologiche. Le cellule sono state coltivate (37 ° C, 5% di CO₂, mezzo sostituito ogni 3 d) per circa 14 giorni per consentire la piena differenziazione adipogenica prima di qualsiasi trattamento.

Colorazione Oil Red O

Le cellule indotte da adipogenesi sono state colorate per vacuoli grassi mediante colorazione Oil Red O (Sigma-Aldrich). Il mezzo è stato rimosso da ciascun pozzetto e le cellule sono state risciacquate in PBS e fissate in formalina al 10% (Sigma-Aldrich) per 1 ora a temperatura ambiente (RT). Le cellule sono state quindi lavate con PBS e incubate prima con il 60% di isopropanolo (Carlo Erba Reagents) per 5 minuti a temperatura ambiente e poi con 60 ° C preriscaldata Oil Red O soluzione di lavoro per 10 minuti a temperatura ambiente. Dopo il lavaggio con acqua per rimuovere il colorante non legato, i LD in cellule differenziate sono stati visualizzati usando un microscopio ottico (Nikon Eclipse TS100; Nikon Instruments).

analisi di mRNA

L'mRNA totale è stato estratto usando RNA Tri-Reagent (Molecular Research Center, Inc) e invertire la trascrizione utilizzando un kit di trascrizione inversa con cDNA ad alta capacità RT (Applied Biosystems).

Per quantificare i livelli di espressione dei componenti del sistema EC, adipochine e UCP-1, sono state eseguite PCR quantitative. Reazioni di amplificazione specifiche per CB1 (*CNR1* , GeneID1268), CB2 (*CNR2* , GeneID1269), monoacilglicerolo-lipasi (*MAGL* , GeneID11343), diacilglicerolo-lipasi-α (*DAGL α*, GeneID747), n-acilfosfatidiletanolamina fosfolipasi D (*NAPE-PLD* , GeneID222236), acido grasso ammidico idrolasi (*FAAH* , GeneID2166), perossisoma proliferatore-attivato recettore-γ (*PPAR γ*, GeneID5468), leptina (*LEP* , GeneID3952), adiponectina (*ADPN* , GeneID9370), IL-6 (*IL-6* ,

GeneID3569) , IL-4 (*IL-4* , GeneID3565), TNF (*TNF* α , GeneID7124) e UCP-1 (*UCP-1* , GeneID7350) sono stati eseguiti. I loro livelli di espressione sono stati confrontati con quelli del gene del governo della casa 18S (GeneID100008588) o β -actina (GeneID60). I test sono stati eseguiti in triplice copia. I primer, selezionati utilizzando il software Primer3, e le condizioni PCR sono disponibili su richiesta. Il profilo di espressione genica è stato eseguito utilizzando il metodo della soglia del ciclo comparativo di quantificazione relativa del gene di governo della casa.

Macchia occidentale

I lisati totali sono stati ottenuti mediante lisi tampone del dosaggio radioimmunoprecipitazione e analizzati per l'espressione di IL-6, perilipina e UCP-1 mediante immunoblotting. Cinquanta microgrammi di proteine denaturate sono stati caricati su un gel di poliacrilammide al 10% e trasferiti su una membrana di difluoruro di polivinilidene (Millipore). Le strisce di membrana sono state alternativamente incubate per una notte a 4 ° C con i seguenti anticorpi coniugati con perossidasi di rafano: coniglio policlonale anti-IL-6 (1: 1000, ab6672; Abcam), coniglio antiperilipina policlonale A (1: 500, ab3526; Abcam), e anti-UCP-1 (1: 500, orb13739; Biorbyt) e poi con un anticorpo secondario antirabito di capra (1: 2000, AP307P; Merck Millipore, Life Science-Merck KGaA) per 1 ora e le bande reattive sono state visualizzate su pellicola a raggi X (Fuji Corp). Le immagini sono state acquisite, memorizzate e analizzate con il software Quantity One (Bio-Rad). Un leggero stripping è stato eseguito a 60 ° C per 10 minuti se la stessa membrana è stata utilizzata per determinare l'espressione di più di 1 proteina di interesse. Un anticorpo monoclonale anti- β -actina (1: 1000 o 1: 2000; Sigma) è stato usato come proteina di mantenimento per verificare il carico identico di proteine.

Farmaci e trattamenti

Lipopolisaccaride (LPS), AM630 e JWH-133 (Tocris) sono stati sciolti in PBS contenente DMSO (Sigma-Aldrich). La concentrazione finale di dimetilsolfossido (DMSO) nelle colture era dello 0,01%. Gli ADP in coltura sono stati trattati con AM630 (10 μ M), JWH-133 (100nM) o 1-mg / ml LPS, da soli o in combinazione dopo una curva dose-risposta (non mostrata). Le cellule in coltura non trattate sono state mantenute in mezzo di incubazione durante il tempo di trattamento relativo, con o senza veicolo (0,01% di DMSO). I farmaci sono stati aggiunti al mezzo

cellulare completo quando la differenziazione è stata completata. L'estrazione dell'RNA e l'analisi biochimica sono state eseguite a 24 ore dopo i trattamenti.

statistica

Le variabili continue sono riassunte come media $\pm$ DS e le variabili categoriali sono presentate come frequenze assolute e relative. I dati molecolari e biochimici sono presentati come media $\pm$ SD. L'ANOVA, seguita dal test post hoc Studia-Newman-Keuls spaiato, è stato utilizzato per valutare le differenze nei valori medi tra i gruppi e in base al numero di esperimenti effettuati. Il test χ^2 è stato utilizzato per variabili categoriali.

L'analisi multivariata, incluse tutte le variabili indipendenti con rilevanza biologica rispetto allo scopo dello studio, è stata eseguita utilizzando un modello lineare generale.

Tutti i valori di P sono stati normalizzati per età, sesso, età puberale e indice di massa corporea (BMI) e sono stati considerati statisticamente significativi se erano inferiori a 0,05.

Tutte le analisi statistiche sono state eseguite utilizzando Statgraphics Centurion XV.II (Adalta; Statpoint Technologies, Inc).

risultati

Studio genetico

Le caratteristiche cliniche e genetiche dei 501 bambini e adolescenti italiani obesi inclusi in questo studio sono riportati nella [Tabella 1 supplementare](#).

Le frequenze alleliche erano nell'equilibrio di Hardy-Weinberg ($P = .87$) ([Supplemental Table 2](#)).

Le caratteristiche cliniche dei pazienti rispetto al genotipo CB2-Q63R sono riportate nella [Tabella 1](#).

Tabella 1.

Caratteristiche biochimiche in 501 bambini e adolescenti obesi italiani secondo la variante CB2 Q63R

Variante CB2 Q63R	QQ	QR	RR	p
Pazienti, n (%)	76 (15.2)	260 (51,9)	165 (32,8)	
Maschi, n (%)	39 (7.78)	144 (28,74)	75 (14,97)	.14

Femmine, n (%)	37 (7,39)	116 (23.15)	90 (17.96)	
Età, y (media $\pm$ DS)	10,60 $\pm$ 3,15	10,97 $\pm$ 1,70	11,35 $\pm$ 2,14	.12
BMI punteggio Z (media $\pm$ DS)	2,83 $\pm$ 0,73	2,95 $\pm$ 0,39	3,10 $\pm$ 0,49	.007
Peso / altezza (media $\pm$ SD)	0,64 $\pm$ 0,05	0,63 $\pm$ 0,03	0,63 $\pm$ 0,03	.35
Pressione diastolica SD (media $\pm$ DS)	0,17 $\pm$ 1,0	0,25 $\pm$ 0,57	0,35 $\pm$ 0,71	.31
Pressione sistolica SD (media $\pm$ DS)	1,22 $\pm$ 1,4	1,05 $\pm$ 0,78	1,24 $\pm$ 0,97	.24
Colesterolo totale, mg / dl (media $\pm$ DS)	156,32 $\pm$ 35,4	159,62 $\pm$ 19,2	159,41 $\pm$ 24,2	.70
Trigliceridi, mg / dL (media $\pm$ DS)	89,04 $\pm$ 58,59	100,4 $\pm$ 31,68	95,75 $\pm$ 40	.21
Glicemia t0 (media $\pm$ DS)	78,43 $\pm$ 9,55	79,43 $\pm$ 5	80,25 $\pm$ 6,54	.29
Glicemia t120 (media $\pm$ DS)	110,8 $\pm$ 25,19	110,3 $\pm$ 13,6	113,5 $\pm$ 17,09	.30
Insulina t0 (media $\pm$ DS)	29,36 $\pm$ 21,74	29,10 $\pm$ 11,71	28,54 $\pm$ 15,01	.94
HOMA (media $\pm$ DS)	5,79 $\pm$ 4,53	5,72 $\pm$ 2,42	5,71 $\pm$ 3,10	.99
WBISI (media $\pm$ DS)	2,66 $\pm$ 2,35	2,71 $\pm$ 1,30	2,73 $\pm$ 1,68	.97
IL-6, pg / mL (media $\pm$ SD) ^a	2,77 $\pm$ 2,39	2,62 $\pm$ 1,40	3,44 $\pm$ 1,88	.03

AST, aspartato-aminotransferasi; ALT, alanina aminotransferasi; HOMA, valutazione del modello omeostatico; t0, prelievo di sangue dopo il digiuno; t120, sangue prelevato dopo carico glicemico. Tutti i valori di *P* sono normalizzati per età, sesso e indice di massa corporea.

un

n = 37; $P < .05$ sono mostrati in grassetto.

Tabella 1.

Caratteristiche biochimiche in 501 bambini e adolescenti obesi italiani secondo la variante CB2 Q63R

Variante CB2 Q63R	QQ	QR	RR	p
Pazienti, n (%)	76 (15.2)	260 (51,9)	165 (32,8)	
Maschi, n (%)	39 (7.78)	144 (28,74)	75 (14,97)	.14
Femmine, n (%)	37 (7,39)	116 (23.15)	90 (17.96)	
Età, y (media $\pm$ DS)	10,60 $\pm$ 3,15	10,97 $\pm$ 1,70	11,35 $\pm$ 2,14	.12
BMI punteggio Z (media $\pm$ DS)	2,83 $\pm$ 0,73	2,95 $\pm$ 0,39	3,10 $\pm$ 0,49	.007
Peso / altezza (media $\pm$ SD)	0,64 $\pm$ 0,05	0,63 $\pm$ 0,03	0,63 $\pm$ 0,03	.35
Pressione diastolica SD (media $\pm$ DS)	0,17 $\pm$ 1,0	0,25 $\pm$ 0,57	0,35 $\pm$ 0,71	.31
Pressione sistolica SD (media $\pm$ DS)	1,22 $\pm$ 1,4	1,05 $\pm$ 0,78	1,24 $\pm$ 0,97	.24
Colesterolo totale, mg / dl (media $\pm$ DS)	156,32 $\pm$ 35,4	159,62 $\pm$ 19,2	159,41 $\pm$ 24,2	.70
Trigliceridi, mg / dL (media $\pm$ DS)	89,04 $\pm$ 58,59	100,4 $\pm$ 31,68	95,75 $\pm$ 40	.21
Glicemia t0 (media $\pm$ DS)	78,43 $\pm$ 9,55	79,43 $\pm$ 5	80,25 $\pm$ 6,54	.29
Glicemia t120 (media $\pm$ DS)	110,8 $\pm$ 25,19	110,3 $\pm$ 13,6	113,5 $\pm$ 17,09	.30
Insulina t0 (media $\pm$ DS)	29,36 $\pm$ 21,74	29,10 $\pm$ 11,71	28,54 $\pm$ 15,01	.94

HOMA (media $\pm$ DS)	5,79 $\pm$ 4,53	5,72 $\pm$ 2,42	5,71 $\pm$ 3,10	.99
WBISI (media $\pm$ DS)	2,66 $\pm$ 2,35	2,71 $\pm$ 1,30	2,73 $\pm$ 1,68	.97
IL-6, pg / mL (media $\pm$ SD) <i>a</i>	2,77 $\pm$ 2,39	2,62 $\pm$ 1,40	3,44 $\pm$ 1,88	.03

AST, aspartato-aminotransferasi; ALT, alanina aminotransferasi; HOMA, valutazione del modello omeostatico; t0, prelievo di sangue dopo il digiuno; t120, sangue prelevato dopo carico glicemico. Tutti i valori di *P* sono normalizzati per età, sesso e indice di massa corporea.

un

n = 37; *P* < .05 sono mostrati in grassetto.

La variante CB2-R63 è risultata associata a un aumento del BMI con punteggio *z* (*P* = 0,0000) e in un sottogruppo di 37 pazienti, con un alto livello di IL-6 nel plasma (*P* = 0,03). Nessuna altra associazione è stata trovata.

Le distribuzioni genotipiche dei donatori e dei soggetti MSC sottoposti a biopsia sono riportati nella [Tabella supplementare 3](#) .

Studio molecolare

Gli ADP esprimono i recettori e gli enzimi della CE

Gli ADP, differenziati in vitro da MSC o da biopsie WAT, esprimevano i recettori e gli enzimi dei cannabinoidi per la sintesi e la rottura di anandamide e 2-arachidonoilglicerolo ([Figura 1 supplementare](#)).

L'espressione di leptina, adiponectina e PPAR γ indicava che le cellule in coltura erano ADP.

L'espressione delle adipochine è modulata dall'adiposità e dalla stimolazione del CB2

È stata analizzata l'espressione di adipochina negli ADP derivati da magri e obesi. Sono stati studiati gli effetti di uno stimolo infiammatorio esercitato attraverso il trattamento con LPS su ADP magra e quelli di agonismo selettivo CB2 su ADP derivati da obesi.

L'espressione dell'Adipokina differiva in modo significativo tra gli ADP di razza magri e obesi. In entrambi gli ADP di derivazione magra trattata con obeso e LPS sono stati osservati livelli più elevati di PPAR γ e leptina rispetto agli ADP di derivazione magra, mentre i livelli di

adiponectina erano significativamente diminuiti. ADP derivati da obesità trattati con JWH-133 presentavano livelli più bassi di PPAR γ e leptina rispetto agli ADP derivati dall'obesità ([Figura 1 A](#)).

Figura 1.



[Visualizza grande](#) [Scarica diapositiva](#)

L'espressione delle adipochine è modulata dall'adiposità e dalla stimolazione del CB2.

Il rilascio di adipokina differiva significativamente tra gli ADP di razza magri e obesi. A, ADP derivati da obesità e ADP magra trattati da LPS mostrano livelli più elevati dei marcatori specifici PPAR γ e leptina rispetto agli ADP derivati dalla magra e bassi livelli di adiponectina. ADP derivati da obesità trattati con JWH-133 (100nM) mostrano livelli più bassi di PPAR γ e leptina e un livello più elevato di adiponectina rispetto agli ADP derivati dall'obesità. B, ADP derivati da obesità e ADP magra trattati da LPS mostrano livelli più elevati di citochine proinfiammatorie IL-6 e TNF α rispetto agli ADP derivati dalla magre e bassi livelli di IL-4. ADP derivati da obesità trattati con JWH-133 (100nM) mostrano livelli più bassi di IL-6 e TNF α e un livello superiore di IL-4 rispetto alle cellule derivate da obesi. I dati sono stati rivelati da ADP in vitro mediante PCR in tempo reale a partire da 100 ng di mRNA totale per la reazione RT e sono stati normalizzati per il gene della casa β -actina. I dati sono rappresentati come media $\pm$ SD da 3 diversi test eseguiti in duplicato. Un test t è stato utilizzato per valutare le differenze nei livelli di espressione di adipokine tra i gruppi. $P < .05$ è stato considerato statisticamente significativo.

Figura 1.



[Visualizza grande](#) [Scarica diapositiva](#)

L'espressione delle adipochine è modulata dall'adiposità e dalla stimolazione del CB2.

Il rilascio di adipokina differiva significativamente tra gli ADP di razza magri e obesi. A, ADP derivati da obesità e ADP magra trattati da LPS mostrano livelli più elevati dei marcatori specifici PPAR γ e leptina rispetto agli ADP derivati dalla magra e bassi livelli di adiponectina. ADP derivati da obesità trattati con JWH-133 (100nM) mostrano livelli più bassi di PPAR γ e leptina e un livello più elevato di adiponectina rispetto agli ADP derivati dall'obesità. B, ADP derivati da obesità e ADP magra

trattati da LPS mostrano livelli più elevati di citochine proinfiammatorie IL-6 e TNF α rispetto agli ADP derivati dalla magre e bassi livelli di IL-4. ADP derivati da obesità trattati con JWH-133 (100nM) mostrano livelli più bassi di IL-6 e TNF α e un livello superiore di IL-4 rispetto alle cellule derivate da obesi. I dati sono stati rivelati da ADP in vitro mediante PCR in tempo reale a partire da 100 ng di mRNA totale per la reazione RT e sono stati normalizzati per il gene della casa β -actina. I dati sono rappresentati come media $\pm$ SD da 3 diversi test eseguiti in duplicato. Un test t è stato utilizzato per valutare le differenze nei livelli di espressione di adipokine tra i gruppi. $P < .05$ è stato considerato statisticamente significativo.

I livelli delle citochine proinfiammatorie IL-6 e TNF α erano significativamente aumentati negli ADP derivati dall'obesità e ADP derivati dalla magra trattati con LPS, mentre quello di IL-4 era significativamente diminuito. ADP derivati da obesità trattati con JWH-133 hanno mostrato livelli più bassi di IL-6 e TNF α e un livello più alto di IL-4 rispetto alle cellule derivate dall'obesità ([Figura 1 B](#)).

Studio biochimico

I livelli di IL-6 sono aumentati dall'adiposità e diminuiti dalla stimolazione del CB2

I livelli plasmatici di IL-6 in un sottogruppo di 37 pazienti obesi (8 omozigoti per glutamina al codone 63 di CB2 [QQ]; 19 eterozigoti al codone 63 di CB2 [QR]; 10 omozigoti per arginina al codone 63 di CB2 [RR]) sono stati analizzati da ELISA. L'associazione della variante Q63R con il BMI z-score era ancora significativa ($P = .03$) e l'allele R63 era associato ad un alto livello di IL-6 nel plasma ($P = .008$, non normalizzato) ([Figura 2A supplementare](#)). Un modello lineare generale, con la normalizzazione di fattori confondenti, come età, sesso, BMI con punteggio z e un ben noto polimorfismo che influenza la funzione del recettore IL-6 (A358D) ([Tabella Supplementare 4](#)), ha rivelato che l'allele CB2-R63 era il principale fattore di rischio (modello $P = .04$; CB2-Q63R singolo contributo $P = .004$) ([Figura 2B supplementare](#)).

Il western blotting è stato eseguito per determinare il livello intracellulare di IL-6 nei lisati di ADP. ADP derivati da obesità contenevano significativamente meno IL-6 intracellulare rispetto a cellule derivate magre. La somministrazione di LPS a ADP di derivazione magra ha diminuito significativamente l'IL-6 intracellulare, mentre l'incubazione di ADP derivati dall'obeso con l'agonista CB2 JWH-133 ha indotto un

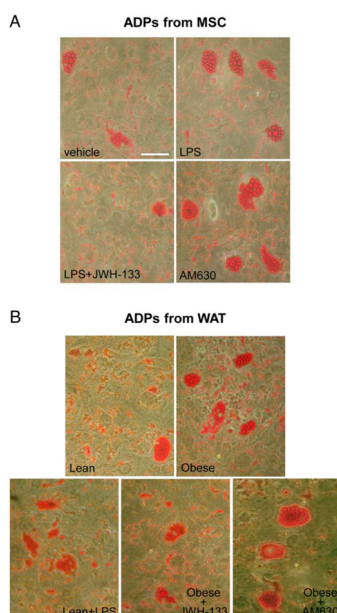
aumento significativo di questo livello ([Figura 2C supplementare](#)).

Il numero e le dimensioni del LD sono aumentati dall'adiposità e ridotti dalla stimolazione del CB2

Oil Red Ostaining

Per gli ADP derivati da MSC, la colorazione LD degli ADP derivati da MSC con olio rosso ([Figura 2 A](#)) o con un anticorpo fluorescente perilipina ([Figura 3A supplementare](#)) ha rivelato aumenti nel loro numero e dimensione dopo l'applicazione di uno stimolo infiammatorio, come LPS . Questi aumenti sono stati prevenuti dalla stimolazione CB2 concomitante con JWH-133 (100nM). Sono stati osservati aumenti del numero e della dimensione di LD dopo il trattamento con l'agonista CB2 per inversione di tendenza AM630 (10μM).

Figura 2.



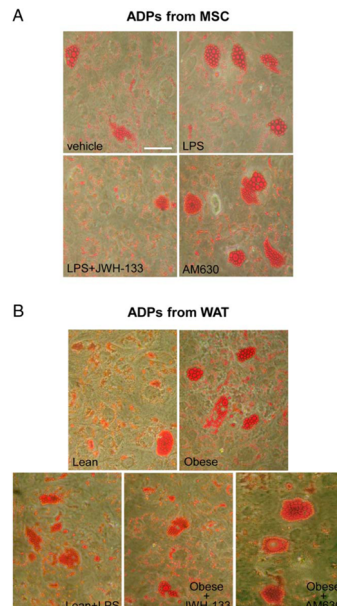
[Visualizza grande](#) [Scarica diapositiva](#)

La dimensione e il numero di LD sono aumentati dall'adiposità e ridotti dalla stimolazione del recettore CB2.

Colorazione LD di ADP in vitro con olio rosso. A, LPS aumenta il numero e le dimensioni degli ADP derivati da MSC. Questi aumenti sono impediti dalla stimolazione CB2 concomitante con JWH-133 (100nM). L'aumento del numero e della dimensione del LD si osserva anche se viene applicato l'agonista inverso CB2 AM630 (10μM). B, gli ADP derivati da obesità mostrano LD più numerosi e più grandi rispetto a quelli di individui magri. LPS aumenta il numero e le dimensioni di LD in ADPs derivati da soggetti magri, mentre negli ADP derivati da obesi, la stimolazione CB2 con JWH-133 (100nM) o il blocco con AM630 (10μM)

induce una riduzione e un aumento della dimensione e del numero di LD, rispettivamente. I pannelli sono rappresentativi dei dati di 2 diversi test eseguiti in triplice copia. Barra della scala, 50 μ m.

Figura 2.



[Visualizza grande](#) [Scarica diapositiva](#)

La dimensione e il numero di LD sono aumentati dall'adiposità e ridotti dalla stimolazione del recettore CB2.

Colorazione LD di ADP in vitro con olio rosso. A, LPS aumenta il numero e le dimensioni degli ADP derivati da MSC. Questi aumenti sono impediti dalla stimolazione CB2 concomitante con JWH-133 (100nM).

L'aumento del numero e della dimensione del LD si osserva anche se viene applicato l'agonista inverso CB2 AM630 (10 μ M). B, gli ADP derivati da obesità mostrano LD più numerosi e più grandi rispetto a quelli di individui magri. LPS aumenta il numero e le dimensioni di LD in ADPs derivati da soggetti magri, mentre negli ADP derivati da obesi, la stimolazione CB2 con JWH-133 (100nM) o il blocco con AM630 (10 μ M) induce una riduzione e un aumento della dimensione e del numero di LD, rispettivamente. I pannelli sono rappresentativi dei dati di 2 diversi test eseguiti in triplice copia. Barra della scala, 50 μ m.

Per gli ADP derivati da biopsia, gli stessi esperimenti sono stati condotti su ADP derivati da biopsia WAT umana. Le ADP degli individui obesi hanno mostrato LD più numerosi e più grandi rispetto a quelli acquisiti da individui magri. Il trattamento con LPS ha aumentato il numero e le dimensioni di LD negli ADP derivati da soggetti magri, mentre la modulazione CB2 con l'agonista JWH-133 (100nM) o l'agonista AM630 (10 μ M) negli ADP derivati da obesi ha indotto una riduzione e un

aumento della dimensione e numero, rispettivamente ([Figura 2 B](#) e [Figura 3B Supplementare](#)).

L'espressione di perilipina è aumentata dall'adiposità e diminuita dalla stimolazione del CB2

I lisati di ADP di origine obesa hanno mostrato livelli di perilipina significativamente più alti rispetto a quelli di ADP di derivazione magra ([Figura 3 A](#)). L'espressione di perilipina è stata alterata quando JWH-133 (100nM) o AM630 (10μM) è stato applicato a ADP derivati dall'obesità, inclusa una diminuzione dopo stimolazione con CB2 e un aumento dopo il blocco CB2, rispettivamente. L'effetto indotto da JWH-133 è stato prevenuto dal pretrattamento con AM630 ([Figura 3 B](#)).
Figura 3.



[Visualizza grande](#) [Scarica diapositiva](#)

L'espressione di perilipina è aumentata dall'adiposità e diminuita dalla stimolazione del CB2.

A, il pannello di blotting western e la quantificazione relativa mostrano livelli significativamente più elevati di perilipina negli ADP derivati dall'obesità rispetto a quelli degli ADP di derivazione magra. B, pannello di Western blotting e la relativa quantificazione mostrano che l'applicazione di ADP JWH-133 (100nM) o AM630 (10μM) a ADA obeso induce una diminuzione dopo stimolazione CB2 e un aumento dopo il blocco CB2, rispettivamente. L'effetto indotto da JWH-133 è impedito dal pretrattamento con AM630. I dati sono stati rivelati da ADP in vitro mediante Western blotting da 50 μg di lisati totali e sono stati normalizzati per la beta-actina della proteina domestica. I dati sono rappresentati come media ± SD da 3 diversi test. L'ANOVA seguita dal test post hoc di Tukey è stato utilizzato per l'analisi statistica. $P < .05$ è stato considerato statisticamente significativo.

Figura 3.



[Visualizza grande](#) [Scarica diapositiva](#)

L'espressione di perilipina è aumentata dall'adiposità e diminuita dalla stimolazione del CB2.

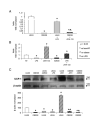
A, il pannello di blotting western e la quantificazione relativa mostrano livelli significativamente più elevati di perilipina negli ADP derivati

dall'obesità rispetto a quelli degli ADP di derivazione magra. B, pannello di Western blotting e la relativa quantificazione mostrano che l'applicazione di ADP JWH-133 (100nM) o AM630 (10μM) a ADA obeso induce una diminuzione dopo stimolazione CB2 e un aumento dopo il blocco CB2, rispettivamente. L'effetto indotto da JWH-133 è impedito dal pretrattamento con AM630. I dati sono stati rivelati da ADP in vitro mediante Western blotting da 50 μg di lisati totali e sono stati normalizzati per la beta-actina della proteina domestica. I dati sono rappresentati come media ± SD da 3 diversi test. L'ANOVA seguita dal test post hoc di Tukey è stato utilizzato per l'analisi statistica. $P < .05$ è stato considerato statisticamente significativo.

L'espressione di UCP-1 è ridotta dall'adiposità e aumentata dalla stimolazione CB2

Espressione molecolare

Gli ADP dei soggetti obesi mostravano un livello di mRNA UCP-1 significativamente più basso rispetto a quelli dei soggetti magri. Il trattamento con LPS ha ridotto significativamente l'espressione di UCP-1 negli ADP derivati dalla magra. Il trattamento degli ADP derivati dall'obesità con l'agonista CB2 JWH-133 ha significativamente migliorato l'espressione di UCP-1 ([Figura 4 A](#)). Questo effetto era dose dipendente e prevenuto dal pretrattamento AM630 ([Figura 4A supplementare](#)). L'espressione di UCP-1 è stata significativamente ridotta dal blocco di LPS e CB2 in ADP derivati da MSC. Inoltre, la stimolazione CB2 ha significativamente migliorato l'espressione di UCP-1 e ha neutralizzato la diminuzione indotta da LPS ([Figura 4 B](#)). [Figura 4.](#)

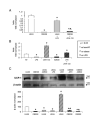


[Visualizza grande](#) [Scarica diapositiva](#)

L'espressione di UCP-1 è ridotta dall'adiposità e aumentata dalla stimolazione CB2.

A, gli ADP derivati dall'obesità mostrano un livello di mRNA UCP-1 significativamente più basso rispetto a quelli dei soggetti magri. Il trattamento con LPS ha ridotto significativamente l'espressione di UCP-1 negli ADP di derivazione magra. Il trattamento degli ADP derivati dall'obesità con l'agonista CB2 JWH-133 (100nM) ha significativamente migliorato l'espressione di UCP-1. Il trattamento B, LPS o il blocco CB2 con AM630 (10μM) riduce significativamente l'espressione di UCP-1 in

ADP derivati da MSC. La stimolazione CB2 con JWH-133 (100nM) migliora significativamente l'espressione di UCP-1 e contrasta la diminuzione indotta da LPS. C, pannello Western blotting e la quantificazione relativa mostrano un livello di proteina UCP-1 significativamente più basso negli ADP derivati dall'obesità rispetto a quelli negli ADP derivati da magra. Gli ADP derivati da Lean esposti a LPS mostrano un livello di UCP-1 significativamente più basso rispetto agli ADP di derivazione magra. Sia gli ADP di derivazione magra che quelli di obesi trattati con l'agonista di CB2 contro l'AM630 (10μM) mostrano un livello di UCP-1 significativamente più basso rispetto alle cellule relative non trattate. Sia gli ADP di origine magra che quelli obesi trattati con l'agonista CB2 JWH-133 (100nM) mostrano un aumento dei livelli di UCP-1 rispetto alle cellule relative non trattate. Il blocco del recettore CB2 con AM630 (10μM) negli ADP derivati dall'obesità esacerba l'effetto legato all'obesità della soppressione dell'UCP-1. I dati sono stati rivelati da ADP in vitro mediante Western blotting da 50 μg di lisati totali e sono stati normalizzati per la beta-actina della proteina domestica. I dati sono rappresentati come media ± SD da 3 diversi test. L'ANOVA seguita dal test post hoc di Tukey è stato utilizzato per l'analisi statistica. $P < .05$ è stato considerato statisticamente significativo. Figura 4.



[Visualizza grande](#) [Scarica diapositiva](#)

L'espressione di UCP-1 è ridotta dall'adiposità e aumentata dalla stimolazione CB2.

A, gli ADP derivati dall'obesità mostrano un livello di mRNA UCP-1 significativamente più basso rispetto a quelli dei soggetti magri. Il trattamento con LPS ha ridotto significativamente l'espressione di UCP-1 negli ADP di derivazione magra. Il trattamento degli ADP derivati dall'obesità con l'agonista CB2 JWH-133 (100nM) ha significativamente migliorato l'espressione di UCP-1. Il trattamento B, LPS o il blocco CB2 con AM630 (10μM) riduce significativamente l'espressione di UCP-1 in ADP derivati da MSC. La stimolazione CB2 con JWH-133 (100nM) migliora significativamente l'espressione di UCP-1 e contrasta la diminuzione indotta da LPS. C, pannello Western blotting e la quantificazione relativa mostrano un livello di proteina UCP-1 significativamente più basso negli ADP derivati dall'obesità rispetto a quelli negli ADP derivati da magra. Gli ADP derivati da Lean esposti a

LPS mostrano un livello di UCP-1 significativamente più basso rispetto agli ADP di derivazione magra. Sia gli ADP di derivazione magra che quelli di obesi trattati con l'agonista di CB2 contro l'AM630 (10 μ M) mostrano un livello di UCP-1 significativamente più basso rispetto alle cellule relative non trattate. Sia gli ADP di origine magra che quelli obesi trattati con l'agonista CB2 JWH-133 (100nM) mostrano un aumento dei livelli di UCP-1 rispetto alle cellule relative non trattate. Il blocco del recettore CB2 con AM630 (10 μ M) negli ADP derivati dall'obesità esacerba l'effetto legato all'obesità della soppressione dell'UCP-1. I dati sono stati rivelati da ADP in vitro mediante Western blotting da 50 μ g di lisati totali e sono stati normalizzati per la beta-actina della proteina domestica. I dati sono rappresentati come media $\pm$ SD da 3 diversi test. L'ANOVA seguita dal test post hoc di Tukey è stato utilizzato per l'analisi statistica. $P < .05$ è stato considerato statisticamente significativo.

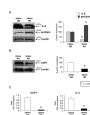
Espressione proteica

Secondo i dati molecolari, il livello di proteina UCP-1 negli ADP derivati dall'obesità era significativamente più basso rispetto a quello degli ADP derivati dalla magra, ed era significativamente aumentato dopo la stimolazione con CB2. ADP derivati da Lean esposti a LPS, e ADP sia a basso che a basso peso trattati con l'agonista di CB2 contro l'AM630, avevano un livello di UCP-1 significativamente più basso rispetto agli ADP a magra e alle cellule non trattate (o trattate con veicoli). Al contrario, i livelli di UCP-1 sono stati aumentati sia negli ADP di razza magri che obesi trattati con l'agonista CB2 JWH-133. Il blocco del recettore CB2 con AM630 nelle ADP derivate da obesi ha esacerbato l'effetto indotto dall'obesità della soppressione dell'UCP-1 ([Figura 4 C](#)). La stimolazione del recettore CB2 con JWH-133 negli ADP a magra trattati con LPS ha contrastato in modo significativo l'effetto dello stimolo infiammatorio ([Figura 4B supplementare](#)).

I livelli di IL-6, perilipina e UCP-1 sono associati alla variante CB2-Q63R

Secondo i risultati farmacologici, le ADP dei soggetti RR obesi hanno mostrato un livello intracellulare di IL-6 significativamente più basso e un alto livello di perilipina rispetto a quelli negli ADP dei soggetti obesi QQ ([Tabella supplementare 3](#) e [Figura 5 A](#)).

Figura 5.

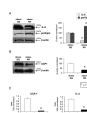


[Visualizza grande](#) [Scarica diapositiva](#)

I livelli di IL-6, perilipina e UCP-1 sono associati alla variante CB2-Q63R.

Tutti i soggetti sottoposti a biopsia tissutale sono stati genotipizzati per la variante CB2 Q63R ([Tabella supplementare 3](#)). A, ADP dei soggetti RR obesi mostrano un livello intracellulare intracellulare di IL-6 e un alto livello di perilipina rispetto a quelli negli ADP dei soggetti obesi QQ. B, ADP derivati da obesità da soggetti RR obesi mostrano livelli significativamente inferiori di proteina UCP-1 e (C) mRNA rispetto a quelli da pazienti QQ. Inoltre, i livelli di IL-4 sono significativamente diminuiti negli ADP dai soggetti obesi RR rispetto a quelli dei soggetti obesi QQ. (Soggetti obesi RR, n = 4; Soggetti obesi QQ, n = 1) ([Tabella Supplementare 3](#)). I dati sono rappresentati come media $\pm$ SD da 3 diversi test. L'ANOVA seguita dal test post hoc di Tukey è stato utilizzato per l'analisi statistica. $P < .05$ è stato considerato statisticamente significativo.

Figura 5.



[Visualizza grande](#) [Scarica diapositiva](#)

I livelli di IL-6, perilipina e UCP-1 sono associati alla variante CB2-Q63R.

Tutti i soggetti sottoposti a biopsia tissutale sono stati genotipizzati per la variante CB2 Q63R ([Tabella supplementare 3](#)). A, ADP dei soggetti RR obesi mostrano un livello intracellulare intracellulare di IL-6 e un alto livello di perilipina rispetto a quelli negli ADP dei soggetti obesi QQ. B, ADP derivati da obesità da soggetti RR obesi mostrano livelli significativamente inferiori di proteina UCP-1 e (C) mRNA rispetto a quelli da pazienti QQ. Inoltre, i livelli di IL-4 sono significativamente diminuiti negli ADP dai soggetti obesi RR rispetto a quelli dei soggetti obesi QQ. (Soggetti obesi RR, n = 4; Soggetti obesi QQ, n = 1) ([Tabella Supplementare 3](#)). I dati sono rappresentati come media $\pm$ SD da 3 diversi test. L'ANOVA seguita dal test post hoc di Tukey è stato utilizzato per l'analisi statistica. $P < .05$ è stato considerato statisticamente significativo.

Infine, le ADP derivate da obesità da pazienti omozigoti per la variante CB2-R63 meno funzionale hanno mostrato un livello di UCP-1 significativamente più basso rispetto a quelli dei pazienti QQ ([Figura 5](#) , B e C). Inoltre, i livelli di IL-4 erano significativamente più bassi negli

ADPs rispetto al RR rispetto ai soggetti obesi QQ ([Figura 5 C](#)).

Discussione

Nonostante i miglioramenti nella comprensione della patogenesi dell'obesità, solo un numero limitato di farmaci può essere utilizzato per trattare efficacemente questa condizione. Uno dei più efficaci, un diarilpirazolo (Rimonabant), un potente e selettivo recettore CB1, è stato ritirato dal mercato a causa di effetti collaterali psichiatrici. Infatti, la segnalazione del recettore CB1 aumenta gli effetti gratificanti del cibo che cerca e stimola la crescita di ADP, mentre la stimolazione del recettore CB2 promuove gli effetti antiobesità riducendo l'assunzione di cibo e l'aumento di peso senza un impatto negativo sull'umore ([20](#) , [21](#)) e inibendo i macrofagi attivati e T cellule ([22](#)).

Prove recenti indicano che i recettori CB2, anche se a livelli molto più bassi rispetto a CB1, sono anche espressi nel cervello e coinvolti in funzioni neuropsichiatriche. È interessante notare che è stato dimostrato che solo l'attivazione cronica di CB2 aumenta la trasmissione sinaptica eccitatoria, mentre la sua attivazione a breve termine ha scarso effetto sull'attività sinaptica ([32](#)). Un uso terapeutico del CB2 come bersaglio antiobesità potrebbe presumere una correlata attivazione neuronale cronica, che, a sua volta, aumentando la trasmissione sinaptica eccitatoria, dovrebbe facilitare gli effetti antiobesità periferici senza esercitare una notevole attività psicotropa. Tuttavia, potrebbero essere progettati agonisti selettivi CB2 che non possono attraversare la barriera emato-encefalica.

Il funzionamento differenziale di CB2 è stato dimostrato in relazione alla presenza di una glutammina o di una arginina in posizione 63 del dominio N-terminale. Gli esperimenti sulla proliferazione e l'attività delle cellule T da QQ e RR hanno dimostrato che l'allele R è meno funzionale dell'allele Q ([33](#)) e studi di associazione hanno indicato che l'allele R63 è un fattore di rischio per infiammazioni e malattie autoimmuni ([34](#) , [35](#)).

Per espandere ulteriormente i risultati precedenti, abbiamo genotipato 501 bambini obesi italiani per la variante CB2 Q63R, alla ricerca di associazioni con caratteristiche cliniche. Inoltre, abbiamo tentato di identificare un ruolo del recettore CB2 nella modulazione della funzione ADP, per fornire supporto per il suo utilizzo come bersaglio antiobesità sicuro. Pertanto, abbiamo esposto colture di ADP ottenute dalla differenziazione di MSCs da donatori adulti sani e da tessuti grassi

adulti magri e obesi a stimolanti CB2 o agenti bloccanti.

I nostri dati hanno rivelato un'associazione significativa tra la variante meno funzionale CB2-R63 e un alto BMI con punteggio z. Tuttavia, questa associazione tra la variante CB2 Q63R e il percentile BMI infantile è stata dimostrata solo nei bambini obesi riferiti a un servizio di obesità terziaria e, pertanto, questo non è uno studio di popolazione che dimostra la frequenza della variante CB2 Q63R nell'infanzia. Infatti, la distribuzione genetica del polimorfismo si è sovrapposta alle frequenze di controllo, ma i pazienti con RR hanno mostrato un aumento di peso rispetto ai soggetti obesi QQ. Pertanto, il recettore CB2 potrebbe avere un ruolo chiave nelle risposte agli stimoli ambientali nei bambini obesi. Secondo l'associazione consolidata di obesità con l'infiammazione cronica sistemica e ipertrofia / iperplasia di ADP, abbiamo trovato che la variante R63 era anche associata ad un alto livello di IL-6 proinfiammatorio e di blocco selettivo di CB2 in ADP di derivazione magra ha portato ad aumenti di IL-6 espressione e dimensione LD, simile a ciò che si verifica nello stato obeso. In alternativa, la stimolazione CB2 con un agonista selettivo negli ADP derivati dall'obesità ha causato un simile profilo adipochinico negli ADP derivati dalla magra e ridotto il numero e le dimensioni del LD. Inoltre, la stimolazione CB2 sembrava ostacolare il rilascio di IL-6, come dimostrato dal più alto livello intracellulare di IL-6 negli ADP derivati da obesi trattati con JWH-133 rispetto alle cellule non trattate. Gli effetti sulle caratteristiche della LD possono verificarsi tramite la modulazione di PPAR γ indotta da CB2, che media l'espressione della perilipina e la morfologia LD. Infatti, 1) sia i livelli di espressione di PPAR γ che di perilipina erano notevolmente aumentati negli ADP derivati dall'obesità rispetto agli ADP di derivazione magra; 2) Le LD di ADP derivate da obesi erano aumentate sia in numero che in dimensioni rispetto a quelle degli ADP derivati dalla magra; e 3) il blocco di CB2 negli ADP derivati dall'obesità ha comportato un marcato aumento del livello di perilipina, mentre la sua stimolazione selettiva ha causato riduzioni sostanziali sia dei livelli di PPAR γ che di perilipina.

Abbiamo anche osservato che negli ADP a magra, uno stimolo infiammatorio, come LPS, induceva il fenotipo "obeso" in termini di profilo adipochine proinfiammatorio o di LD. È interessante notare che la coapplicazione dell'agonista CB2 non solo ha inibito la fusione di LD per crearne di più grandi, ma ha anche portato alla comparsa di LD molto piccoli, che suggeriscono l'induzione di stimoli lipolitici. Questi dati

confermano che il recettore CB2 è un importante bersaglio antiinfiammatorio e suggeriscono che si tratta di un nuovo determinante molecolare delle caratteristiche del LD e, a sua volta, del funzionamento dell'ADP.

L'evidenza indica che l'interazione tra il sistema metabolico e quello immunitario è fondamentale per la patogenesi dell'obesità. Uno specifico sottoinsieme di linfociti nel WAT che si origina a causa di infiltrazioni di macrofagi come conseguenza del rilascio alterato di adipochina, spiega sia l'infiammazione tissutale che il destino dei precursori dell'ADP. Sono stati evidenziati i ruoli critici delle cellule di tipo 2 cellule T (Th2) e delle citochine nel guidare lo sviluppo dei precursori ADP in ADP beige piuttosto che in bianco, oltre a regolare il livello basale di UCP-1 in WAT. Questa biogenesi del grasso beige mediata da Th2 si verifica attraverso l'attivazione della segnalazione IL-4 / IL-4R α poiché è stato dimostrato che la somministrazione di IL-4 aumenta la massa grassa beige e riduce l'obesità nei topi termoneutral ([36 - 39](#)). Notevolmente, la stimolazione del recettore CB2 nelle cellule immunitarie facilita la polarizzazione Th2 ([40](#)). Inoltre, l'espressione della proteina 3 legante GATA, un fattore di trascrizione espresso in cellule Th2, determina la produzione di IL-4, che aumenta in modo dipendente da CB2 ([41](#)).

Di conseguenza, abbiamo riscontrato riduzioni significative sia nei livelli di IL-4 che di UCP-1 negli ADP derivati da obesi rispetto agli ADP di derivazione magra e queste riduzioni sono state significativamente neutralizzate dalla stimolazione del recettore CB2. È interessante notare che gli effetti dell'obesità sull'espressione di IL-4 e UCP1 sono modulati dalla variante funzionale CB2 Q63R, risultante essere attenuati nelle ADP derivate da soggetti obesi QQ e esacerbate negli ADP da pazienti con RR. Naturalmente, per rafforzare questa prima evidenza di un effetto di brunitura mediato dalla stimolazione del recettore CB2, potrebbe essere molto interessante dimostrare l'induzione del processo di termogenesi in ADP in coltura dopo il trattamento con l'agonista CB2 JWH-133 ([42](#)).

Collettivamente, questi dati suggeriscono che il recettore CB2 potrebbe rappresentare un obiettivo farmacologico per ridurre lo stato infiammatorio correlato all'obesità, così come l'eccessivo accumulo di grasso nelle LD della WAT, attraverso la modulazione di IL-6 e perilipina. Infine, questi dati suggeriscono che il recettore CB2 può essere un nuovo bersaglio per indurre la doratura, possibilmente attraverso l'up-regulation di IL-4 e l'induzione della segnalazione di UCP-1.

Ringraziamenti

Ringraziamo tutti i partecipanti allo studio.

Riassunto divulgazione: gli autori non hanno nulla da rivelare.

FR e GB sono autori co-primi.

SM ed EMdG sono autori co-senior.

Abbreviazioni

ADP adipociti

BMI indice di massa corporea

CB1 recettore cannabinoide 1

DMSO dimetilsolfossido

CE endocannabinoide

LD gocciolina lipidica

LPS lipopolisaccaride

MSC cellule staminali mesenchimali

PPAR γ recettore- γ proliferatore attivato perossisoma

QQ omozigote per glutamina al codone 63 di CB2

QR eterozigote al codone 63 di CB2

RR omozigote per arginina al codone 63 di CB2

RT temperatura ambiente

Th2 cellule T 2

UCP proteina disaccoppiante

WAT tessuto adiposo bianco.

Riferimenti

1. Fonseca-Alaniz MH , Takada J , Alonso-Vale MI , Lima FB . Il tessuto adiposo come organo endocrino: dalla teoria alla pratica . *J Pediatr* . 2007 ; 83 : S192 - S203 .
[Google Scholar Crossref](#)

2. Ouchi N , Parker JL , Lugus JJ , Walsh K . Adipochine nell'infiammazione e nella malattia metabolica . *Nat Rev Immunol* . 2011 ; 11 : 85 - 97 .
[Google Scholar](#) [Crossref](#) [PubMed](#)
3. huh JY , Parco YJ , prosciutto M , Kim JB . Crosstalk tra adipociti e cellule immunitarie nell'infiammazione del tessuto adiposo e disregolazione metabolica nell'obesità . *Mol Cell* . 2014 ; 37 : 365 - 371 .
[Google Scholar](#) [Crossref](#)
4. Weisberg SP , McCann D , Desai M , Rosenbaum M , Leibel RL , Ferrante AW jr . L'obesità è associata all'accumulo di macrofagi nel tessuto adiposo . *J Clin Invest* . 2003 ; 112 : 1796 - 1808 .
[Google Scholar](#) [Crossref](#) [PubMed](#)
5. Walther TC , Farese RV jr . Goccioline lipidiche e metabolismo cellulare dei lipidi . *Annu Rev Biochem* . 2012 ; 81 : 687 - 714 .
[Google Scholar](#) [Crossref](#) [PubMed](#)

6. Takahashi Y , Shinoda UN , Furuya N , et al. . La formazione di goccioline lipidiche mediata da perilipina negli adipociti promuove l'elaborazione di proteine-1 leganti gli elementi regolatori dello sterolo e l'accumulo di triacilgliceridi . *PLoS One* . 2013 ; 8 : e64605 .
[Google Scholar](#) [Crossref](#) [PubMed](#)
7. volentieri JN . Il rilascio di mediatori dell'infiammazione da parte del tessuto adiposo umano è potenziato nell'obesità e principalmente dalle cellule non grassi: una revisione . *Mediatori Inflamm* . 2010 ; 2010 : 513.948 .
[Google Scholar](#) [Crossref](#) [PubMed](#)
8. Blüher M . Disfunzione del tessuto adiposo nell'obesità . *Exp Clin Endocrinol Diab* . 2009 ; 117 : 241 - 250 .
[Google Scholar](#) [Crossref](#)

9. Giordano UN , Smorlesi UN , Frontini UN , Barbatelli sol , Cinti S . Adipociti bianchi, marroni e rosa: la straordinaria plasticità dell'organo adiposo . *Eur J Endocrinol* . 2014 ; 170 : R159 - R171 .
[Google Scholar](#) [Crossref](#) [PubMed](#)
10. Robinson L , Ojha S , Symonds ME , muoversi H . Indice di massa corporea come determinante della funzione del tessuto adiposo bruno nei bambini sani . *J Pediatr* . 2014 ; 164 : 318 - 322.e1 .
[Google Scholar](#) [Crossref](#) [PubMed](#)
11. Maccarrone M , bab io , Biro T , et al. . Segnalazione di endocannabinoidi alla periferia: 50 anni dopo il THC . *Tendenze Pharmacol Sci* . 2015 ; 36 : 277 - 296 .
[Google Scholar](#) [Crossref](#) [PubMed](#)

12. Watkins BA , Kim J . Il sistema endocannabinoide: dirigere il comportamento alimentare e il metabolismo dei macronutrienti . *Psychol frontale* . 2015 ; 5 : 1506 .
[Google Scholar](#) [Crossref](#) [PubMed](#)
13. D'Addario C , Micioni Di Bonaventura MV , Pucci M , et al. . Segnalazione di endocannabinoidi e dipendenza da cibo . *Neurosci Biobehav* . 2014 ; 47 : 203 - 224 .
[Google Scholar](#) [Crossref](#)
14. Engeli S . I recettori cannabinoidi centrali e periferici come bersagli terapeutici nel controllo dell'assunzione di cibo e del peso corporeo . *Handb Exp Pharmacol* . 2012 ; 209 : 357 - 381 .
15. RavinetTrillou C , Delgorge C , Menet C , Arnone M , SOUBRIÉ P . Il knockout del recettore cannabinoide CB1 nei topi porta alla magrezza, alla resistenza all'obesità indotta dalla dieta e alla maggiore sensibilità alla leptina . *Int J Obes Rel Meta Dis* . 2004 ; 28 : 640 - 648 .
[Google Scholar](#) [Crossref](#)

16. Van Gaal LF , Rissanen AM , Scheen AJ , Ziegler O , Rössner S , Gruppo di studio RIO-Europa . Effetti del bloccante del recettore cannabinoide-1 rimonabant sulla riduzione del peso e fattori di rischio cardiovascolare nei pazienti in sovrappeso: 1 anno di esperienza dallo studio RIO-Europa . *Lancetta* . 2005 ; 365 : 1389 - 1397 .
[Google Scholar](#) [Crossref](#) [PubMed](#)
17. Despres JP , Golay UN , Sjostrom L . Effetti del rimonabant sui fattori di rischio metabolici nei pazienti in sovrappeso con dislipidemia . *N Eng J Med* . 2005 ; 353 : 2121 - 2134 .
[Google Scholar](#) [Crossref](#)

18. Pi-Sunyer FX , Aronne LJ , Heshmati HM , Devin J , Rosenstock J . Effetto di rimonabant, un bloccante dei recettori dei cannabinoidi-1, sul peso e fattori di rischio cardiometabolici nei pazienti sovrappeso o obesi: RIO-Nord America: uno studio controllato randomizzato . *JAMA* . 2006 ; 295 : 761 - 775 .
[Google Scholar](#) [Crossref](#) [PubMed](#)
19. Topol EJ , Bousser MG , Volpe KA , et al. . Rimonabant per la prevenzione di eventi cardiovascolari CRESCENDO: uno studio randomizzato, multicentrico, controllato con placebo . *Lancetta* . 2010 ; 376 : 517 - 523 .
[Google Scholar](#) [Crossref](#) [PubMed](#)

20. Ishiguro H , Carpio O , Horiuchi Y , et al. . Un polimorfismo non sinonimo nel gene del recettore CB2 dei cannabinoidi è associato a disturbi alimentari negli esseri umani e l'assunzione di cibo è modificata nei topi dai suoi ligandi . *Sinapsi* . 2010 ; 64 : 92 - 96 .
[Google Scholar](#) [Crossref](#) [PubMed](#)
21. verty UN , Stefanidis UN , McAinch AJ , Hryciw DH , Oldfield B . Effetto anti-obesità dell'agonista del recettore CB2 JWH-015 in topi obesi indotti da dieta . *PLoS One* . 2015 ; 10 : e0140592 .
[Google Scholar](#) [Crossref](#) [PubMed](#)
22. Schmitz K , Mangels N , Häussler UN , Ferreira N , fiammingo io , Tegeder io . Obesità pro-infiammatoria nei topi con deficit di recettori cannabinoidi-2 anziani . *Int J Obes (Lond)* . 2016 ; 40 : 366 - 379 .
[Google Scholar](#) [Crossref](#) [PubMed](#)

23. ravizzone TJ . Il metodo LMS per la costruzione di standard di crescita normalizzati . *Eur J Clin Nutr* . 1990 ; 144 : 45 - 60 .
24. conciatore JM , Casa Bianca RH . Norme longitudinali cliniche per altezza, peso, velocità di altezza, velocità del peso e fasi della pubertà . *Arch Dis Child* . 1976 ; 51 : 170 - 179 .
[Google Scholar](#) [Crossref](#) [PubMed](#)
25. Santoro N , Amato UN , Grandone UN , et al. . Predire la sindrome metabolica in bambini e adolescenti obesi: guarda, misura e chiedi . *Obes Facts* . 2013 ; 6 : 48 - 56 .
[Google Scholar](#) [Crossref](#) [PubMed](#)
26. Cacciari E , Milani S , Balsamo UN , et al. . Grafici di crescita in sezione trasversale italiana per altezza, peso e BMI da 2 a 20 anni . *J Endocrinologia Inv* . 2006 ; 29 : 581 - 593 .
[Google Scholar](#) [Crossref](#)

27. Grandone UN , Cozzolino D , Marzuillo P , et al. . Il polimorfismo di TM6SF2 Glu167Lys è associato a bassi livelli di colesterolo LDL e a un aumento del danno epatico nei bambini obesi . *Pediatr Obes* . 2016 ; 11 : 115 - 119 .
[Google Scholar](#) [Crossref](#) [PubMed](#)
28. Santoro N , Cirillo sol , Lepore MG , et al. . Effetto del polimorfismo rs997509 sull'associazione tra ectonucleotide-pirofosfatasi-fosfodiesterasi-1 e sindrome metabolica e ridotta tolleranza al glucosio nell'obesità infantile . *J Clin Endocrinol Metab* . 2009 ; 94 : 300 - 305 .
[Google Scholar](#) [Crossref](#) [PubMed](#)
29. Shashaj B , Luciano R , Contoli B , et al. . Range di riferimento di HOMA-IR in caucasici giovani normopeso e obesi . *Acta Diabetol* . 2016 ; 53 : 251 - 260 .
[Google Scholar](#) [Crossref](#) [PubMed](#)

30. Rossi F , Bellini sol , Tolone C , et al. . La variante Q63R del recettore dei cannabinoidi di tipo 2 aumenta il rischio di celiachia: implicazione per un nuovo biomarcatore molecolare e un futuro intervento terapeutico . *Pharmacol Res* . 2012 ; 66 : 88 - 94 .
[Google Scholar Crossref](#)
[PubMed](#)
31. Rossi F , Bernardo ME , Bellini sol , et al. . Il recettore dei cannabinoidi di tipo 2 come mediatore delle proprietà immunosoppressive delle cellule stromali mesenchimali . *PLoS One* . 2013 ; 8 : e80022 .
[Google Scholar Crossref](#)
[PubMed](#)
32. Kim J , Li Y . L'attivazione cronica dei recettori cannabinoidi CB2 nell'ippocampo aumenta la trasmissione sinaptica eccitatoria . *J Physiol* . 2015 ; 593 : 871 - 886 .
[Google Scholar Crossref](#)
[PubMed](#)

33. Sipe JC , Pergolato N , Gerber UN , Beutler E .
Ridotta modulazione
immunitaria
dell'endocannabinoide
mediante un comune
polimorfismo del gene del
recettore CB2 cannabinoide
2: possibile rischio di
malattie autoimmuni . *J Leuk
Biol* . 2005 ; 78 : 231 - 238 .
[Google Scholar Crossref](#)
34. Bellini sol , Olivieri UN ,
Grandone UN , UN , et al. .
Associazione tra la variante
Q63R del recettore dei
cannabinoidi di tipo 2 e
l'artrite idiopatica giovanile
oligo / poliarticolare . *Scand
J Rheum* . 2015 ; 14 : 1 - 4 .
35. Rossi F , Mancusi S , Bellini
sol , et al. . La variante
funzionale CNR2 Q63R
influenza la porpora
trombocitopenica immune
infantile . *Haematologica* .
2011 ; 96 : 1883 - 1885 .
[Google Scholar Crossref](#)
[PubMed](#)

36. Brestoff JR , Kim BS , Saenz SA , et al. . Le cellule linfoidi innate del gruppo 2 promuovono il trattamento del tessuto adiposo bianco e limitano l'obesità . *Natura* . 2015 ; 519 : 242 - 246 .
[Google Scholar](#) [Crossref](#) [PubMed](#)
37. sottovento MW , Odegaard JI , Mukundan L , et al. . Le cellule linfoidi innate di tipo 2 attivate regolano la biogenesi del grasso beige . *Cellula* . 2015 ; 160 : 74 - 87 .
[Google Scholar](#) [Crossref](#) [PubMed](#)
38. di Heredia FP , Gómez-Martínez S , Marcos UN . Obesità, infiammazione e sistema immunitario . *Proc Nutr Soc* . 2012 ; 71 : 332 - 338 .
[Google Scholar](#) [Crossref](#) [PubMed](#)

39. Qiu Y , Nguyen KD , Odegaard JI , et al. . Gli eosinofili e la segnalazione di citochine di tipo 2 nei macrofagi orchestrano lo sviluppo del grasso beige funzionale . *Cellula* . 2014 ; 157 : 1292 - 1308 .
[Google Scholar](#) [Crossref](#) [PubMed](#)
40. Massi P , Vaccani UN , Parolaro D . Cannabinoidi, sistema immunitario e rete di citochine . *Curr Pharm Design* . 2006 ; 12 : 3135 - 3146 .
[Google Scholar](#) [Crossref](#)
41. Newton circa , Chou PJ , Perkins io , Klein TW . I recettori cannabinoidi CB1 e CB2 mediano diversi aspetti del passaggio delle cellule T helper indotte da T-5-tetraidrocannabinolo T dopo l'attivazione immunitaria da infezione da *Legionella pneumophila* . *J Neuroimm Pharmacol* . 2009 ; 4 : 92 - 102 .
[Google Scholar](#) [Crossref](#)

42. Rossato M , Granzotto M ,
Macchi V , et al. . Gli
adipociti bianchi umani
esprimono il recettore freddo
TRPM8 che attivazione
induce espressione UCP1,
attivazione mitocondriale e
produzione di calore . *Mol
Cell Endocrinol* . 2014 ; 383 :
137 - 146 .