

**UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI TORINO**

**SCUOLA DI MEDICINA**

**Corso di Laurea Magistrale in Medicina e Chirurgia**



**TESI DI LAUREA**

**Cellule staminali mesenchimali ottenute da tessuto  
adiposo: studio degli effetti pro e antinfiammatori nel  
diabete mellito di tipo 1 e di tipo 2**

Relatore:

Chiar.mo Prof. Massimo Porta

Candidata:

Silvia Valerio

**Anno Accademico 2017-2018**



<b>2. OBIETTIVO DELLO STUDIO.....</b>	<b>75</b>
<b>3. MATERIALI E METODI.....</b>	<b>76</b>
3.1.Isolamento e caratterizzazione delle ASC-EV.....	76
3.2.Isolamento dei PBMC dai pazienti diabetici e stimolazione con le ASC-EV.....	77
3.3.Internalizzazione delle ASC-EV nei PBMC e misurazione dell'espressione dei markers di attivazione.....	78
3.4.Estrazione di RNA e microRNA e loro profilo di espressione con Real-Time-PCR.....	78
3.5.Analisi con ELISPOT ed ELISA.....	79
3.6.Analisi con citofluorimetria dei linfociti T helper 17 e delle cellule esprimenti IFN- $\gamma$ e TGF- $\beta$ .....	80
3.7.Analisi statistica.....	80
<b>4. RISULTATI.....</b>	<b>81</b>
4.1.Caratterizzazione delle ASC-EV.....	81
4.2.Stimolazione dei PBMC con ASC-EV.....	84
4.3.Effetti delle ASC-EV sulla risposta dei linfociti T.....	86
4.4.Effetti delle ASC-EV sulla produzione di citochine.....	87
4.5.Effetti delle ASC-EV sui linfociti T helper 17.....	92
<b>5. DISCUSSIONE.....</b>	<b>93</b>
<b>6. CONCLUSIONI.....</b>	<b>99</b>
<b>7. BIBLIOGRAFIA.....</b>	<b>100</b>

## **ABSTRACT**

### **BACKGROUND E OBIETTIVI**

È noto che il diabete mellito di tipo 1 è una patologia infiammatoria immuno-mediata ma recenti studi hanno dimostrato che anche il diabete di tipo 2 ha una componente infiammatoria con segni istopatologici di insulite. L'insulinoreistenza correla con la disfunzione adipocitaria, infatti il tessuto adiposo è il più grande organo endocrino e svolge anche funzioni immunitarie. Più recentemente, studi in modelli animali di diabete mellito di tipo 1 hanno dimostrato che disfunzione adipocitaria e alti livelli di citochine proinfiammatorie possono intervenire direttamente anche nello sviluppo e nella progressione del diabete di tipo 1. I fattori prodotti dal tessuto adiposo includono ormoni, adipochine, fattori di crescita, citochine pro e antinfiammatorie (come TNF- $\alpha$ , IL-1, IL-4, IL-6, IL-10 e IL-17), proteine di fase acuta e vescicole extracellulari (EV). Queste ultime, rilasciate dalle cellule e convoglianti RNA, microRNA e proteine, possono giocare un ruolo nella comunicazione intercellulare. Precedenti studi in vitro hanno dimostrato che l'utilizzo di EV derivate dalle cellule staminali mesenchimali del midollo osseo (MSC-EV) è in grado di promuovere nei linfociti T di pazienti con diabete di tipo 1 una risposta antinfiammatoria. Inoltre sono stati effettuati studi sulla fattibilità ed efficacia dell'utilizzo delle MSC nel diabete di tipo 2.

Nel presente studio si intende valutare se le vescicole extracellulari derivate dalle cellule staminali mesenchimali del tessuto adiposo (ASC-EV) possano influenzare la risposta infiammatoria nel diabete di tipo 1 e di tipo 2, agendo sui linfociti T.

### **MATERIALI E METODI**

Le EV sono state purificate da cellule staminali mesenchimali di tessuto adiposo attraverso ultracentrifugazione. Le cellule mononucleate del sangue periferico (PBMC) sono state ottenute da 8 pazienti con diabete di tipo 1 di recente insorgenza e da 8 pazienti con diabete di tipo 2 di lunga diagnosi in terapia con metformina. La risposta dei PBMC alla stimolazione con l'autoantigene acido glutammico decarbossilasi (GAD65) o con il vaccino polivalente Pentavac (PV), rispettivamente nei pazienti con diabete mellito di tipo 1 e di tipo 2, è stata rilevata tramite la valutazione della produzione di IFN- $\gamma$  con la metodica ELISPOT, in

assenza o in presenza di EV derivate dalle ASC. I livelli delle citochine pro e antinfiammatorie prodotte e rilasciate nel surnatante (quali IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$ , IL-6, IL-17, TGF- $\beta$ ) sono stati misurati tramite analisi ELISA e tramite analisi intracitofluorimetrica. L'espressione dei linfociti T con fenotipo Th17 è stata valutata con analisi intracitofluorimetrica. I livelli di espressione di TGF- $\beta$  e miR-146 sono stati valutati con real-time-PCR quantitativa.

## **RISULTATI**

Le ASC-EV sono state internalizzate dai PBMC, come è stato confermato dall'analisi citofluorimetrica. Nei PBMC ottenuti da pazienti con diabete di tipo 1 e stimolati con GAD65, le ASC-EV causano un aumento della produzione di IFN- $\gamma$ , evidenziato da un aumento degli spot all'analisi ELISPOT. Lo stesso risultato è ottenuto nei PBMC di pazienti con diabete di tipo 2 stimolati con PV e ASC-EV. Inoltre dall'analisi con ELISA è emerso come le ASC-EV aumentino i livelli di IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$ , IL-6 e IL-17 nei PBMC ottenuti da pazienti con diabete di tipo 1 e di tipo 2 mentre i livelli di TGF- $\beta$  risultino ridotti. L'analisi intracitofluorimetrica rivela una riduzione di TGF- $\beta$  e un aumento della produzione di IFN- $\gamma$  e di IL-17, indicativo dello sbilanciamento dei linfociti verso un fenotipo Th17. Infine, il trattamento con le ASC-EV evidenzia, a livello molecolare, una diminuzione dei livelli di espressione di TGF- $\beta$  e miR-146.

## **CONCLUSIONI**

Le ASC-EV potrebbero indurre un fenotipo proinfiammatorio nei linfociti T dei pazienti diabetici. Nel contesto del diabete di tipo 1, le ASC-EV potrebbero contribuire all'aumento dei livelli di citochine proinfiammatorie, all'inibizione della produzione di insulina e possibilmente anche alla perdita di tolleranza e alla morte delle  $\beta$  cellule. Nel diabete di tipo 2, le cellule ASC potrebbero contribuire alla lipotossicità e all'esacerbazione dell'infiammazione, anche nel contesto delle isole pancreatiche.

## **BACKGROUND AND AIMS**

The concept of immune-mediated inflammatory disease is established for type 1 diabetes, but recent evidence indicates type 2 diabetes as an autoinflammatory disease, with signs of insulinitis as well. Insulin-resistance is related to adipocyte dysfunction and adipose tissue is the largest endocrine organ with immune functions. More recently, studies in animal models of type 1 diabetes revealed that adipocyte dysfunction and high levels of inflammatory cytokines can directly play a role in the onset and progression of type 1 diabetes. Factors produced by adipocytes include hormones, adipokines, growth factors, pro- and anti-inflammatory cytokines (as TNF- $\alpha$ , IL-1, IL-4, IL-6, IL-10 and IL-17), acute-phase proteins and extracellular vesicles (EVs). EVs, released by cells and carrying RNA, microRNA and proteins, can play a role in intercellular communication. Previous in vitro studies using EVs derived from bone-marrow mesenchymal stem cells (MSC-EVs) indicated the promotion of an anti-inflammatory T cell response in type 1 diabetes. Other studies investigated the feasibility and efficacy of application of MSC even in type 2 diabetes.

In the present study we evaluated whether extracellular vesicles derived from ASC (ASC-EVs) may affect inflammatory response in type 1 and type 2 diabetes, acting on T cells.

## **MATERIALS AND METHODS**

EVs were purified from heterologous human adipose mesenchymal stem cells by differential centrifugation. PBMCs were obtained from 8 patients with recent onset type 1 diabetes and 8 patients with long standing type 2 diabetes on metformin. PBMC responses to stimulation with glutamic acid decarboxylase (GAD65) or polyvalent vaccine Penatvac (PV), in type 1 diabetic or in type 2 diabetic patients respectively, were assessed by IFN- $\gamma$  ELISPOT analysis, in absence or presence of ASC-EVs. Levels of pro- and anti-inflammatory cytokines (as IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$ , IL-6, IL-17 and TGF- $\beta$ ) were measured in the supernatant by ELISA and by intracellular flow cytometry analysis. T helper 17 (Th17) analysis was performed by intracellular flow cytometry analysis. Levels of expression of TGF- $\beta$  and miR-146 were detected with quantitative Real-Time-PCR.

## **RESULTS**

ASC-EVs were internalised by PBMCs, as assessed by flow cytometry analysis. ASC-EVs increased IFN- $\gamma$  spots in GAD65-stimulated PBMCs obtained from type 1 diabetic patients and in PV-stimulated PBMCs obtained from type 2 diabetics patients, as assessed by the ELISPOT analysis. Moreover, ASC-EVs increased the levels of IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$ , IL-6 and IL-17 and decreased the levels of TGF- $\beta$  in PBMCs obtained both from type 1 and type 2 diabetic patients. Furthermore, intracellular flow cytometry analysis revealed a decreased production of TGF- $\beta$  and an increased production of IFN- $\gamma$  and of IL-17, indicating a shift of T cells toward Th17 phenotype. Finally, ASC-EV decreased the levels of expression TGF- $\beta$  and miR-146.

## **CONCLUSIONS**

ASC-EVs could induce a pro-inflammatory phenotype in T cells of diabetic patients. In the context of type 1 diabetes, ASC-EVs may contribute to the increased levels of cytokines, to the inhibition of insulin production and possibly to the loss of self-tolerance and  $\beta$  cells death. In type 2 diabetes ASC-EV may contribute to lipotoxicity and exacerbate inflammation, also in the context of pancreatic islets.

# **1. INTRODUZIONE**

## **1.1. Tessuto adiposo e ruolo nell'infiammazione**

Il tessuto adiposo è stato riconosciuto nel tempo come un organo endocrino fondamentale non solo nella regolazione energetica e del flusso degli acidi grassi circolanti ma anche nelle funzioni metaboliche ed endocrine a livello sia locale che sistemico ed è uno dei tessuti maggiormente insulinosensibili: l'insulina stimola l'accumulo di trigliceridi nel tessuto adiposo attraverso numerosi meccanismi. Esso infatti accumula e libera energia sotto forma di lipidi in base alle differenti richieste metaboliche e, come organo endocrino, produce numerosi fattori bioattivi noti come "adipochine", in grado di comunicare con altri organi e di modulare un'ampia gamma di segnali coinvolti a livello immunitario, endocrino, rigenerativo e meccanico. Inoltre, in determinate condizioni e sotto opportuni stimoli, il tessuto adiposo può ossidare lipidi e/o di dissipare energia sotto forma di calore al fine di mantenere l'eutermia [1].

### **1.1.1. Caratteristiche fenotipiche del tessuto adiposo**

Il tessuto adiposo è composto da adipociti maturi, pre-adipociti, cellule mesenchimali e da una frazione stroma-vascolare (SVF) che comprende endotelio vascolare, cellule muscolari lisce, fibroblasti e diverse popolazioni di leucociti [2]. Sebbene gli adipociti bianchi rappresentino la maggior parte del tessuto adiposo, il numero degli adipociti maturi nell'uomo si aggira attorno ai 1-2 milioni per grammo di tessuto, mentre le cellule della SVF si aggirano attorno a 4-6 milioni per grammo di tessuto. I pre-adipociti derivano da cellule progenitrici mesenchimali multipotenti, possono essere associati alla formazione di nuove cellule endoteliali e periciti e sono anche potenzialmente orientati a formare tessuto adiposo bruno, miociti, osteociti, condrociti o nella direzione della linea macrofagica [1]. Quasi tutte le cellule immunitarie come macrofagi residenti, mastociti, monociti, cellule dendritiche, cellule natural killer, linfociti T e B, neutrofili e eosinofili sono stati ritrovati nel tessuto adiposo [2].



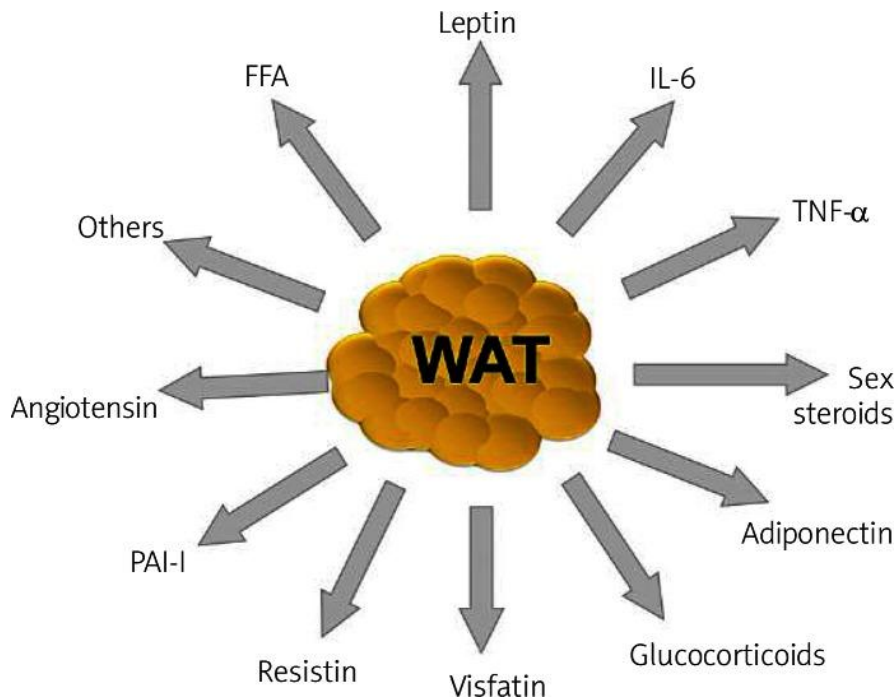
Il tessuto adiposo è generalmente suddiviso, in base alla sede, in tessuto adiposo sottocutaneo, tra il derma, l'aponeurosi e le fasce muscolari, che comprende anche il tessuto adiposo mammario e il tessuto adiposo degli organi interni, e in tessuto adiposo viscerale. Quest'ultimo è drenato dalla vena porta quindi è in stretta relazione con il fegato; questa caratteristica lo pone al centro di numerose ipotesi che legano l'accumulo di tessuto adiposo in questa sede con lo sviluppo di malattie metaboliche [1]. I due tipi di tessuto adiposo sono diversi non solo dal punto di vista morfologico ma anche biologico, poiché mostrano una diversa risposta al segnale insulinico, diversa secrezione di citochine e diversa captazione di glucosio. Infatti il tessuto adiposo viscerale è più efficiente dal punto di vista metabolico in condizioni fisiologiche ed è in grado di accumulare i grassi introdotti con la dieta in misura maggiore rispetto a quanto non faccia quello sottocutaneo [3]. Tuttavia si è notato che il tessuto adiposo sottocutaneo è protettivo nei confronti dell'insorgenza dell'insulinoresistenza, mentre il tessuto adiposo viscerale mostra l'effetto opposto [4]. La produzione di nuovi adipociti è una condizione necessaria alla conservazione e al rinnovamento del tessuto adiposo e deriva dalla proliferazione e differenziazione dei pre-adipociti. Sulla base delle differenze riscontrate nelle funzioni metaboliche e nell'espressione genica delle cellule presenti nel tessuto adiposo a seconda della sede analizzata, sembra sempre più evidente che pre-adipociti dei vari distretti rappresentino popolazioni cellulari distinte [1]. È risaputo che le diverse sedi del tessuto adiposo bianco hanno diverse caratteristiche metaboliche ed endocrine. Ad esempio il tessuto adiposo bianco mammario e gluteo è altamente sensibile agli estrogeni mentre quello localizzato nella parte alta del dorso e nel collo è più sensibile ai glucocorticoidi. Il tessuto adiposo bianco viscerale intraddominale ha un profilo di secrezione di adipochine che lo mette in relazione con il meccanismo dell'insulinoresistenza e con il diabete mellito di tipo 2 mentre il tessuto adiposo periarterioso sembra essere nato per regolare il flusso di sangue postprandiale agli organi; tuttavia un eccesso di questo tessuto può essere nocivo[5].

In base alla sua specificità funzionale il tessuto adiposo può essere anche suddiviso in tessuto adiposo bianco e tessuto adiposo bruno. Il primo è composto da adipociti bianchi, cellule bianche e tondeggianti, con un diametro che varia dai 25 ai 200  $\mu\text{m}$

e che contengono una singola goccia lipidica circondata da un sottile strato citoplasmatico [6]. La goccia lipidica è formata da trigliceridi e occupa il 90% del volume della cellula mentre il nucleo è appiattito e periferico e i mitocondri sono piccoli, allungati e presenti in quantità variabile [7]. Il tessuto adiposo bruno invece è formato da adipociti che contengono trigliceridi in multipli e piccoli vacuoli, tipicamente poligonali e in diametro variabile. Il nucleo è centrale e gli organelli più caratteristici sono i mitocondri che sono solitamente grandi, sferici, ricchi di creste e numerosi [7]. La funzione principale degli adipociti bianchi è quella di accumulare e liberare energia e di secernere adipochine, mentre quella degli adipociti bruni è la termogenesi; esso dunque è abbondante nei piccoli mammiferi e nei neonati (soprattutto nel collo e nella regione interscapolare), i quali sono predisposti a perdita di temperatura per il basso rapporto volume/superficie e per i quali è difficile mantenere un'adeguata temperatura centrale [7]. Anche gli adulti possono mostrare tessuto bruno in sede cervicale, sopraclavare, mediastinica, paravertebrale, perirenale [1] La proteina disaccoppiante UCP-1, grazie alla quale gli adipociti bruni possono svolgere la loro funzione termogenica, è una proteina mitocondriale che è in grado di produrre calore a seguito del disaccoppiamento tra flusso di elettroni e sintesi di ATP lungo la catena respiratoria [8], [9]. Le cellule staminali mesenchimali da cui derivano gli adipociti bruni sono le stesse che danno origine a quelli bianchi; la differenza è che, in fase di gastrula, le cellule staminali mesenchimali del mesoderma parassiale, che esprimono il fattore miogenico Myf5, si differenziano in adipociti bruni o miociti, mentre quelle del mesoderma laterale, che non lo esprimono, diventano adipociti bianchi o periciti associati ai vasi sanguigni. Sono stati anche recentemente scoperti una nuova classe di adipociti definiti beige: sono adipociti Myf5 negativi derivanti da cellule endoteliali e perivascolari e che in condizioni basali esprimono bassi livelli di UCP-1; quest'ultima tuttavia aumenta in corso di stimolo adrenergico indotto dal freddo e dall'esercizio fisico [10], [11].

### 1.1.2. Adipochine

Il tessuto adiposo bianco un tempo veniva considerato un tessuto poco attivo mentre oggi è ritenuto un tessuto altamente dinamico, che sintetizza e secerne una grande quantità di lipidi e fattori regolatori di un elevato numero di processi metabolici e fisiologici. Fin dagli anni '80 era noto come il tessuto adiposo bianco fosse in grado di secernere ormoni steroidei ma fu solo dal 1994, con la scoperta della leptina, che il tessuto adiposo venne riconosciuto come un organo endocrino. Molti fattori secreti con meccanismi paracrini, autocrini ed endocrini furono successivamente identificati, e tra questi gli acidi grassi sono le molecole quantitativamente più importanti e sono rilasciati nei periodi di bilancio energetico negativo. Altre molecole lipidiche secrete dal tessuto adiposo bianco sono prostanoidi, sintetizzati dal tessuto stesso, colesterolo e retinoidi, che sono immagazzinati per essere poi successivamente rilasciati e ormoni steroidei (steroidi sessuali e glucocorticoidi). Il tessuto adiposo produce inoltre mediatori pro e antinfiammatori che influenzano l'infiammazione locale e sistemica; tra questi mediatori ci sono le adipochine, proteine prodotte dal tessuto adiposo che fungono da ormoni [2]. Questo termine dovrebbe essere usato per indicare proteine sintetizzate e secrete dagli adipociti, tuttavia esso è generalmente utilizzato per proteine prodotte e rilasciate anche da altri tipi cellulari contenuti nel tessuto adiposo, ad esempio i macrofagi. Le adipochine hanno una struttura e dei ruoli fisiologici molto diversi tra loro e molte di esse sono correlate al sistema immunitario; infatti tra le adipochine sono comprese le classiche citochine pro e antinfiammatorie tumor necrosis factor  $\alpha$  (TNF $\alpha$ ), interleuchina 1 (IL-1), interleuchina 6 (IL-6), interleuchina 8 (IL-8), interleuchina 10 (IL-10), interleuchina 4 (IL-4), interleuchina 13 (IL-13), monocyte chemoattractant protein 1 (MCP-1). Altre adipochine sono le proteine coinvolte nella regolazione del bilancio energetico (leptina), nel controllo della pressione arteriosa (angiotensinogeno), nell'omeostasi vascolare (plasminogen activator inhibitor 1, PAI-1), nel metabolismo lipidico (retinol binding protein 4 o RBP-4, cholesteryl ester transfer protein o CETP), nell'omeostasi glucidica (adiponectina, resistina, visfatina) e nell'angiogenesi (vascular endothelial growth factor, VEGF), così come fattori di crescita (transforming growth factor, TGF) e proteine di fase acuta (aptoglobina,  $\alpha$ 1-glicoproteina acida) [5] (**figura 1**).



(Riadattata da Coelho et al, 2013 [20])

**Figura 1:** Il tessuto adiposo come organo endocrino

#### 1.1.2.1. Adipochine antinfiammatorie

Le adipochine antinfiammatorie comprendono adiponectina, C1q/TNF-related protein (CTRP), omentina e secreted-frizzled-related protein 5 (SFRP5). L'**adiponectina** è la più conosciuta e la più abbondante adipochina del siero umano. A differenza delle altre, che sono più rappresentate nel tessuto adiposo sottocutaneo, l'adiponectina si trova soprattutto nel tessuto adiposo viscerale. La restrizione calorica, l'invecchiamento, il deficit di estrogeni, il diabete mellito di tipo 1 e il trattamento con tiazolidinedioni aumentano i suoi livelli sierici mentre l'obesità, il diabete mellito di tipo 2, lo stress ossidativo e il fumo di sigaretta li riducono [2]. È stato recentemente dimostrato che non solo segnali infiammatori ma anche un sovraccarico marziale sopprimono l'espressione di adiponectina negli adipociti di soggetti obesi attraverso forkhead box protein O1 (FOXO1), mentre gli antagonisti di peroxisome proliferator-activated receptor- $\gamma$  (PPAR $\gamma$ ) stimolano la sua espressione [12]. L'adiponectina è una molecola complessa che forma in circolo

complessi ad alto, medio e basso peso molecolare e i suoi effetti sono mediati dai recettori AdipoR1 e AdipoR2 che attivano l'AMP-activated protein kinase (AMPK) nelle cellule e nei tessuti dell'immunità. In particolare i complessi ad alto peso molecolare hanno proprietà antinfiammatorie e grazie al blocco dell'attivazione di nuclear factor-activated kappa-light-chain-enhancer of activated B cells (NF-kB) e alla riduzione di citochine come TNF $\alpha$ , IL-6 e IL-18 [2]. Ad esempio questa adipochina sembra attenuare l'infiammazione vascolare che gioca un ruolo negativo nello sviluppo dell'aneurisma aortico. Inoltre i polmoni di topi knock-out per il gene dell'adiponectina sviluppano un fenotipo enfisematoso con macrofagi alveolari attivati che producono più alti livelli di TNF $\alpha$  e matrix metalloproteinase 12 (MMP12); questi animali sviluppano anche ipertensione polmonare e infiammazione perivascolare. Essa infine protegge dal danno polmonare e dall'ischemia miocardica mentre può avere un ruolo proinfiammatorio nelle articolazioni in corso di artrite, promuovendo l'espressione di ciclossigenasi 2 (COX2) e la sintesi di prostaglandina E<sub>2</sub> (PGE<sub>2</sub>) [2]. L'adiponectina migliora l'insulinosensibilità in modelli di obesità ottenuti geneticamente o indotti dalla dieta e, nelle cellule muscolari, l'aumento della sensibilità in vitro dipende dall'attivazione dell'AMPK e dalla conseguente riduzione dell'attività di mammalian target of rapamycin/S6 chinasi (mTOR/S6 chinasi). In aggiunta essa stimola l'ossidazione degli acidi grassi e l'uptake di glucosio nel muscolo scheletrico e nel tessuto adiposo [13]. Un altro ruolo importante è la soppressione del rilascio di glucosio epatico sempre tramite l'attivazione della AMPK. Kubota et al. (2007) hanno dimostrato che l'adiponectina regola il dispendio energetico attraverso l'attivazione di AMPK a livello ipotalamico, dove adipoR1 e adipoR2 sono co-localizzati con il recettore Ob-R della leptina e che il fluido cerebrospinale contiene elevati livelli di adiponectina che arriva dal sangue, in quanto l'iniezione plasmatica di questo ormone ne aumenta i livelli nel fluido cerebrospinale dei topi knock-out per il gene dell'adiponectina [14]. Al contrario della leptina, che arriva a livello cerebrale tramite endocitosi dopo legame con il suo recettore, il meccanismo attraverso il quale trimeri ed esameri di adiponectina somministrati per via endovenosa raggiungono l'ipotalamo resta sconosciuto [13].

Le conoscenze riguardo le altre adipochine antinfiammatorie sono molto più ridotte. Le **CTRP** sono strutturalmente simili all'adiponectina e ne sono state descritte almeno 15 isoforme: la CTRP3 ad esempio riduce la produzione di citochine nei monociti e negli adipociti stimolati con lipopolisaccaride e acidi grassi liberi, inibendo l'attivazione di TLR4. CTRP13, invece, inibisce l'infiammazione negli epatociti carichi di lipidi e migliora l'insulinosensibilità [2].

L'**omentina** è una nuova adipochina, prodotta principalmente nel tessuto adiposo viscerale e in particolare nel SVF, che inibisce l'espressione di COX2 indotta da TNF $\alpha$  nelle cellule endoteliali e attiva la NO sintetasi endoteliale [2], [15]. Tan et al. (2010) hanno dimostrato che l'omentina riduce in vitro la migrazione di cellule endoteliali e l'angiogenesi, il livelli di VEGF e di proteina C reattiva [16]. I livelli di omentina nel sangue sono inversamente correlati con l'obesità e sono soppressi da glucosio e insulina [12]. Infatti essa è altamente espressa nel TA perivascolare ed epicardico e sembra quindi avere un ruolo protettivo nei confronti di aterosclerosi coronarica, disturbi cardiovascolari correlati all'obesità e l'ipertensione, dato il suo effetto vasodilatante [15].

**SFRP5** è una proteina con un dominio N-terminale omologo a quello delle proteine della famiglia di WNT; dunque essa, che è notevolmente espressa nel tessuto adiposo bianco murino, previene il legame di WNT con il suo recettore. Quest'ultima molecola, in particolare WNT5a sembra essere strettamente correlata all'infiammazione e in topi e uomini obesi i livelli SFRP5 sono ridotti mentre quelli di WNT5a sono aumentati, il che suggerisce che SFRP5 può avere la capacità di attenuare l'effetto infiammatorio di WNT5a nel tessuto adiposo [12]. L'effetto finale è una riduzione delle sintesi di TNF $\alpha$ , IL-1 $\beta$  e CCL2-MCP1 da parte dei macrofagi [2].

La **visfatina** è stata recentemente identificata come un'adipochina secreta dagli adipociti del grasso viscerale e che riduce l'insulinoresistenza. Questa molecola lega e attiva il recettore insulinico ma non compete con l'insulina, dunque le proteine hanno siti di legame differenti. Questa proteina è stata identificata circa dieci anni fa e da allora è stata correlata a diverse patologie infiammatorie come

l'ALI (acute lung injury). In più l'espressione di visfatina sembra essere aumentata nei neutrofili attivati e sembra inibire la loro apoptosi [17].

### 1.1.2.2. Adipochine proinfiammatorie

Tra le adipochine proinfiammatorie, la **leptina** è la più conosciuta ed è stata dapprima descritta come ormone della sazietà. Come l'adiponectina, essa è prodotta principalmente dagli adipociti ma ha un'omologia strutturale con citochine proinfiammatorie come IL-6, IL-12 e granulocyte-colony stimulating factor (G-CSF) [17]. L'espressione della leptina è regolata dall'aumento ponderale, dall'introito di cibo e dall'ipossia [18]. La sua funzione principale è il controllo dell'appetito, infatti topi con mutazione del gene codificante per la leptina (ob/ob mice) oppure per il gene codificante il suo recettore (db/db mice) hanno un fenotipo obeso e sono utilizzati come modello di obesità in moltissimi studi [17]. L'isoforma lunga del suo recettore, che è espresso da quasi tutte le cellule immunitarie, da avvio al segnale intracellulare che attiva la tirosin-chinasi Janus Kinase 2 (JAK2), il fattore di trascrizione signal transducer and activator of transcription 3 (STAT3), mitogen-activated protein kinase (MAPK), extracellular-signal regulated kinase 1/2 (ERK1/2) e il pathway di fosfatidil-inositolo 3 chinasi (PI3K) che attiva la risposta immunitaria innata [2]. La leptina può aumentare direttamente la produzione di determinate citochine come IL-6, IL-12, IL-18 e TNF $\alpha$ , le chemochine IL-8 e CCL2/MCP-1 e i mediatori lipidici PGE<sub>2</sub>, cisteinil-leucotrieni (cysLTs) e leucotriene B<sub>4</sub> (LTB<sub>4</sub>) nei monociti del sangue periferico e nei macrofagi tissutali. La leptina è in grado di indurre la produzione di ROS in macrofagi, neutrofili, cellule endoteliali e potenzia l'espressione di NO sintetasi attivata da interferon- $\gamma$  (IFN $\gamma$ ), potenzia l'aggregazione piastrinica e promuove l'interazione tra leucociti e cellule endoteliali aumentando l'espressione di molecole di adesione [2]. Infine la leptina è in grado di aumentare la produzione di IL-2 e IFN $\gamma$  da parte dei linfociti Th1 e la risposta dei linfociti T helper 17 (Th17) e di sopprimere il livelli di IL-4 prodotta da linfociti T helper 2 (Th2) [17].

La **resistina** e le molecole simili furono dapprima caratterizzate nei topi come mediatori dell'insulinoresistenza, del diabete mellito di tipo 2 e della sindrome

metabolica. Mentre nei topi gli adipociti sono la fonte più importante di resistina, nell'uomo essa è principalmente prodotta da monociti e macrofagi [2]. È stato dimostrato che la molecola circola in due diverse forme: una forma prevalente esamerica ad alto peso molecolare e un complesso a basso peso molecolare, meno presente ma biologicamente più attivo. L'mRNA codificante per la resistina può essere riscontrato in vari tessuti murini e umani: tessuto adiposo, ipotalamo, surrene, milza, muscolo scheletrico, pancreas, tratto gastro-intestinale[17]. La funzione della resistina nell'uomo non è del tutto chiara: alcuni autori hanno dimostrato che i livelli plasmatici dell'ormone sono elevati negli obesi mentre altri hanno riportato che atleti con elevati livelli di insulinosensibilità presentano livelli di resistina plasmatica maggiori rispetto ai controlli obesi [15]. La resistina stimola le cellule mononucleate periferiche a produrre IL-6 e TNF $\alpha$  attraverso l'attivazione della via di NF-kB mentre gli inibitori di PPAR $\gamma$  come il rosiglitazone sopprimono l'espressione di resistina nel tessuto adiposo. Essa inoltre attiva JNK e p38 MAPK per promuovere l'insulinoresistenza attraverso il legame di toll like receptor 4 (TLR4) nell'ipotalamo[12]. Gli effetti proinfiammatori sono mediati da CAP-1, recentemente identificato come recettore della resistina [2].

Ci sono poi diverse adipochine meno studiate che sono coinvolte nel meccanismo dell'infiammazione associato all'obesità.

La **chemerina** è espressa in molti tessuti (soprattutto negli adipociti maturi) ma non nei leucociti ed è un fattore chemiotattico per monociti e cellule dendritiche e induce l'accumulo di infiltrato infiammatorio in patologie come la rettocolite ulcerosa e il lupus cutaneo [12]. Viene secreto come pre-pro-ormone e necessita di un clivaggio per essere attivato [2].

**RBP4 (retinol binding protein 4)** appartiene alla famiglia delle proteine che trasportano il retinolo dal fegato ai tessuti periferici. È prodotta dal fegato, dal tessuto adiposo e dai macrofagi; contribuisce all'infiammazione promuovendo l'attivazione delle cellule Th1. Elevati livelli di RBP4 causano insulinoresistenza attraverso l'induzione dell'infiammazione in monociti, macrofagi e cellule dendritiche e questo porta alla presentazione dell'antigene e all'attivazione sia della risposta immunitaria innata che dell'adattativa. Grandi studi epidemiologici hanno dimostrato che RBP4 è un marker dell'insulinoresistenza, del rischio



cardiovascolare e della sindrome metabolica e una mutazione genetica a livello del suo promotore è associata ad un rischio due volte maggiore di diabete mellito di tipo 2 [19].

La **lipocalina 2 (LCN2)** è prodotta dagli adipociti ed è indotta dagli stimoli infiammatori che attivano NF-kB nel tessuto adiposo. Essa trasporta molecole idrofobiche come retinoidi, acido arachidonico, steroidi e LTB4. E gioca anche un ruolo importante nella difesa dell'ospite da infezioni batteriche grazie al sequestro di ferro [2].

### **1.1.3. Tessuto adiposo e obesità**

L'obesità è caratterizzata da una eccessiva espansione del tessuto adiposo ed è una condizione clinica definita da un indice di massa corporea o body mass index (BMI) maggiore o uguale a 30 kg/m<sup>2</sup> (secondo la definizione dell'OMS, 2013).

La prevalenza mondiale dell'obesità e delle sue complicanze metaboliche è aumentata notevolmente nelle ultime decadi. Secondo l'Organizzazione Mondiale della Sanità essa è quasi raddoppiata dal 1980 al 2008 e, tra gli adulti con più di 18 anni, l'11% degli uomini e il 15% delle donne erano obese nel 2014 a livello mondiale[21]. Le proiezioni basate sul trend attuale dell'obesità fanno pensare che nel 2030 ci saranno più di 65 milioni di adulti obesi negli Stati Uniti e più di 11 milioni nel Regno Unito, con 6-8,5 milioni di casi di diabete e 5,7-7,3 milioni di casi di patologie cardiovascolari e di infarto in USA e UK [22]. Per quanto riguarda la situazione italiana dal rapporto Osservasalute 2013, che fa riferimento ai risultati dell'Indagine Multiscopo dell'ISTAT, è emerso come nel 2012 il 35,6% della popolazione adulta sia in sovrappeso mentre il 10,4% sia obesa. Esiste inoltre un gradiente Nord-Sud e le regioni meridionali presentano un maggior percentuale e di sovrappeso e obesità [1].

Le ipotesi avanzate come possibile spiegazione della drammatica espansione del fenomeno comprendono quella della selezione di un genotipo risparmiatore, l'aumento della sedentarietà, l'aumento del consumo di zuccheri e grassi saturi [1]. La teoria del genotipo risparmiatore sostiene che questo genotipo sia stato selezionato nel corso dell'evoluzione in seguito a periodi ciclici di carestie; tuttavia

questi individui si adattano male alla disponibilità di cibo delle epoche moderne. Questa teoria è stata utilizzata per spiegare l'aumento significativo dell'obesità tra le popolazioni indigene. Al contrario, la teoria del fenotipo risparmiatore sostiene che ci sia una mancata corrispondenza tra l'ambiente intrauterino e quello a cui si esposti in età adulta: i cambiamenti che il feto mette in atto per sostenere una situazione di denutrizione intrauterina lo porterebbero a sopravvivere nelle prime fasi ma potrebbero essere la causa dello sviluppo di patologie metaboliche nell'età adulta[23].

Bisogna partire dal presupposto per cui l'aumento della massa grassa corporea si verifica durante un periodo di prolungato bilancio energetico positivo. L'accumulo di tessuto adiposo può derivare dal grasso esogeno oppure da precursori di substrati non grassi, soprattutto carboidrati, attraverso un processo definito lipogenesi de novo [1].

Nel 1947 il professor Jean Vague, un medico francese, osservò per la prima volta che pazienti con il diabete di tipo 2, le patologie cardiovascolari, la gotta e l'ipertensione non erano per forza maggiormente obesi di coloro che non avevano queste complicanze e quindi identificò due tipi principali di obesità, agli estremi di uno spettro fenotipico continuo: obesità androide e ginoide. La prima veniva usata per indicare un tipo di obesità in cui il grasso si accumula maggiormente a livello del tronco e della parte superiore del corpo (definita anche obesità a mela), mentre il secondo termine indica un accumulo di tessuto adiposo a livello di fianchi e cosce. Questa disposizione è più tipica del sesso femminile (obesità a pera) ed è meno associato alle complicanze prima citate [24]. Esiste una grande eterogeneità individuale nell'incremento ponderale quando i soggetti diversi sono esposti a regimi di eccesso calorico simili e, a parità di aumento di peso, alcuni sono maggiormente protetti o predisposti a sviluppare complicanze metaboliche e cardiovascolari [1]. I fattori eziologici che maggiormente contribuiscono all'accumulo viscerale di grasso sono, oltre all'introito calorico e alla sedentarietà, l'età (molti studi documentano cambiamenti età-correlati del tipo di deposizione di tessuto adiposo, come evidenziato da un aumento del WHR o waist-hip ratio), il sesso, gli ormoni sessuali, la genetica, l'etnia, il sistema cannabinoide, l'ormone della crescita, lo stress, l'asse ipotalamo-ipofisi-surrene e i glucocorticoidi [24].

Il rimodellamento del tessuto adiposo è un processo continuativo che viene patologicamente accelerato nell'obesità. Tuttavia l'espansione del tessuto adiposo non è necessariamente associata a cambiamenti patologici [25]. Si devono analizzare due fenotipi estremi che sono l'obesità sana (healthy obesity), soggetti che pur avendo un BMI aumentato conservano la sensibilità all'insulina e non presentano alterazioni metaboliche, e i soggetti normopeso con alterazioni metaboliche tipiche dell'obesità viscerale) [26]. L'obesità sana si caratterizza per un tessuto sottocutaneo più rappresentato rispetto a quello viscerale, un profilo metabolico normale, un profilo ormonale caratterizzato da alti livelli di adiponectina e riduzione dei livelli circolanti di PCR e  $\alpha$ 1-antitripsina mentre l'obesità patologica vede una maggior espansione del tessuto viscerale con marker infiammatori elevati (PCR, TNF- $\alpha$ , C3, IL-6 e IL-8), bassi livelli di adiponectina, insulinoresistenza, elevati livelli di acidi grassi liberi, ipertrigliceridemia, bassi livelli di colesterolo HDL [24], [27].

L'espansione del tessuto avviene tramite due diversi meccanismi: l'adipogenesi e la lipogenesi.

La **lipogenesi** è un aumento del contenuto lipidico in adipociti maturi preesistenti ed è nota anche come ipertrofia poiché porta ad un aumento delle dimensioni dell'adipocita mentre l'**adipogenesi**, o iperplasia, consiste nell'incremento del differenziamento dei precursori adipocitari in adipociti maturi [25]. Il meccanismo dell'ipertrofia sembra essere maggiormente associato ad effetti metabolici positivi mentre l'iperplasia è accompagnata dallo sviluppo di alterazioni metaboliche e di aumentato rischio cardiovascolare [1]. Spalding et al. dimostrarono che il numero di cellule adipose nell'uomo è stabilito alla pubertà e che c'è un rinnovamento annuale del tessuto adiposo sottocutaneo di circa il 10% [28]. L'obesità ipertrofica è associata ad un ridotto turnover delle cellule adipose e ad una ridotta adipogenesi [19]. Inoltre il numero delle cellule progenitrici non è ridotto nell'obesità ipertrofica mentre vi è una compromissione dell'abilità dei precursori di dare inizio all'adipogenesi e allo sviluppo cellulare [19].

L'ipertrofia adipocitaria è regolata principalmente dall'insulina che è attivata da stimoli come l'aumentata captazione di glucosio da parte del trasportatore del

glucosio di tipo 4 (GLUT4), l'attivazione della lipoprotein-lipasi con rilascio degli acidi grassi e del glicerolo dai trigliceridi contenuti nelle VLDL e nei chilomicroni e la stimolazione della captazione di glicerolo tramite l'aumentata espressione di acquaporina 3, 7 e 9 (AQP3, AQP7 e AQP9) nell'adipocita. Il risultato finale di questo processo è l'esterificazione degli acidi grassi e l'accumulo di trigliceridi nell'adipocita [1]. È stato dimostrato come topi che iper-esprimono GLUT4 a livello del tessuto adiposo sono caratterizzati da iperplasia adipocitaria e ciò è un esempio di come l'obesità iperplastica fornisce protezione dall'insulinoreistenza [19]. È stata recentemente scoperta una nuova classe di lipidi, i FAHFA (fatty acid esters of hydroxy fatty acids), presenti in molti tessuti ma soprattutto nel tessuto adiposo bianco e bruno. Questi lipidi incrementano l'effetto dell'insulina sull'uptake del glucosio negli adipociti e aumentano la secrezione di glucagone like peptide 1 (GLP-1) stimolata dal glucosio e la secrezione di insulina dalle  $\beta$  cellule pancreatiche. Questi lipidi hanno anche un effetto antinfiammatorio e nei topi con elevata espressione di GLUT4 sono stati trovati elevati livelli di FAHFA nel tessuto adiposo, il contrario accade nei topi con bassi livelli di GLUT4, come i topi obesi sottoposti ad una dieta ricca di grassi [19].

Invece il reclutamento di nuovi adipociti dai precursori stromali caratterizza l'iperplasia e l'obesità severa. Un passaggio importante nell'adipogenesi è indirizzare le cellule mesenchimali disponibili verso la via adipogenetica e in questo contesto RBP4 gioca un ruolo importante. È stata recentemente identificata una molecola appartenente al pathway di Wnt, chiamata Wnt-1 inducible signalling pathway protein 2 (WISP2) e secreta dai precursori mesenchimali, che aumenta la loro proliferazione; essa regola l'induzione da parte di BMP4 di PPAR $\gamma$ , il quale è il regolatore più importante dell'adipogenesi [19]. I pre-adipociti si differenziano sotto lo stimolo di IGF-1, lipidi, glucocorticoidi e altre molecole. Attraverso una cascata di segnalazione intracellulare viene regolata l'espressione di geni specifici adipocitari che portano al processo di differenziamento cellulare. Questa cascata di eventi porta all'acquisizione della capacità di accumulo di lipidi, di risposta all'insulina, dell'induzione della lipolisi e della secrezione di adipochine come la leptina, con alterazione della secrezione di altri fattori come il PAI-1, di componenti della matrice extracellulare, di microRNA, istoni e strutture cromatiniche [1], [29].

Molti regolatori trascrizionali sono stati coinvolti nel processo di induzione o di inibizione dell'adipogenesi. I primi eventi includono l'attivazione dei fattori trascrizionali della famiglia di AP-1 (activator protein-1) e portano poi all'attivazione di PPARc che è un fattore proadipogenico critico. Altri fattori di trascrizione coinvolti nella facilitazione della maturazione dell'adipocita appartengono alla famiglia di signal transducer and activator of transcription (STAT), KLF, sterol regulatory binding protein-1 (SREBP-1) e CCAAT/enhancer binding protein (C/EBP) [30].

#### **1.1.4. Tessuto adiposo, insulinoresistenza e diabete**

Come è stato precedentemente affermato, l'accumulo di tessuto adiposo a livello gluteo-femorale, tipico del soggetto femminile, si caratterizza per livelli normali di sensibilità insulinica e per la riduzione del rischio di diabete e di patologie cardiovascolari, diversamente da quanto accade nell'accumulo di grasso a livello viscerale in cui il rischio di presentare una di queste condizioni è aumentato. Recentemente l'Insulin Resistance Atherosclerosis Study ha dimostrato che la circonferenza vita è un forte indicatore di una ridotta attività insulinica periferica negli individui magri non diabetici. Wang et al. hanno anche confermato che la circonferenza vita è maggiormente predittivo per diabete mellito di tipo 2 rispetto al waist-hip ratio (WHR) o al BMI [31]. In un grosso studio internazionale su più di 168000 soggetti, Balkau et al. hanno dimostrato che, all'interno di ogni categoria di BMI (normopeso, sovrappeso e obesità), c'era un aumento della prevalenza del diabete in accordo ai quintili di circonferenza vita [1], [32]. Inoltre Boyko et al. hanno condotto uno studio prospettico su soggetti giapponesi americani, il quale ha dimostrato che, in un periodo di osservazione di 6-10 anni, un eccesso di adiposità viscerale misurata con la TC era predittiva dello sviluppo di diabete di tipo 2 indipendentemente da attività e secrezione insulinica, glicemia, adiposità totale e regionale e familiarità per diabete [24], [33].

L'insulina riduce il livello di glucosio nel sangue poiché ne promuove la captazione nei tessuti insulinosensibili come il muscolo scheletrico, il tessuto adiposo e il cuore e riduce la produzione di glucosio da parte di fegato, piccolo intestino e rene.

L'insulinoresistenza si verifica quando i tessuti insulinosensibili perdono la capacità di rispondere adeguatamente a questo ormone [34]. Il primo modello sperimentale che ha cercato di spiegare il legame tra obesità viscerale e alterazioni metaboliche è stato quello degli acidi grassi portali, secondo il quale il tessuto adiposo viscerale induce insulinoresistenza a seguito del rilascio di acidi grassi liberi a livello epatico. Ciò però non spiega come mai, nei soggetti con obesità viscerale, l'80% circa degli acidi grassi nel circolo portale derivano dal circolo sistemico e principalmente dal tessuto adiposo sottocutaneo [1]. Diversi fattori sembrano spiegare l'insorgenza di insulinoresistenza, quali l'infiammazione, la disfunzione mitocondriale, l'iperinsulinemia, l'iperlipidemia, lo stress del reticolo endoplasmatico, lo stress ossidativo e l'ipossia, il background genetico, l'obesità e l'invecchiamento [34].

#### **1.1.4.1. Infiammazione**

Nell'obesità è presente un basso grado di infiammazione cronica, coinvolta nello sviluppo di diabete di tipo 2, aterosclerosi, steatosi epatica, cancro, ipertensione, asma e apnee ostruttive. L'infiammazione è un processo fisiologico caratterizzato da alti livelli plasmatici di globuli bianchi e di citochine pro infiammatorie ed è in genere necessaria per il rimodellamento degli organi, la rigenerazione tissutale, la riparazione delle ferite e la risposta contro le infezioni. Tuttavia una risposta infiammatoria esagerata può essere dannosa[34]. È stato proposto un legame tra lo stato infiammatorio cronico che caratterizza l'obesità e lo sviluppo di insulinoresistenza. Il primo link tra le due condizioni è l'aumentata espressione della citochina pro infiammatoria  $TNF\alpha$ , come è stato dapprima suggerito da Hotamisligil et al., i quali dimostrarono che gli adipociti dei topi obesi producevano direttamente  $TNF-\alpha$  [35]. Parallelamente, studi sull'uomo mostrarono come dopo la perdita di peso da parte di individui obesi, i livelli di  $TNF\alpha$  erano notevolmente ridotti. Le prove che supportano un ruolo centrale del TNF nello sviluppo dell'insulinoresistenza correlata all'obesità derivano da studi che mostrano come topi ob/ob (con deficit di leptina e insulinoresistenti) e che erano anche deficitari per  $TNF\alpha$  e per il suo recettore avevano una maggior sensibilità all'insulina rispetto

a quelli che non erano deficitari per il TNF [17]. Una stretta relazione tra risposta infiammatoria e insulinoresistenza è stata proposta sulla base della soppressione della captazione del glucosio in pazienti settici ed è noto come i farmaci antiinfiammatori siano in grado di migliorare la sensibilità all'insulina in soggetti diabetici [1], [36]. Altre citochine infiammatorie sono iperesprese nel tessuto adiposo di soggetti obesi: IL-1, IL-6, MCP-1, PAI-1. Esse sono in grado di stimolare la lipolisi negli adipociti e determinare lipotossicità in altri tessuti. Inoltre molecole di segnale infiammatorie come l'inibitore del fattore nucleare NF- $\kappa$ B (IKK $\beta$ ) e JNK1 sono state trovate attivate nel tessuto adiposo e nel fegato di soggetti obesi. Questi pathways di segnalazione intracellulare sono attivati nell'obesità da TNF $\alpha$ , acidi grassi liberi, diacilglicerolo, radicali liberi dell'ossigeno (ROS) e ipossia. L'infiammazione inibisce l'attività del signalling dell'insulina nelle cellule adipose in diversi modi; il primo è l'inibizione di IRS-1 (insulin receptor substrate 1). IRS-1 riceve il segnale dal recettore dell'insulina. Il secondo è l'inibizione di PPAR $\gamma$  che è un recettore nucleare che regola la sintesi lipidica e l'accumulo di grasso nelle cellule. Il terzo è l'aumento degli acidi grassi liberi nel plasma attraverso la stimolazione della lipolisi e il blocco della sintesi di trigliceridi [34], [37].

L'infiltrazione macrofagica è aumentata nel tessuto adiposo nell'obesità. I macrofagi del tessuto adiposo (ATM) sono cellule molto più attive degli adipociti nella produzione di TNF $\alpha$  e di altre citochine pro infiammatorie. Essi si dividono in due tipi, i macrofagi M1 e i macrofagi M2 [38]. Un aumento degli M1 e una riduzione degli M2 si osserva nei topi obesi, infatti in generale M1 promuovono l'infiammazione mentre M2 la inibiscono. Gli M1 esprimono alti livelli di IL-12, MHC II e ossido nitrico sintetasi (NOS) mentre gli M2 hanno un fenotipo antinfiammatorio e antiangiogenico e sono attivati dalle citochine secrete dai linfociti Th2 come IL-4 o IL-13, con produzione di IL-10 e arginasi [39]. È stato proposto che tra i macrofagi e il tessuto adiposo che hanno infiltrato ci sia una sorta di dialogo: il TNF- $\alpha$  prodotto dai macrofagi agisce sui recettori degli adipociti ipertrofici inducendo la produzione di citochine proinfiammatorie e la lipolisi; viceversa, gli acidi grassi rilasciati fungono da ligando per i TLR4 dei macrofagi, e portano alla loro attivazione tramite la via di NF- $\kappa$ B [40]. In alcuni modelli murini

sottoposti a dieta ad altro contenuto lipidico per un periodo di circa una settimana è stata indotta una risposta infiammatoria nel tessuto adiposo ma non in altri tessuti insulinosensibili; in seguito ad una più lunga esposizione, invece, anche fegato e muscolo scheletrico sono stati coinvolti dalla risposta proinfiammatoria [1]. Tuttavia dopo un calo ponderale ottenuto a seguito di un periodo di restrizione calorica la risposta infiammatoria si riequilibra e l'insulinosensibilità viene ripristinata tramite una riduzione dei macrofagi M1 e l'induzione degli M2. La prima fase dell'obesità, con l'iniziale accumulo dei macrofagi, è fondamentale per l'espansione del tessuto adiposo e per il suo rimodellamento ma se i macrofagi acquisiscono un profilo proinfiammatorio si giunge ad un'alterazione dell'omeostasi della matrice extra-cellulare con conseguente fibrosi [1], [41]. Gli adipociti che sono incapsulati in uno stretto guscio di matrice extracellulare perdono le loro funzioni e vanno incontro a necrosi con maggior frequenza. Dopo la morte cellulare, le rimanenti gocce lipidiche stimolano l'infiltrazione di macrofagi, neutrofili, linfociti e mastociti, dando origine ad un microambiente proinfiammatorio con predominanza di macrofagi M1 che formano strutture a forma di corona che circondano gli adipociti necrotici. Resta ancora da spiegare se i macrofagi infiltrino il tessuto adiposo in risposta alla morte cellulare o se contribuiscano direttamente a essa. [42]. La relazione tra la fibrosi adipocitaria e l'insulinoresistenza è stata documentata in studi condotti sull'uomo in cui l'espressione di collagene IV è strettamente correlata ad un'alterazione del metabolismo glicidico. La scoperta che una rapida induzione dell'insulinoresistenza ottenuta tramite un'alimentazione forzata porta ad un'induzione dei geni della matrice extracellulare suggerisce che il rimodellamento del collagene nel tessuto adiposo umano e l'insulinoresistenza siano tra di loro correlati [25]. Quindi l'iperpressione di componenti della matrice extracellulare che si osserva nel tessuto adiposo di soggetti obesi e di topi resi obesi in condizioni sperimentali si associa alle disfunzioni metaboliche che portano a insulinoresistenza e danno epatico. In più la fibrosi inibisce l'adipogenesi e la differenziazione dei pre-adipociti umani ma ostacola anche il meccanismo dell'ipertrofia; dunque la fibrosi limita la crescita del tessuto adiposo e i grassi in eccesso si accumulano in sedi ectopiche [43]. È stato dimostrato che il livello generale dei componenti della



matrice extracellulare è aumentato in condizioni di obesità. In particolare il collagene di tipo IV è la molecola maggiormente espressa nella matrice extracellulare del tessuto adiposo e una sua deplezione in modelli murini porta ad un notevole miglioramento del profilo metabolico [44].

#### **1.1.4.2. Iperinsulinemia**

L'iperinsulinemia è una condizione in cui i livelli plasmatici di insulina sono elevati in condizioni di digiuno. Anche se è generalmente accettato che elevati livelli di insulina siano una conseguenza della resistenza a questo ormone, alcuni studi hanno dimostrato che, viceversa, elevati livelli di insulina possono condurre a una condizione di insulinoresistenza, soprattutto in presenza di acidi grassi liberi [34] [45]. Nelle  $\beta$  cellule il metabolismo ossidativo del glucosio porta a produzione di ROS che normalmente sono neutralizzati dalla catalasi e dalla superossido-dismutasi. Tuttavia il pancreas è dotato di una scarsa quantità di queste proteine e un aumento di ROS secondario all'iperglicemia può danneggiare il pancreas [46].

#### **1.1.4.3. Ipossia, stress ossidativo e disfunzione mitocondriale**

Il tessuto adiposo è generalmente considerato un tessuto scarsamente vascolarizzato ed è stato dimostrato che per la sua espansione è necessaria l'angiogenesi [47]. Molti studi hanno dimostrato che un tessuto adiposo ipertrofico può andare incontro a una riduzione della densità capillare e del flusso sanguigno poiché il sistema vascolare non sembra essere in grado di espandersi parallelamente all'ipertrofia adipocitaria. Da ciò derivano ipossia, disfunzione mitocondriale e stress ossidativo; questi meccanismi a loro volta sono in grado di portare alla produzione di citochine proinfiammatorie, all'infiltrazione di macrofagi e alla produzione di ROS [1]. Inoltre l'ipossia è legata anche alla fibrosi e all'espansione della ECM in quanto l'attivazione di HIF-1 (hypoxia inducible factor 1) inibisce la differenziazione dei pre-adipociti e dà avvio alla fibrosi [43]. L'ipossia è dunque correlata ad un aumento dell'infiammazione (soprattutto per aumentata produzione di IL-6 e leptina), alla fibrosi adipocitaria e porta ad un cambiamento nel metabolismo glicidico, in quanto una ridotta tensione di ossigeno provoca un'up-regolazione del

trasportatore del glucosio GLUT-1 e una ridotta espressione di GLUT-4 [8], [48]. I ROS sono generalmente prodotti nei mitocondri durante l'ossidazione degli acidi grassi e del glucosio per la produzione di ATP o di calore. Nell'obesità lo stress ossidativo è dovuto a una fornitura eccessiva di acidi grassi e glucosio ai mitocondri e i ROS prodotti in eccesso portano all'insorgenza di insulinoresistenza mediante l'attivazione di Protein Kinasi C (PKC), JNK1 e NF-Kb. La sindrome delle apnee ostruttive, caratterizzata dal collasso delle vie respiratorie durante il sonno, che porta a una condizione di ipossia cronica, è associata con la condizione di insulinoresistenza nei soggetti obesi e ha una prevalenza nell'obesità che va dal 40 al 60% [34].

La disfunzione mitocondriale è la riduzione del numero, della densità e della funzione dei mitocondri che sono il primo organo subcellulare dove avviene l'ossidazione e il metabolismo degli acidi grassi e del glucosio. Dunque una loro riduzione sembra essere coinvolta nel meccanismo dell'insulinoresistenza, anche se da alcune evidenze questo fenomeno sembra più una conseguenza che una causa dell'insulinoresistenza poiché, ad esempio, l'insulina stimola la biogenesi dei mitocondri e il numero e la funzione di questi organelli non migliorano dopo la perdita di peso [34].

#### **1.1.4.4. Altri meccanismi**

Altri meccanismi che possono spiegare l'insorgenza di insulinoresistenza nell'obesità sono la lipotossicità, l'invecchiamento e lo stress del reticolo endoplasmatico.

Recentemente è stato avanzato il concetto della lipotossicità, che coinvolge le cellule  $\beta$  pancreatiche. Generalmente nei pazienti obesi, sia diabetici che non, gli acidi grassi liberi in circolo sono aumentati a causa dell'aumentata lipolisi. Essi si sono mostrati in grado di aumentare la secrezione di insulina in acuto, mentre dopo 24 ore la inibiscono [46]. La quantità di acidi grassi nel plasma in condizioni fisiologiche è aumentata in condizioni di digiuno e ridotta dopo un pasto ed è strettamente controllata dall'insulina. In presenza di livelli persistentemente elevati di acidi grassi si giunge invece a una condizione di insulinoresistenza. Due

metaboliti intermedi degli acidi grassi liberi (la ceramide e il diacilglicerolo) sono responsabili della resistenza insulinica, mentre la riduzione dei loro livelli tramite esercizio fisico sembra ridurre l'insulinoresistenza [34].

Lo stress del reticolo endoplasmatico (organello intracellulare che sintetizza e processa le proteine secretorie e di membrana) è causato dall'accumulo di proteine non piegate o piegate in modo scorretto. Esso è indotto da carenza di glucosio o altri nutrienti, infezioni virali, lipidi e ipossia [34]. Nell'obesità lo stress del reticolo endoplasmatico porta alla soppressione del signalling del recettore insulinico in epatociti di topo attraverso l'attivazione di JNK e la fosforilazione di IRS-1 che è uno dei mediatori principali del segnale insulinico [17], [49].

Infine l'età comporta un aumento del quantitativo di tessuto adiposo, una riduzione dell'attività fisica e uno sbilanciamento degli ormoni sessuali con comparsa di obesità viscerale. La riduzione del grasso viscerale nell'anziano si è dimostrata in grado di ridurre il livello di insulinoresistenza [50].

## 1.2. Diabete mellito di tipo 1 e di tipo 2

### 1.2.1. Classificazione e Diagnosi

Con il termine diabete mellito (DM) viene definito il quadro clinico secondario a qualunque condizione di iperglicemia cronica, indipendentemente dal meccanismo patogenetico, rappresentato da un difetto di secrezione o di azione insulinica o da entrambi i difetti [51]. La patologia è nota fin dall'epoca egizia e il termine fu coniato dal greco Areteo di Cappadocia. Infatti la parola diabete deriva dal greco “διαβαίνειν” e significa “attraversare” o “fluire” e sta a indicare la poliuria e la polidipsia che sono i sintomi caratteristici della patologia. Il termine “mellito” venne aggiunto nel 1674 da Thomas Willis che notò la dolcezza delle urine dei pazienti diabetici. Soltanto nel XIX secolo si giunse alla conclusione che l'organo critico nello sviluppo della patologia era il pancreas e vennero identificate in questo periodo le isole di Langerhans [52].

Il diabete può essere classificato in diverse categorie, le più importanti sono le seguenti [53]:

- DIABETE MELLITO DI TIPO 1: è dovuto alla distruzione delle  $\beta$  cellule con deficit assoluto di insulina e può essere immuno-mediato o idiopatico.
- DIABETE MELLITO DI TIPO 2: forma di diabete tipica dell'età matura che si caratterizza per un variabile grado di insulinoresistenza e deficit insulinico relativo piuttosto che assoluto.
- DIABETE MELLITO GESTAZIONALE, diagnosticato al secondo o terzo mese di gravidanza
- ALTRE FORME DI DIABETE.

Il **diabete mellito di tipo 1** è una patologia caratterizzata dalla distruzione delle  $\beta$  cellule pancreatiche e da una carenza assoluta di insulina. Sebbene sia stata considerata per molto tempo una malattia perlopiù infantile e adolescenziale, l'esordio può avvenire a qualunque età [54]. La maggior parte dei casi di diabete di tipo 1 rappresenta una patologia immuno-mediata e di conseguenza i pazienti spesso mostrano i segni di un contributo del sistema immunitario alla patogenesi della malattia (ad esempio autoanticorpi o associazione genetica con geni che

controllano la risposta immunitaria). Tuttavia non tutti i pazienti mostrano le stesse caratteristiche ed esistono infatti due tipi principali di DMT1: il tipo 1A (autoimmune), che raggruppa quel 70-90% di pazienti con diabete di tipo 1 che presentano autoanticorpi, e il tipo 1B (idiopatico), a cui afferisce la parte rimanente [54]. La forma *immuno-mediata* riconosce una predisposizione genetica sostenuta da una concordanza tra gemelli identici del 50% e da un'evidente aggregazione familiare [51]. Tale componente genetica è spiegata almeno in parte da una forte associazione con il sistema HLA, in particolare con gli alleli DR e DQ [55]. La predisposizione a sviluppare processi autoimmuni è anche evidenziata da una maggior prevalenza di malattie come il Morbo di Graves-Basedow, la tiroidite autoimmune, la malattia di Addison, la vitiligine, l'anemia perniciosa e la celiachia tra i pazienti con DMT1 [51]. La forma *idiopatica* rappresenta una quota minoritaria di casi di diabete mellito di tipo 1 in cui non c'è evidenza di autoimmunità e il quadro si caratterizza per una più variabile insulinodipendenza. Vi è una maggior evidenza di ereditarietà e la patologia è relativamente frequente in Asia e in Africa e non mostra associazione con il sistema HLA [56].

**Il diabete mellito di tipo 2** rappresenta il 90-95% delle forme di diabete e veniva un tempo definito come diabete non insulinodipendente (NIDDM) o diabete della maturità, ha un picco di incidenza attorno ai 50-60 anni e raggruppa individui che mostrano un variabile grado di insulinoresistenza [56]. In questi soggetti non è presente un deficit insulinico assoluto, ma la risposta all'insulina non è sufficiente a compensare la resistenza periferica all'ormone quindi è giustificata la definizione di insulinodeficienza relativa [51]. Contrariamente al diabete mellito di tipo 1, non c'è evidenza di autoimmunità mentre l'eziopatogenesi è sempre multifattoriale, con una maggior predisposizione genetica rispetto al diabete di tipo 1 (concordanza tra gemelli identici prossima al 100%), anche se non sono ancora stati identificati i markers genetici che identifichino i soggetti predisposti e non sembra esserci associazione con il sistema HLA [51]. La maggior parte di questi soggetti sono obesi e l'obesità stessa può essere causa di insulinoresistenza. Altri fattori ambientali sono la sedentarietà e l'età [56]. Generalmente i pazienti con DMT2 rappresentano una popolazione più eterogenea rispetto a quelli con DMT1. In particolare esiste una minoranza di soggetti con le caratteristiche cliniche del

diabete mellito di tipo 2 che, tuttavia, presentano peso corporeo nei limiti della norma, minore grado di insulinoresistenza e livelli più bassi di iperinsulinemia. Questa condizione clinica è conosciuta come LADA, “latent autoimmune diabetes of the adult” o NIRAD, cioè “non insulin requiring autoimmune diabetes” e si tratta verosimilmente di una forma di diabete autoimmune a lenta insorgenza [51].

**Il diabete mellito gestazionale** è definito come una qualsiasi grado di intolleranza al glucosio con insorgenza durante la gravidanza o riconosciuto per la prima volta in questa circostanza. Sebbene molti casi si risolvano dopo il parto, la definizione viene applicata anche quando la condizione continua a persistere e non esclude che la condizione di intolleranza al glucosio possa esser stata presente già prima della gravidanza [53].

**Altre forme specifiche di diabete mellito** hanno una frequenza di gran lunga inferiore a quella del diabete mellito di tipo 1 e 2 e i dati epidemiologici sono scarsi. Esistono forme *secondarie a difetti genetici della  $\beta$  cellula*, che sono caratterizzate da una sintomatologia simile a quella del diabete di tipo 2 ma con insorgenza giovanile (tipicamente prima dei 25 anni). Queste forme sono conosciute come MODY (maturity onset diabetes of the young) e ne vengono riconosciuti sei diversi tipi: le mutazioni più frequenti sono a carico di geni che codificano per la glucochinasi o per HNF-1 $\alpha$  (hepatocyte nuclear factor-1  $\alpha$ ). Il MODY è caratterizzato da una ridotta secrezione insulinica non accompagnata da una evidente insulinoresistenza e i criteri per diagnosticarlo sono: la comparsa dell’iperglicemia prima dei 25 anni, controllo metabolico mantenuto senza insulina per almeno due anni, mancata evidenza di autoimmunità ed evidenza di una trasmissione di tipo autosomico dominante. Altri tipi di diabete possono essere dovuti a mutazioni puntiformi del DNA mitocondriale e in questi casi l’iperglicemia si associa a sordità. Esistono poi forme di diabete legate a *difetti genetici dell’azione insulinica* come la mutazione del recettore insulinico che portano a insulinoresistenza di tipo A, in cui vi è un’iperinsulinemia compensatoria e tipiche manifestazioni a carico della cute e delle gonadi come acanthosis nigricans, ovaio policistico e virilizzazione [51]. Il *diabete secondario a malattie del pancreas esocrino* è dovuto a qualsiasi processo che danneggi diffusamente il pancreas con riduzione della massa delle  $\beta$  cellule funzionanti. Questi eventi patologici possono

essere rappresentati da pancreatiti acute, emocromatosi (diabete bronzino), carcinoma pancreatico, infezioni, traumi e pancreatopatie da eccessivo consumo di farina di tapioca e/o da ridotto apporto proteico [56]. Ciò che differenzia il diabete pancreatico dal diabete mellito di tipo 1 è che nel primo c'è una condizione di carenza di insulina e di glucagone mentre nel secondo c'è assenza di insulina ma relativa iperglucagonemia. Nel diabete pancreatico il deficit di glucagone porta ad una minor produzione epatica di glucosio con minor iperchetonemia; è inoltre presente una maggior sensibilità periferica all'insulina [51]. Il diabete *secondario a endocrinopatie* si verifica in presenza di numerosi disordini endocrini come la Sindrome di Cushing, l'acromegalia, l'eccesso di cortisolo o di GH, il glucagonoma, il feocromocitoma, l'iperaldosteronismo, l'ipoparatiroidismo, il deficit isolato di GH, i tumori insulari secernenti somatostatina, la sindrome da carcinoide e la tireotossicosi. Questo generalmente si verifica in individui con preesistenti difetti della secrezione insulinica e l'iperglicemia si risolve quando si riduce l'eccessiva secrezione dell'ormone [56]. Il diabete può anche essere *secondario all'assunzione di farmaci* considerati diabetogeni. I farmaci coinvolti agiscono in diversi modi: i bloccanti  $\beta$ -adrenergici inibiscono la secrezione di insulina e riducono la sensibilità all'ormone, i diuretici tiazidici riducono la secrezione di insulina per deplezione di potassio, gli stimolanti  $\beta$ -adrenergici e i glucocorticoidi aumentano il rilascio di glucosio da parte del fegato, mentre glucocorticoidi, estrogeni e progestinici sintetici inibiscono l'attività insulinica a livello post-recettoriale [51]. Alcune *infezioni virali* possono determinare la comparsa di diabete mellito di tipo 1, anche se la maggior parte dei casi ha alla base una predisposizione genetica. I virus maggiormente coinvolti sono Coxackie, Citomegalovirus, Adenovirus [56]. Infine esistono forme di *diabete associate a malattie genetiche* come la Sindrome di Down, di Turner e di Klinefelter [56].

Il quadro clinico del diabete mellito di tipo 1 si caratterizza per la comparsa di alcuni segni sintomi caratteristici come poliuria, polidipsia, calo ponderale, astenia, marcata iperglicemia, glicosuria e chetosi. In rari casi all'esordio possono essere presenti disidratazione, acidosi e stato comatoso. Il diabete mellito di tipo 2, invece, è una patologia a lenta insorgenza preceduta da una lunga fase preclinica. Talvolta all'esordio le manifestazioni cliniche possono essere balanopostiti, prurito vulvare,

vaginite cronica da candida, mentre solo nel 30% dei casi sono presenti poliuria e polidipsia [51]. Raramente nel corso della patologia si verificano episodi di chetoacidosi se non in presenza di patologie concomitanti come infezioni. L'iperglicemia può essere diagnosticata a distanza di tempo dall'insorgenza, con un maggior rischio di complicanze macro e micro-vascolari [56].

La diagnosi di diabete mellito in assenza dei segni e sintomi tipici della patologia è definita dalla presenza di almeno uno dei seguenti parametri in almeno due occasioni:

- Glicemia a digiuno  $\geq 126$  mg/dl, dopo almeno 8 ore di digiuno;
- Glicemia  $\geq 200$  mg/dl due ore dopo carico orale di 75 g di glucosio (OGTT);
- Emoglobina glicata HbA1c  $\geq 6,5\%$ .

In presenza di segni e sintomi compatibili con il quadro di diabete quali poliuria, polidipsia e calo ponderale, per la diagnosi è sufficiente un valore random di glicemia  $\geq 200$  mg/dl [51].

In corso di gravidanza i criteri diagnostici sono differenti. Il DMG deve essere diagnosticato mediante un OGTT eseguito sulla donna in gravidanza, precisamente a 24-28 settimane di gestazione, che risulterà positivo per valori  $\geq 92$  mg/dl di glicemia a digiuno,  $\geq 180$  mg/dl a un'ora o  $\geq 153$  mg/dl a due ore dalla somministrazione del carico orale di glucosio. Nel caso venga diagnosticato il DMG, la donna dovrebbe essere ricontrollata a 6-12 settimane dal parto usando uno qualunque dei test nominati (tranne il dosaggio dell'HbA1c) e, se negativo, essere rivalutata ogni 3 anni [57].

### **1.2.2. Epidemiologia ed eziopatogenesi**

La prevalenza del diabete di tipo 1 in Italia è stimata tra lo 0,5 e l'1% mentre l'incidenza è di 10-11:100000. Fa eccezione la Sardegna che, con un'incidenza di 34:100000 nella fascia da 0 a 14 anni, è al secondo posto per livello di incidenza al mondo dopo la Finlandia [54], [58]. I dati derivati dai grandi registri di patologia, come Il World Health Organization Multinational Project for Childhood Diabetes (DIAMOND Project), il SEARCH for Diabetes in Youth (SEARCH), e



l'Epidemiology and Prevention of Diabetes (EURODIAB), hanno mostrato una variazione dell'incidenza, prevalenza, e andamento temporale del DMT1. Con poche eccezioni, i registri di DMT1 delle varie popolazioni hanno mostrato un aumento dell'incidenza della patologia nel tempo [59]. L'IGT colpisce più di 200 milioni di persone al mondo, con un 40% di soggetti che passa da questa situazione a una condizione di franco diabete mellito [60]. Globalmente, 1 persona su 11 è affetta da diabete a livello mondiale ma il 90% di questi soggetti presentano diabete mellito di tipo 2 e l'epicentro di questa epidemia è l'Asia [23]. La prevalenza del diabete mellito di tipo 2 nelle ultime due decadi è più che raddoppiata e nel mondo supera il 7% ed è in continua crescita; in Italia la prevalenza è intorno al 3-4%. È prevista una progressione della prevalenza verso il 9-10% nel corso dei prossimi 10-15 anni a causa dell'aumento di obesità e sedentarietà [51].

Il diabete mellito di tipo 1 è una patologia immuno-mediata multifattoriale. Una volta che la popolazione  $\beta$  cellulare è stata aggredita e funzionalmente soppressa dalla progressiva infiammazione, la carenza di insulina impedisce ai vari tessuti la captazione del glucosio necessario per le attività quotidiane [61]. La carenza dell'effetto dell'insulina e la prevalenza degli ormoni contro-insulari, soprattutto il glucagone, determinano una riduzione dell'utilizzazione periferica del glucosio e un aumento della gluconeogenesi epatica che portano ad un aumento della concentrazione ematica di glucosio. Quando la quantità di glucosio filtrata dai glomeruli renali supera la soglia massima di riassorbimento tubulare, si manifesta la glicosuria. Il glucosio ha un effetto osmotico, dunque porta con sé acqua ed elettroliti, con conseguente disidratazione, iperosmolarità, che attiva i centri della sete ipotalamici, e polidipsia. Parallelamente il deficit di insulina è responsabile del catabolismo proteico, per aumentata liberazione di amminoacidi dal muscolo (a fini gluconeogenici), e lipidico, con aumento degli acidi grassi liberi per lipolisi. Questi substrati vengono utilizzati per produrre corpi chetonici, acetoacetato e  $\beta$ idrossibutirrato che, unitamente alla riduzione del filtrato glomerulare, contribuiscono al quadro di acidosi metabolica [51].

La causa del diabete mellito di tipo 1 è ancora sconosciuta ma il fatto che ci sia una concordanza tra gemelli omozigoti che arriva solo al 50% indica che oltre alla predisposizione genetica gioca un ruolo importante anche l'ambiente [61]. Per

quanto riguarda la prima componente, più di 40 loci sono stati riconosciuti come responsabili della suscettibilità alla patologia e di questi, il locus dell'HLA sul cromosoma 6 è responsabile di circa la metà dei casi [54]. Tra gli alleli HLA di classe II quelli maggiormente associati con un aumento della predisposizione sono quelli delle classi DQ e DR (soprattutto DR3 e DR4) e lo stato di eterozigosi DR3/DR4 porta il rischio più alto di sviluppare diabete mentre gli altri alleli conferiscono uno stato di protezione [62]. Infatti da uno studio su più di 1000 pazienti si è notato che il 40% dei soggetti con DMT1 presentava eterozigosi DR3/DR4 contro un 3% della popolazione generale [59]. Gli altri loci che mostrano un'associazione statisticamente significativa sono quelli per l'insulina, in cui la suscettibilità sembra essere dovuta a un VNTR (variable number of tandem repeat) nel promotore del gene, per PTPN22, per CTLA4 e per IL2RA [54]. Per quanto riguarda invece i fattori ambientali, si pensa che questi giochino un ruolo importante nello sviluppo della patologia. Tra questi possiamo citare la dieta, l'esposizione alle proteine del latte vaccino, deficit di vitamina D, infezioni virali (Coxsackie A e B, Rosolia, CMV, EBV, Echovirus, Parotite, Retrovirus), farmaci, tossine e stress [59]. Anche il microbiota intestinale e la sua composizione sembra avere un ruolo come fattore di rischio per lo sviluppo di diabete mellito di tipo 1 dal momento che i microbi che risiedono nell'intestino influenzano il metabolismo di lipidi e glucosio, così come l'immunità e l'infiammazione sistemica al di fuori dell'apparato gastroenterico [63]. L'ipotesi che un'aumentata igiene nei primi anni di vita, con conseguente minor esposizione a infezioni virali, possa influenzare negativamente lo sviluppo di autoimmunità è tuttavia ancora dibattuta e ci sono evidenze contrastanti in letteratura [63].

Sia l'immunità umorale che cellulare sono coinvolte nel danno insulare in corso di DMT1 [62]. L'immunità cellulare si attiva per prima ed è la principale responsabile dell'insulite mentre l'immunità umorale sembra essere attivata secondariamente, con la produzione di autoanticorpi diretti contro le isole pancreatiche. Lo specifico ruolo dei linfociti B è ancora oggetto di dibattito, ma, mentre gli autoanticorpi derivati dalle cellule B possono rappresentare un preludio dell'autoimmunità, i linfociti B partecipano attivamente alla risposta immunitaria grazie alla loro capacità di presentare l'antigene ai linfociti T CD4+ e CD8+ [64]. Sono stati

individuati diversi anticorpi che sembrano svolgere un ruolo nello sviluppo o nell'evoluzione della patologia.

- *Islet Cell Antibodies* (ICA): diretti contro le cellule pancreatiche, sono stati i primi autoanticorpi ad essere identificati. Sono presenti in circa il 60% nei casi di pre-diabete o nei diabetici di tipo 1 di nuova diagnosi [65].
- *Glutamic Acid Decarboxylase Autoantibodies* (GADA): similmente agli ICA, i GADA sono presenti nel 70-80% dei diabetici di nuova diagnosi ma, a differenza dei primi, questi restano positivi per anni durante la progressione della patologia. La presenza di GADA in pazienti con DMT2 è predittivo di una più rapida progressione verso l'utilizzo di insulina e sta a indicare che in essi è presente una componente di DMT1 [59].
- *insulinoma associated 2 autoantibodies* (IA-2A): IA-2 è una proteina di membrana appartenente alla famiglia delle tirosin-fosfatasi che si trova nel pancreas e nell'ipofisi. All'esordio la positività per questo anticorpo è minore rispetto a quella per ICA e GADA (60 % circa dei casi) [59], [66].
- *insulin autoantibodies* (IAA): l'unico autoantigene specifico delle  $\beta$  cellule è l'insulina. IAA è riscontrato in circa il 40-50% dei bambini con nuova diagnosi di DMT1. In un individuo non diabetico, la positività per IAA non predice in maniera importante un futuro sviluppo della malattia; la predittività aumenta se è contemporaneamente positivo anche ICA[59]. Una positività di IAA in giovane età correla con lo sviluppo di una patologia più aggressiva[65].
- *zinc transporter autoantibodies* (ZnT8A): ZnT8 è un membro della famiglia dei facilitatori del trasporto di cationi che nel pancreas ha la funzione di mantenere un'adeguata concentrazione dello zinco che è essenziale per la secrezione di insulina. Gli anticorpi contro questa proteina sono stati recentemente identificati e sono presenti nel 60-80% dei pazienti con nuova diagnosi di DMT1 contro solo il 30% dei pazienti con disturbi autoimmuni associati alla patologia. Inoltre essi sono riscontrati in solo 2% della popolazione generale e nel 3% dei pazienti con DMT2. Pazienti con DMT1 seguiti dalla nascita mostrano la presenza di ZnT1 già a 2 anni di età e la positività per gli anticorpi aumenta con l'esordio della malattia [59].

Le evidenze a supporto del ruolo di primaria importanza dell'immunità cellulare nello sviluppo di questa patologia sono innanzitutto di tipo istologico, come la presenza di "insulite" e quindi di infiltrato infiammatorio a livello pancreatico, dimostrato dall'esame istologico del pancreas di pazienti con DMT1 morti poco dopo la nascita. La maggior parte dei pazienti aveva una significativa infiltrazione linfocitaria nelle isole, parallelamente alla perdita di cellule  $\beta$  [65]. Dall'analisi del tessuto pancreatico di soggetti con diabete di tipo 1 di nuova diagnosi risulta evidente la presenza di un infiltrato ricco di linfociti T CD4+ e CD8+, linfociti B e macrofagi [67].

È stato dimostrato che il trattamento con farmaci immunosoppressivi ritarda la progressione della malattia [68], mentre da alcuni studi su topi è emerso che il trattamento con anticorpi anti-CD3 previene lo sviluppo di diabete [69]. La distruzione delle cellule  $\beta$  a seguito di trapianto di pancreas tra gemelli HLA-identici con diabete di tipo 1, il trasferimento di DMT1 in seguito a trapianto di midollo osseo allogenico non deprivato di cellule T in gemelli HLA-identici dei quali il donatore era diabetico e lo sviluppo di diabete in pazienti con deficit di cellule B depongono a favore di un ruolo dell'immunità cellulare nella patogenesi della malattia [70], [71]. Altre evidenze derivano dalla presenza di cellule T auto-reattive circolanti [68]. In generale il diabete di tipo 1 è considerato quindi una patologia primariamente mediata dai linfociti T [67].

Nel diabete mellito di tipo 2 il circuito tra l'azione e la secrezione di insulina non funziona correttamente, l'azione dell'insulina nei tessuti insulinosensibili come il muscolo, il fegato e il tessuto adiposo (insulinoresistenza) e la sua secrezione da parte delle  $\beta$  cellule pancreatiche (insulinodeficienza) sono compromesse e da ciò deriva un'anormalità nei livelli plasmatici di glucosio [23]. L'insulinoresistenza contribuisce all'aumentata produzione di glucosio da parte del fegato e alla ridotta captazione di glucosio nel muscolo e nel tessuto adiposo a determinati livelli di insulina. In aggiunta, la disfunzione  $\beta$  cellulare si manifesta con una ridotta secrezione di insulina, che risulta insufficiente per mantenere il glucosio plasmatico a livelli normali [23]. I meccanismi cellulari coinvolti nell'insulinoresistenza sono rappresentati da difetti recettoriali (riduzione del legame dell'insulina al suo recettore) e post-recettoriali (riduzione della fosforilazione del recettore

dell'insulina e di altre molecole che mediano il segnale insulinico, alterazione dei meccanismi di trasporto del glucosio all'interno delle cellule, alterazioni a carico di enzimi come la glicogeno-sintetasi e la piruvato-deidrogenasi, implicati nella via non ossidativa del metabolismo del glucosio) [51]. Anche il sistema incretinico è compromesso nel diabete mellito di tipo 2. GLP1 e GIP, secrete dall'apparato gastrointestinale nel periodo post-prandiale, sono in grado di aumentare la secrezione pancreatica di insulina glucosio-dipendente. Il GLP1 inoltre inibisce la secrezione di glucagone e inibisce la gluconeogenesi epatica, stimola la sintesi di glucosio nel muscolo, rallenta lo svuotamento gastrico e riduce l'appetito. Esso è rapidamente degradato dalla dipeptidil-dipeptidasi 4 (DDP 4) [72]. Nel diabete di tipo 2 i livelli di GLP sono ridotti rispetto a quelli dei soggetti sani mentre la secrezione di GIP sembra essere conservata ma c'è una resistenza all'azione di questo ormone [51], [72]. I fattori determinanti del diabete di tipo 2 consistono in una matrice di fattori genetici, epigenetici e correlati allo stile di vita: età avanzata, appartenenza ad etnie a rischio, familiarità per diabete mellito di tipo 2, fattori genetici, componenti della sindrome metabolica (circonferenza vita superiore a 88 cm nella donna e a 102 cm nell'uomo), trigliceridi superiori a 150 mg/dl o terapia ipolipidemizzante, colesterolo HDL < 40 mg/dl nell'uomo e < 50 mg/dl nella donna, pressione arteriosa > 130/85 mmHg o terapia antipertensiva, glicemia > 100mg/dl o terapia antidiabetica) basso status socio-economico, BMI  $\geq 25\text{kg/m}^2$ , obesità viscerale o addominale, alimentazione scorretta, fumo, sedentarietà, storia pregressa di diabete mellito gestazionale o parto di un neonato con peso maggiore di 4 kg, alcuni farmaci (statine, tiazidici), stress e depressione [23]. La componente ereditaria del DMT2 sembrerebbe essere di carattere poligenico, anche se il gene più frequentemente coinvolto è TCF7L2 (*transcription-factor-7 like 2*); esso codifica per un fattore di trascrizione del sistema Wnt che, a sua volta, sarebbe implicato nella regolazione della secrezione di insulina e glucagone. Altri sei geni sono associati al diabete mellito di tipo 2, tra cui il polimorfismo del gene SCL30A8 [46].

### 1.2.3. Cenni di terapia

In tutte le forme di diabete mellito il trattamento deve prevedere oltre ai presidi farmacologici, anche una dieta e un'attività fisica adeguate e il raggiungimento o il mantenimento di un peso corporeo normale. Il trattamento del paziente ha come obiettivo non solo la riduzione dell'iperglicemia, ma anche il raggiungimento e il mantenimento di livelli di glicemici e di HbA1c nei limiti, per prevenire o evitare la progressione delle complicanze associate al diabete, evitando, per quanto possibile, l'insorgenza di ipoglicemie [51]. È importante poi agire anche sul controllo della pressione arteriosa, sulla dislipidemia e sull'obesità, quindi su quei fattori implicati nell'insorgenza delle complicanze macrovascolari [51]. Per quanto riguarda la dieta, il fabbisogno calorico del paziente diabetico dipende dall'età, dal sesso e dall'attività fisica. Un soggetto normopeso dovrà seguire una dieta normocalorica mentre per un soggetto sovrappeso sarà indicata una dieta ipocalorica fino al conseguimento del peso ideale. La corretta ripartizione dell'apporto calorico è la seguente: carboidrati complessi 40-60%, proteine 10-20%, lipidi inferiori al 35% con grassi saturi inferiori al 7-8%. È inoltre consigliato limitare gli zuccheri semplici e favorire quelli complessi (fruttosio, sorbitolo, mannitolo) e ridurre l'alcol a meno di 10-20 g al giorno [51].

L'attività fisica va personalizzata sulla base delle condizioni generali e metaboliche del paziente; essa aumenta la produzione epatica di glucosio e la sua utilizzazione da parte del muscolo, riduce i livelli circolanti di acidi grassi liberi, di trigliceridi e del colesterolo totale [73]. L'esercizio fisico, sia aerobico che di resistenza, riduce il livello di HbA1c ma non ha una grande influenza sul BMI, poiché, a parità di perdita di massa grassa, vi è un aumento di quella magra; dunque il BMI non è un indice sufficientemente rappresentativo [74]. L'utilizzazione di glucosio durante l'esercizio fisico richiede comunque la presenza di insulina, quindi, mentre nel paziente con un buon compenso glicemico l'attività fisica favorisce il controllo metabolico, nel paziente con scarso controllo e tendenza alla chetoacidosi esso deve essere sconsigliato [51].

### 1.2.3.1. Terapia del diabete mellito di tipo 1

Il diabete di tipo 1 è caratterizzato da una carenza di insulina quindi nel trattamento della patologia è necessaria la terapia sostitutiva. Dal 1980, con tecnica del DNA ricombinante è stato possibile sintetizzare la molecola di insulina umana. I principali tipi di insulina sono classificati sulla base del tempo di latenza, del tempo di picco e della durata d'azione.

I farmaci maggiormente impiegati in terapia sono suddivisi in base alla loro durata d'azione in:

- insuline ad azione rapida: comprendono gli analoghi Lispro, Aspart e Glulisina. Queste molecole hanno tempi di latenza rispettivamente di 5-15, 10-20 e 20 minuti e picco d'azione a 30-90, 45-50 e 90 minuti. La Lispro ha una durata d'azione di 4-6 ore, la Aspart di 3-5 ore e la Glulisina di 5 ore [73], [75].
- Insuline ad azione breve: l'insulina umana regolare è un'insulina zinco-cristallina, solubile, che ha un tempo di latenza di 30-60 minuti, un picco a 2-3 ore e una durata d'azione di 8-10 ore [75].
- insuline a durata d'azione intermedia e lunga: la NPH o neutral protamin Hagedorn è un tipo di insulina che viene assorbita più lentamente a causa dell'aggiunta di protamina all'insulina regolare [76]; altre formulazioni sono l'analogo Lispro con protamina ad attività ritardata, gli analoghi ad azione prolungata Glargina e Detemir. Lispro con protamina ha azione dopo 2-4 ore dalla somministrazione, raggiunge il picco a 4-10 ore e ha durata d'azione per 12-18 ore. Le insuline Glargina e Detemir hanno rispettivamente un tempo di latenza di 2-4 ore e 1-2 ore e la loro azione dura 24 ore [51].

Lo schema terapeutico più comune prevede la combinazione di molecole diverse da somministrare in diversi momenti della giornata [76]:

- prandiale, con iniezione di insulina rapida e ultrarapida in modo da mimare la risposta fisiologica del pancreas all'introduzione di carboidrati;
- basale, con somministrazione di insulina lenta con lo scopo di fornire una copertura costante;

- viene poi aggiunta una dose supplementare correttiva di insulina rapida o ultra-rapida da somministrare solo se si riscontrano livelli di glicemia troppo elevati.

Nei pazienti all'esordio della malattia o con LADA c'è ancora una produzione residua di insulina quindi la terapia potrebbe richiedere l'iniezione di insulina basale una o due volte al giorno prima che la funzione  $\beta$  cellulare si esaurisca del tutto. Invece in pazienti con diabete manifesto è necessaria uno schema terapeutico che preveda sia l'iniezione basale che prandiale [76].

La complicanza principale del trattamento con insulina è l'insorgenza di ipoglicemie, che sono anche il principale fattore limitante per il raggiungimento di un controllo metabolico ottimale. L'episodio si manifesta con sintomi autonomici, come pallore, vasocostrizione periferica, sudorazione profusa, tachicardia e palpitazioni, ansia, tremori e midriasi, e sintomi neuroglucopenici. Questi ultimi dipendono da un interessamento dell'encefalo a vari livelli: parasimpatico (fame, eruttazione, nausea, vomito, turbe dell'accomodazione), corticale (cefalea, scarsa concentrazione, irritabilità, confusione e comportamento bizzarro), mesencefalico (deviazione oculare, ipertono muscolare, iperreflessia, segno di Babinski e convulsioni) e mielencefalico (assenza di riflesso corneale, miosi intensa, bradicardia, bradipnea, ipotermia, coma con areflessia). Nel paziente diabetico il cut off per stabilire l'ipoglicemia è un livello di glucosio nel sangue inferiore a 70 mg/dl. È importante ai primi sintomi di ipoglicemia assumere 15-20 g di glucosio e se, dopo 15 minuti, il quadro clinico non si è risolto è necessario ripetere la somministrazione del glucosio [51].

Una possibile alternativa alla somministrazione di multiple iniezioni di insulina è il posizionamento di un microinfusore. L'apparecchio è dotato di una pompa esterna, a controllo elettronico, programmabile manualmente per somministrare dosi di insulina basale ed in bolo, personalizzate sulla base dei risultati dell'autovalutazione glicemica [75]. Lo strumento, di dimensioni molto piccole, è collegato tramite un catetere a una cannula in teflon o metallo applicata nel sottocute dell'addome, dei glutei o delle cosce [76]. Questo dispositivo permette quindi di migliorare sensibilmente il compenso metabolico e la compliance alla terapia [51].



Mentre è generalmente condiviso che i pazienti che ricevono insulina debbano sottoporsi ad automonitoraggio dei livelli glicemici, c'è qualche discordanza sulla frequenza con la quale queste misurazioni debbano essere effettuate: per il diabete di tipo 1 la American Diabetes Association consiglia 3 o più misurazioni al giorno [76].

### **1.2.3.2. Terapia del diabete mellito di tipo 2**

Il diabete di tipo 2, essendo caratterizzato da una residua secrezione di insulina, può essere trattato con diversi farmaci prima di giungere all'utilizzo dell'insulina sintetica. Esistono infatti varie classi di farmaci che sono disponibili per il trattamento della patologia, ognuna con le sue caratteristiche, modalità d'azione, vantaggi ed effetti collaterali.

- **BIGUANIDI:** nella maggior parte dei paesi la Metformina è l'unica biguanide disponibile. La sua funzione principale è quella di ridurre la produzione epatica di glucosio e di aumentarne l'utilizzo da parte del tessuto muscolare e adiposo. Quindi il farmaco è un insulino-sensibilizzante in quanto aumenta la sensibilità periferica all'insulina. Tipicamente, la Metformina in monoterapia è in grado di ridurre i livelli di HbA1c dell'1,5%. Il farmaco è generalmente ben tollerato e i principali effetti collaterali sono di tipo gastrointestinale (nausea, irregolarità dell'alvo e tensione addominale), che possono essere prevenuti se il farmaco viene assunto durante i pasti e se la dose viene gradualmente aumentata. Tra gli effetti collaterali gravi è da segnalare il rischio di acidosi lattica mentre, la metformina in monoterapia, non sembra essere in grado di indurre ipoglicemia. Il suo utilizzo è controindicato in pazienti con insufficienza renale e insufficienza epatica [77].
- **SULFANILUREE:** riducono la glicemia stimolando la secrezione di insulina dalle  $\beta$  cellule del pancreas attraverso l'attivazione dei recettori SUR1 che inducono una chiusura selettiva dei canali del  $K^+$  ATP-dipendenti a cui consegue la depolarizzazione della membrana cellulare, l'ingresso del  $Ca^{2+}$  nella cellula e l'esocitosi dell'ormone [78]. Le sulfaniluree sono dunque degli insulino-secretagoghi che riducono HbA1c di 1,5 punti

percentuali e i loro principali effetti sono l'induzione di ipoglicemia e l'aumento di peso. Sono controindicate in gravidanza e allattamento. Le sulfaniluree sono suddivise in farmaci di prima generazione (Tolbutamide, Clorpropamide, Tolazamide) e di seconda generazione (Glibenclamide, Glicazide, Glipizide, Glimepiride) [77].

- METIGLINIDI: sono un'altra classe di insulino-secretagoghi che inibiscono il canale del  $K^+$  ATP-dipendente legando un sito differente da SUR1 e inducendo depolarizzazione e secrezione di insulina [78]. I composti principali appartenenti a questa classe sono il Repaglinide e il Nateglinide. Questi farmaci hanno una durata d'azione minore delle sulfaniluree e quindi conferiscono un minor rischio di sviluppare ipoglicemie mentre l'aumento di peso è paragonabile.
- TIAZOLIDINEDIONI o GLITAZONI: in Italia il Pioglitazone, tra i farmaci appartenenti a questa classe, è il più utilizzato. I glitazoni sono dei farmaci insulino-sensibilizzanti che hanno come bersaglio PPAR $\gamma$ : agendo su questo recettore nucleare e attivandolo, aumentano la sensibilità all'insulina a livello del tessuto muscolare scheletrico, del fegato e del tessuto adiposo. Se assunti in monoterapia, i glitazoni, riducono l'HbA1c dello 0,5-1,4% ma sembrano avere una durata d'azione di gran lunga maggiore sul controllo glicemico, soprattutto se confrontati con le sulfaniluree. Gli effetti collaterali principali sono l'aumento di peso e ritenzione di fluidi con rischio di scompenso cardiaco congestizio e riduzione della densità minerale ossea; sono dunque controindicati in pazienti con insufficienza cardiaca attuale o pregressa [77].
- INIBITORI DELLE DIPEPTIDIL-DIPEPTIDASI IV (DDP-IV): i farmaci appartenenti a questa classe, come il Saxagliptin, Sitagliptin e Vildagliptin, modulano il metabolismo glicidico inibendo l'enzima DDP IV, coinvolto nell'inattivazione di GLP-1 e GIP. L'aumento dell'emivita delle due incretine induce un potenziamento della secrezione insulinica in risposta all'assunzione di carboidrati e riduce l'ipersecrezione di glucagone, verosimilmente mediante azione paracrina della somatostatina [51]. Il loro effetto terapeutico necessita di una residua attività  $\beta$  cellulare e di una

residua secrezione endogena di GLP-1 e GIP. Questi farmaci sono particolarmente efficaci nel ridurre l'iperglicemia postprandiale e il loro utilizzo non è associato ad aumentato rischio di ipoglicemie [74], [77].

- ANALOGHI E MIMETICI DI GLP-1: legano avidamente il recettore del GLP-1 nelle  $\beta$  cellule pancreatiche e aumentano la secrezione di insulina mediata dal glucosio. Appartengono a questa classe l'analogo Liraglutide e il mimetico Exenatide. Oltre all'azione diretta a livello pancreatico, questi farmaci agiscono sullo stomaco, rallentando lo svuotamento gastrico e la velocità di assorbimento postprandiale del glucosio, e sul sistema nervoso, riducendo il senso della fame, con conseguente calo ponderale. La loro azione dipende tuttavia dalla presenza di una residua secrezione di insulina e non sembrano provocare ipoglicemie iatrogene. Gli effetti collaterali più comuni sono i disturbi gastrointestinali e recentemente in alcuni studi è emerso un rischio aumentato di pancreatite acuta; tuttavia i numeri sono piccoli e la forza dell'associazione non è ancora chiara [74], [77].
- INIBITORI DELLE  $\alpha$ -GLICOSIDASI INTESTINALI: riducono la digestione dei polisaccaridi a livello del piccolo intestino e riducono i livelli di glucosio postprandiali senza causare ipoglicemie. Dal momento che i carboidrati vengono assorbiti più distalmente a livello del colon, non si verificano malassorbimento e calo ponderale, tuttavia, l'arrivo di maggiori quantità di carboidrati al colon distale esita in una maggior produzione di gas, con disturbi gastrointestinali quali il meteorismo [77].
- AGONISTI DELL'AMILINA: il Pramlitinide è un analogo dell'ormone pancreatico amilina, considerato un ormone anoressizzante coinvolto nella secrezione di insulina e glucagone. Viene somministrato per via sottocutanea prima dei pasti e rallenta lo svuotamento gastrico, riduce la produzione di glucagone e riduce le escursioni glicemiche postprandiali. Il Pramlitinide riduce l'HbA1c di 0,5-0,7 punti percentuali e i principali effetti collaterali sono di tipo gastrointestinale. Il suo utilizzo ad oggi è approvato solo se somministrato in associazione con altri farmaci, anche nel DMT1 [77], [79].

- **INIBITORI DI SGLT2:** sono una nuova classe di farmaci che comprende Dapaglifozin, Canaglifozin, Empaglifozin. Essi agiscono sul co-trasportatore sodio-glucosio di tipo 2 (SGLT-2) presente a livello del tubulo renale prossimale, il quale è responsabile del riassorbimento di più del 90% del glucosio dal filtrato glomerulare. Nei pazienti diabetici l'espressione di SGLT-2 paradossalmente aumenta così come la soglia renale per la glicosuria e quindi il glucosio in accesso viene trattenuto. Queste molecole, agendo direttamente sui reni, abbassano la soglia per l'escrezione renale del glucosio e ne aumentano l'escrezione urinaria [80], [81]. In diversi trial clinici questi farmaci si sono dimostrati in grado di ridurre l'HbA1c dello 0,5-1,5% se usati da soli in combinazione con altre molecole. Effetti benefici aggiuntivi di questa classe di farmaci sono una riduzione del peso corporeo, un aumento della sensibilità all'insulina e una riduzione della pressione arteriosa [74]. Gli effetti collaterali principali sono le infezioni del tratto genito-urinario legate alla glicosuria protratta nel tempo, anche se nella maggior parte dei casi si tratta episodi di scarsa gravità. Anche gli eventi legati alla deplezione di volume come l'ipotensione sono rari e di lieve entità. Rari casi di chetoacidosi diabetica euglicemica sono stati riscontrati in pazienti trattati con inibitori di SGLT-2 [74], [80]. In un ridotto numero di casi sono stati segnalati transitori aumenti della creatinina sierica quindi l'utilizzo del farmaco non è raccomandato per pazienti con compromissione renale da moderata a grave. Sebbene gli inibitori di SGLT-2 siano attualmente approvati solo per il trattamento del DMT1, il meccanismo d'azione indipendente dall'insulina è stato oggetto d'attenzione anche per un suo possibile utilizzo per pazienti con DMT1 e LADA [79]. Le esperienze disponibili evidenziano risultati indubbiamente interessanti per quanto riguarda il miglioramento del fabbisogno insulinico e della variabilità glicemica mentre la limitazione più importante sembra legata al rischio di chetoacidosi [80].

Quando i farmaci ipoglicemizzanti non sono più sufficienti a mantenere un controllo glicemico ottimale è necessario introdurre la terapia insulinica. Nel DMT2 possono essere utilizzati diversi schemi terapeutici che vanno

dall'iniezione serale di insulina ad azione ritardata associata alla somministrazione di farmaci antidiabetici orali, a boli di insulina ad azione rapida ai pasti (lispro, aspart o glulisina) fino a somministrazione di insuline ad azione rapida e ritardata, premiscelate in diverse concentrazioni, a colazione e a cena. Nelle fasi più avanzate è necessario introdurre schemi di terapia insulinica intensiva, come lo schema basal-bolus, analogo a quello impiegato nel trattamento del DMT1 o lo schema basal-plus (insulina ad azione ritardata più una singola somministrazione di insulina ad azione rapida prima del pasto) [51].

I farmaci utilizzati nella terapia del diabete mellito possono alleviare l'infiammazione agendo sull'iperglicemia, sull'iperlipidemia o modulando direttamente il sistema immunitario. In alcuni studi in vitro è stato dimostrato un effetto antinfiammatorio dei farmaci antidiabetici ma con dosi nettamente superiori a quelle utilizzate in clinica, quindi i risultati devono essere accolti con cautela. La Metformina sembra agire sull'attivazione dell'AMPK, regolatore dell'omeostasi energetica che esercita effetti antinfiammatori e antiossidanti, ma inibisce anche direttamente la produzione di specie reattive dell'ossigeno a livello della catena di trasporto degli elettroni mitocondriale. Inoltre la Metformina inibisce la produzione di IL-1 $\beta$  e aumenta quella di IL-10 nei macrofagi attivati dal lipopolisaccaride. Tra le sulfaniluree, invece, il Gliburide inibisce l'inflammasoma e la conseguente produzione di IL-1 $\beta$  da parte dei macrofagi mentre il Glipizide riduce i markers infiammatori correlati alla disfunzione endoteliale nel DMT2. I tiazolidinedioni proteggono le cellule  $\beta$  dallo stress ossidativo e dall'apoptosi e riducono la disfunzione endoteliale ma il preciso meccanismo con cui si verifica questo effetto è sconosciuto. Gli inibitori di DDP 4 sopprimono la subunità nucleotide-binding oligomerization domain-like receptor 3 (NLRP3) dell'inflammasoma, i TLR4 e l'IL-1 $\beta$  macrofagica; inoltre il trattamento con questi farmaci previene la peri-insulite tipica dei roditori sottoposti sperimentalmente a dieta ad alto contenuto lipidico. Anche gli analoghi di GLP-1 modulano l'immunità innata, portando a una riduzione dell'attivazione proinfiammatoria dei macrofagi e ad una ridotta produzione di IL-1 $\beta$ , IL-6 e TNF- $\alpha$  e ad un aumento dei livelli di adiponectina. Infine l'insulina esercita un effetto antinfiammatorio indipendente dalla riduzione della glicemia e riduce la produzione di citochine proinfiammatorie e di mediatori

dell'infiammazione come i TLR, NF-kB e MCP-1, mentre gli inibitori di SGLT-2 riducono lo stress ossidativo e i livelli di IL-6, MCP-1, TNF- $\alpha$  e di proteina C reattiva [82].

Recenti evidenze sembrano dimostrare che i farmaci immunomodulanti e antinfiammatori possono avere un effetto benefico nel diabete mellito, a livello del controllo metabolico. TNF- $\alpha$  è stata la prima citochina ad essere studiata per il suo coinvolgimento nella patogenesi dell'insulinoresistenza; tuttavia i suoi inibitori non dimostrano chiari effetti benefici nel trattamento del DMT2 nell'uomo. Per quanto riguarda invece l'IL-1 $\beta$ , otto diversi studi clinici con antagonisti del recettore di IL-1 (Anakinra) e anticorpi specifici contro IL-1 $\beta$  (Gevokizumab e Canakizumab) hanno dimostrato un miglioramento del profilo metabolico, con riduzione di HbA1c e dei markers dell'infiammazione. Il Salsalato, invece, è un farmaco antinfiammatorio precursore del Salicilato che ha dimostrato effetti benefici sulla glicemia e sulla sensibilità all'insulina, inibendo probabilmente la via di NF-kB [82]. La Diacereina è un farmaco utilizzato per il trattamento dell'artrite reumatoide che, in alcuni studi su pazienti diabetici che non avevano ancora iniziato una terapia, si è dimostrata in grado di migliorare la sensibilità all'insulina e i livelli di HbA1c e di ridurre quelli di IL-1 $\beta$  e TNF- $\alpha$ ; sono tuttavia necessari ulteriori studi per verificarne gli effetti a lungo termine e la sicurezza. Infine l'idrossiclorochina, farmaco antimalarico utilizzato nel trattamento di patologie reumatiche, è in grado di ridurre l'incidenza di diabete tra i pazienti con artrite reumatoide e lupus mentre l'utilizzo di questo farmaco per il trattamento di topi diabetici è in grado di migliorare la sensibilità all'insulina; ulteriori studi sono necessari per valutare gli effetti dell'idrossiclorochina su pazienti diabetici e per comprendere se l'effetto metabolico è legato alle sue proprietà antinfiammatorie [82]. Altri studi hanno valutato l'utilizzo di attivatori di sirtuina 1 (SIRT-1), antagonisti di C-C motif chemokine receptor 2 (CCR-2) e inibitori di mammalian target of rapamycin (mTOR) nel trattamento del diabete mellito: i primi due hanno riportato un miglioramento della sensibilità all'insulina mentre l'ultimo non ha prodotto alcun effetto [83].

### **1.3 . Diabete mellito e fenotipo proinfiammatorio**

#### **1.3.1. Diabete mellito di tipo 1 e fenotipo proinfiammatorio**

Le cellule  $\beta$  del pancreas sono il target dell'attacco autoimmune che caratterizza il diabete mellito di tipo 1, con assalto delle insule da parte di cellule mononucleate in una reazione infiammatoria definita "insulite", che porta alla perdita della massa cellulare e della produzione di insulina [84]. La morte delle cellule  $\beta$  in corso di insulite è probabilmente dovuta a contatto diretto con i macrofagi e con i linfociti T attivati e/o l'esposizione a mediatori solubili liberati da queste cellule, come citochine, ossido nitrico e radicali liberi dell'ossigeno[84]. L'infiammazione nel diabete mellito di tipo 1 ha un ruolo centrale nell'attivazione della risposta immune e nella distruzione delle  $\beta$  cellule, ma anche nella soppressione della funzione  $\beta$  cellulare e nella resistenza periferica all'insulina[85], [86].

Un ruolo importante nel mantenimento dello stato proinfiammatorio nel diabete di tipo 1 è stato recentemente attribuito ai Toll-Like Receptor, la classe principale di recettori dell'immunità innata, in particolare TLR2 e TLR4. Infatti i livelli di queste molecole e dei loro target è notevolmente aumentato in corso di DMT1 e di aterosclerosi e il rilascio di TNF- $\alpha$  e IL-1 $\beta$  da parte dei monociti è maggiore nei pazienti diabetici che nei controlli e correla con i livelli di TLR2 e TLR4 [86]. Essi attivano la cascata del segnale agendo sul pathway di NF-kB e la loro attivazione nel DMT1 sembrerebbe essere responsabile della produzione di citochine proinfiammatorie come IL-1, TNF- $\alpha$  e MCP-1 [86].

Altri importanti mediatori dell'infiammazione del contesto del diabete di tipo 1 sono le citochine, in particolare IL-1, TNF- $\alpha$  e IFN- $\gamma$ , e i linfociti CD4+ e CD8+ che le producono. Le insule di pazienti con DMT1 in stadio iniziale sono prevalentemente infiltrate da linfociti CD8+ e nel progredire della patologia, l'aumento dell'infiltrato correla con la distruzione delle  $\beta$  cellule. I linfociti CD8+ inducono la distruzione delle cellule pancreatiche attraverso il rilascio di granuli citotossici contenenti granzimi e perforine, tramite esocitosi dopo il diretto contatto con le cellule bersaglio e tramite l'up-regolazione di Fas ligando, dando così inizio all'apoptosi [87]. Le cellule CD8+ sono anche necessarie per l'espansione delle

cellule CD4<sup>+</sup> che hanno un ruolo critico nello sviluppo del diabete, dimostrato anche dal fatto che i topi deficiari di linfociti T CD4<sup>+</sup> sono protetti dallo sviluppo della patologia. Queste cellule sono coinvolte sia nelle fasi iniziali che finali della malattia e la loro azione distruttiva sulle  $\beta$  cellule è mediata dal rilascio di IFN- $\gamma$  e TNF- $\alpha$  [87]. Anche i ROS sono degli attori importanti nel contesto dell'infiammazione: essi influenzano una varietà di processi essenziali come autofagia, chemiotassi, presentazione dell'antigene e immunomodulazione. Uno studio recente ha infatti dimostrato che i ROS producono nuovi epitopi altamente immunogeni che guidano la patogenesi del diabete di tipo 1; in aggiunta i ROS agiscono anche sull'immunità adattativa, promuovendo la sintesi di TNF- $\alpha$  e IL-1 da parte dei macrofagi e delle cellule dendritiche [87].

Oltre all'aumento delle citochine proinfiammatorie, ciò che porta alla perdita delle cellule pancreatiche è anche la riduzione delle citochine antinfiammatorie che hanno un ruolo protettivo nei confronti del pancreas [88]. Queste citochine sono rappresentate principalmente da IL-4, IL-13 e IL-10. Quando le cellule si trovano in un ambiente in cui sono presenti le citochine antinfiammatorie si assiste ad un aumento dell'espressione di geni antiapoptotici, con conseguente citoprotezione. Numerosi studi hanno infatti dimostrato che le  $\beta$  cellule dei roditori e le isole umane sono meno sensibili a una serie di stimoli citotossici dopo esser state esposte a IL-4, IL-13 e IL-10, da sole o in varie combinazioni [88]. Per quanto riguarda l'IL-6, invece, essa ha un ruolo controverso sia nella patogenesi del diabete di tipo 1 che del diabete di tipo 2. Nel DMT1 c'è una scarsa evidenza di un ruolo essenziale dell'IL-6, sebbene questa possa potenziare altri meccanismi patogenetici [89].

Recentemente una nuova classe di cellule T è stata correlata alla patogenesi del DMT1, in quanto si è scoperta avere un ruolo di primaria importanza nella distruzione delle cellule  $\beta$ : i linfociti Th17. Questa popolazione cellulare è responsabile della produzione di IL-17 nei linfonodi peri-pancreatici dei soggetti diabetici in seguito a esposizione ad antigeni specifici come la decarbossilasi dell'acido glutammico (GAD65) ma ciò non avviene nei soggetti sani. Questa classe di linfociti sembra essere un target promettente nella terapia del diabete di tipo 1 in quanto è stato osservato che il trattamento con anticorpi anti IL-17 riduce



i livelli circolanti di GAD65 e il numero di linfociti Treg CD4+ nei linfonodi peripancreatici [90].

Il tessuto adiposo gioca un ruolo importante nell'infiammazione, infatti l'obesità è associata ad un basso grado di infiammazione cronica dovuto all'infiltrazione di cellule dell'immunità come i monociti, i macrofagi, le cellule natural killer e i linfociti, con conseguente produzione di un ambiente ricco di citochine proinfiammatorie sia da parte degli adipociti che delle cellule immunitarie [1]. Questo depone per un coinvolgimento del tessuto adiposo nella patogenesi dell'insulinoresistenza tipica del diabete di tipo 2. Parallelamente, studi recenti hanno messo in luce un coinvolgimento del tessuto adiposo e della disfunzione adipocitaria anche nella patogenesi del diabete di tipo 1. Il tessuto adiposo peripancreatico infatti è da sempre stato classificato come tessuto adiposo bianco, tuttavia possiede caratteristiche infiammatorie maggiori rispetto al tessuto adiposo presente in altre sedi, anche grazie al suo maggior contenuto di markers del tessuto adiposo bruno come la proteina disaccoppiante UCP-1 [91]. Il tessuto adiposo peripancreatico (PAT) esercita effetti locali e sistemici sulla funzionalità pancreatica e sulla sensibilità all'insulina. Esso potrebbe essere responsabile della disregolazione immune che si verifica all'esordio del diabete: la produzione di citochine proinfiammatorie nelle prime fasi dello sviluppo della malattia potrebbe essere il primo passo verso la perdita di tolleranza e l'espansione delle cellule dell'immunità. Le citochine prodotte dal tessuto adiposo potrebbero agire sulla perdita di tolleranza nel pancreas in tre modi differenti. Per prima cosa le citochine hanno un effetto diretto sulla sopravvivenza e sull'immunogenicità delle  $\beta$  cellule e gli autoantigeni sono presenti nel contesto di un ambiente proinfiammatorio. Inoltre la produzione di chemochine è secondaria alla presenza di una stimolazione proinfiammatoria nelle isole pancreatiche. Infine le citochine proinfiammatorie hanno un effetto diretto su molte cellule dell'immunità, soprattutto sui linfociti T che a loro volta produrranno altre citochine proinfiammatorie che andranno a danneggiare le cellule pancreatiche e a portare a una perdita della tolleranza [91]. A supporto di quanto sostenuto, è stato dimostrato che topi con una delezione negli adipociti della proteasi SUMO-specific protease-1 (SEN1) mostrano un aumento della produzione di citochine proinfiammatorie da parte del tessuto adiposo e sono più

soggetti a sviluppare diabete di tipo 1. La SUMOilazione è un processo dinamico coinvolto nella regolazione di diverse funzioni proteiche mediato dalle proteine small ubiquitin-like modifier (SUMO) e che viene annullato da delle proteasi SENP. Diversi componenti della famiglia di NF- $\kappa$ B sono coinvolti nel processo di SUMOilazione e SUMO è coinvolta nella patogenesi di alcune malattie come l'Alzheimer, la corea di Huntington e il diabete di tipo 1. Si è notato che alcuni topi con una delezione negli adipociti della proteasi SENP-1 mostrano un aumento della produzione di citochine proinfiammatorie da parte del tessuto adiposo e sono più soggetti a sviluppare diabete di tipo 1. Accanto a questa forte predisposizione per il DMT1, questi topi sono colpiti anche una lieve forma di diabete di tipo 2, esacerbato da una dieta ricca di grassi [91].

### **1.3.2. Diabete mellito di tipo 2 e fenotipo proinfiammatorio**

#### **1.3.2.1. Fattori proinfiammatori circolanti**

Il concetto di diabete mellito di tipo 1 come patologia infiammatoria immuno-mediata è da tempo noto ma recentemente si è evidenziato il coinvolgimento del sistema immunitario anche nella patogenesi del diabete di tipo 2, considerato quindi una patologia auto-infiammatoria [92]. L'insulinoresistenza, come già è stato riportato precedentemente, è associata con l'obesità, l'invecchiamento e l'inattività. Le cellule pancreatiche rispondono alla resistenza periferica all'insulina aumentando la loro massa cellulare e la secrezione dell'ormone. Tuttavia quando l'espansione funzionale delle  $\beta$  cellule fallisce nel tentativo di compensare l'insulinoresistenza, si arriva al quadro di insulinodeficienza e di diabete di tipo 2 con le sue complicanze microvascolari (retinopatia, neuropatia e nefropatia) e macrovascolari (aterosclerosi e amputazioni). È interessante notare che solo un terzo degli individui obesi sviluppa iperglicemia cronica e DMT2; la ragione per cui ciò avvenga resta ancora sconosciuta e probabilmente sono chiamati in causa fattori genetici ed epigenetici [92].

L'evidenza della presenza di infiammazione nel DMT2 è supportata dal fatto che in questa condizione aumentano i livelli circolanti di proteine di fase acuta (PCR,

aptoglobina, fibrinogeno, inibitore dell'attivatore del plasminogeno PAI-1 e amiloide sierica di tipo A), acido sialico, citochine e chemochine. In più elevati livelli di IL-1 $\beta$ , IL-6 e PCR sono predittivi per lo sviluppo di DMT2. La presenza in circolo di questi mediatori dell'infiammazione riflette l'attivazione delle cellule dell'immunità innata, tuttavia, i livelli di questi markers non riflettono necessariamente il livello di infiammazione presente a livello tissutale: il volume pancreatico è piccolo se paragonato a quello ematico dunque è improbabile che un elevato livello di infiammazione a livello del pancreas giustifichi elevati livelli di mediatori dell'infiammazione in circolo. D'altro canto le dimensioni del tessuto adiposo sono elevate nei soggetti obesi così come quelle del fegato che è anche il sito di produzione di PCR indotta dall'IL-6. Coerentemente con questo fatto i livelli di markers infiammatori sono elevati nei soggetti obesi con pre-diabete e sono paragonabili a quelli dei soggetti con diabete manifesto [92].

#### **1.3.2.2. Fattori proinfiammatori nel pancreas e nei tessuti insulinosensibili**

La produzione di TNF dalle cellule adipose dei topi obesi fornì la prima evidenza del coinvolgimento dell'infiammazione tissutale nello sviluppo di insulinoresistenza [35]. Inizialmente si pensava che la fonte della produzione di TNF fossero gli adipociti stessi mentre successivamente si è notato che il tessuto adiposo era ricco di macrofagi e nell'obesità i macrofagi erano aumentati e attivati. Oggi sappiamo che i macrofagi sono responsabili della produzione di una significativa quota dei fattori proinfiammatori che sono aumentati nei soggetti obesi. Come è stato ampiamente discusso nel capitolo precedente, i macrofagi maggiormente presenti nel tessuto adiposo di topi sottoposti ad alimentazione forzata e resi obesi sono macrofagi M1 (che esprimono TNF e NO sintetasi) mentre nei topi magri prevalgono i macrofagi M2 (produttori di arginasi e IL-10), polarizzati verso un fenotipo antinfiammatorio [92]. Nonostante i macrofagi siano la popolazione di cellule immunitarie più rappresentata nel tessuto adiposo, altre cellule sono presenti e il loro numero e attivazione cambia nella transizione da una situazione di magrezza verso l'obesità. Ad esempio i mastociti tendono ad accumularsi durante l'induzione di un fenotipo obeso in modelli murini nel tessuto

adiposo sottocutaneo; tuttavia la loro funzione non è ancora stata del tutto compresa [92]. Accanto ai macrofagi, una crescente attenzione viene prestata nei confronti della popolazione di cellule T, che varia in proporzione e in fenotipo nell'obesità. I linfociti Th2 e i linfociti T regolatori CD4<sup>+</sup> con proprietà antinfiammatorie predominano nel tessuto adiposo di topi magri mentre i linfociti Th1 CD4<sup>+</sup> e i linfociti T CD8<sup>+</sup> si accumulano nel tessuto adiposo di topi obesi [39]. Nel tessuto adiposo umano, la quantità di linfociti T proinfiammatori che producono IFN- $\gamma$  o IL-17 aumenta con l'aumentare del grado di obesità; in aggiunta, i linfociti T produttori di IL-17 e IL-22 si accumulano nel tessuto adiposo dei soggetti obesi insulinoresistenti [93]. Anche le cellule dell'immunità adattativa possono quindi contribuire all'infiammazione correlata all'obesità e al DMT2. L'infiltrazione linfocitaria precede quella macrofagica nel tessuto adiposo del soggetto obeso contemporaneamente all'insorgenza della resistenza insulinica e sembra aver un ruolo nell'infiammazione del tessuto adiposo e nello stato di attivazione dei macrofagi. In modelli murini si sospetta che un numero elevato di linfociti CD8<sup>+</sup> sia la causa scatenante del processo di reclutamento e attivazione dei macrofagi. L'obesità induce anche una modifica nel bilancio tra sottopopolazione di cellule CD4<sup>+</sup> proinfiammatorie (linfociti Th1 e Th17) e antinfiammatorie (linfociti Th2 e Treg), portando alla secrezione di citochine da parte dei macrofagi appena reclutati. È interessante notare che i linfociti T regolatori sono diminuiti di numero nell'obesità sia in modelli murini che umani. Essi esprimono alte concentrazioni di citochine antinfiammatorie come IL-10 che inibiscono la migrazione dei macrofagi e polarizzano queste cellule verso un fenotipo M2: essi potrebbero quindi fornire protezione dall'insulinoresistenza indotta dall'infiammazione associata all'obesità[94].

Un certo grado di infiammazione è stato riscontrato anche nelle isole pancreatiche di soggetti diabetici, come è dimostrato dalla presenza di depositi di amiloide, fibrosi, morte delle  $\beta$  cellule e infiltrazione macrofagica parallelamente a un aumento di citochine e chemochine proinfiammatorie. Vari studi effettuati sul tessuto pancreatico di pazienti con DMT2 hanno messo in evidenza che vi è una sovra-espressione di citochine come IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-11, IL-33 e chemochine come IL-8, CCL2, CCL11 e CCL13 [95]. Queste citochine sembrano portare a un

reclutamento di cellule immunitarie nelle isole. L'infiammazione locale riduce la secrezione di insulina e la massa cellulare perché porta all'apoptosi delle cellule  $\beta$  [94].

Alcuni potenziali meccanismi coinvolti nell'infiammazione presente in corso di diabete di tipo 2 sono già stati discussi nel capitolo precedente. Tra questi è importante ricordare l'ipossia, la morte cellulare degli adipociti, le chemochine e le adipochine con proprietà proinfiammatorie. Molti degli insulti metabolici che portano a insulinoresistenza coinvolgono la via di segnalazione di NF- $\kappa$ B e JNK. Infatti IKKB attiva il fattore di trascrizione nucleare NF- $\kappa$ B e l'obesità induce la trascrizione dei geni target di NF- $\kappa$ B, come citochine proinfiammatorie, a livello del tessuto adiposo e del fegato. Queste citochine includono IL-1 $\beta$ , IL-6 e TNF, che promuovono l'insulinoresistenza nei tessuti nei quali vengono prodotte e possono anche essere trasportate in circolo e agire su tessuti distanti come le pareti vasali, il muscolo scheletrico e cardiaco, il rene e i leucociti circolanti[92]. L'altra chinasi importante, JNK, attiva i fattori di trascrizione ETS-domain containing protein ELK1, activating transcription factor (ATF2) e JUN, anche se il ruolo dei fattori di trascrizione che rispondono all'attivazione di JNK non è ancora stato del tutto definito. Tuttavia alcuni esperimenti supportano il fatto che JNK abbia un ruolo nella risposta infiammatoria connessa all'obesità. Infatti molte delle citochine prodotte in risposta all'attivazione di NF- $\kappa$ B attivano esse stesse JNK e NF- $\kappa$ B con un meccanismo a feed-forward. Altri stimoli che promuovono l'insulinoresistenza e il DMT2 sono gli acidi grassi liberi e gli advanced glycation end-products (AGE), che agiscono tramite l'attivazione dei Toll-Like Receptors e di recettori per gli AGE[92].

Delle citochine prodotte in risposta ai fattori di trascrizione appena trattati, *interleuchina 1- $\beta$  (IL-1 $\beta$ )* ha un ruolo fondamentale: la sua attivazione indotta dall'eccesso di nutrienti è complessa. Gli acidi grassi liberi producono molecole infiammatorie tramite l'attivazione di recettori come TLR2 e TLR4, che fungono da sensori di lipidi, oppure indirettamente tramite metaboliti degli acidi grassi come la ceramide. Invece l'induzione di IL-1 $\beta$  indotta da glucosio coinvolge alcuni domini dell'inflammasoma, come NOD e NLRP3. Questa struttura è una componente centrale dell'immunità innata e si attiva in presenza di prodotti

microbici o sostanze endogene[94]. L'espressione dei componenti NLRP3 dell'inflammasoma, l'attività della caspasi, e i livelli di IL-1 $\beta$  sono aumentate nel tessuto adiposo e soprattutto nei macrofagi dei soggetti obesi e correlano in maniera direttamente proporzionale al grado di insulinoresistenza, alla gravità della sindrome metabolica e del DMT2[94]. IL-1 $\beta$  è la principale citochina di derivazione macrofagica aumentata nel tessuto adiposo di soggetti obesi con DMT2 ed è in grado di aumentare il rilascio di IL-17 e di IL-22 da parte dei linfociti T CD4+ nel tessuto adiposo. Queste due citochine inducono una risposta infiammatoria in diverse cellule. Dunque l'effetto proinfiammatorio di IL-1 $\beta$  nel tessuto adiposo può essere indiretto e mediato in parte da IL-17 e IL-22; in maniera reciproca, la presenza dei recettori per IL-17 e IL-22 nelle cellule CD4+ del tessuto adiposo sembrano suggerire una responsività di queste cellule a un ambiente in cui sono presenti i linfociti Th17[93].

*L'interleuchina 6* ha un ruolo controverso nel meccanismo di insorgenza dell'insulinoresistenza: le concentrazioni di IL-6 e PCR sono correlate all'obesità e all'incidenza di DMT2 nei soggetti predisposti e la produzione epatica e adipocitaria di IL-6 sembra promuovere l'insulinoresistenza. Invece la produzione di IL-6 dal muscolo scheletrico, soprattutto durante l'esercizio fisico intenso, ha un effetto benefico [94]. IL-6, per mediare i suoi effetti biologici, utilizza due vie di segnale, definite classica e di trans-signalling. Nella prima IL-6 lega il recettore di membrana IL-6R e il complesso così formato si associa alla glicoproteina gp130, formando una struttura in grado di trasmettere il segnale, con fosforilazione di JAK e STAT che a loro volta vanno ad attivare la via di MAPK [96], [97]. Mentre la maggior parte delle cellule del corpo esprimono gp130, IL-6R si trova solo su monociti, macrofagi, neutrofili, alcuni tipi di linfociti T, epatociti, alcune cellule endoteliali e cellule pancreatiche  $\alpha$  e  $\beta$ . IL-6R esiste anche in una forma solubile (sIL-6R) che deriva dallo splicing selettivo dell'mRNA di IL-6R o viene clivato da metalloproteasi come A disintegrin and metalloproteinase domain-containing protein 10 e 17 (ADAM10 e ADAM17). sIL-6R lega IL-6 con la stessa affinità di mbIL-6R (recettore di membrana) e forma con gp130 un complesso di trasmissione del segnale agonista. Questo processo è noto come trans-signalling e mentre il pathway classico è coinvolto negli effetti antinfiammatori e rigenerativi di IL-6, il

trans-signalling sembra essere associato alle risposte proinfiammatorie causate dalla citochina [96]. Per quanto riguarda il rapporto di IL-6 con l'infiammazione sembra che gli eventi mediati da IL-6 possano controllare l'infiltrazione leucocitaria. I suoi livelli sono aumentati nella mucosa di pazienti con IBD e nel morbo di Crohn contribuisce all'aumento della resistenza delle cellule T della mucosa all'apoptosi. Elevati livelli di sIL-6R vengono riscontrati in artrite reumatoide giovanile, osteoartrite e nell'asma [98]. Per quanto riguarda gli effetti dell'IL-6 nella patogenesi dell'insulinoresistenza e del diabete i dati sono contrastanti. I livelli sistemici di IL-6 sono aumentati, come già è stato affermato in precedenza, nei pazienti con DMT2 e la citochina è un fattore predittivo indipendente dello sviluppo di diabete di tipo 2 e delle complicanze cardiovascolari associate[97]. Inoltre certi polimorfismi del gene dell'IL-6 sono significativamente associati allo sviluppo di DMT2. Tuttavia, mentre alcuni studi mettono in evidenza l'effetto deleterio dell'IL-6 sull'azione dell'insulina, altri suggeriscono che la citochina è necessaria per mantenere l'omeostasi glicidica [96]. Si pensa che l'interleuchina 6 a livello del tessuto adiposo sia stimolata attraverso meccanismi paracrini da fattori proinfiammatori ma resta ancora poco chiaro se la citochina agisca da effettore pro o antinfiammatorio. Invece a livello del muscolo scheletrico, l'organo che contribuisce a più del 90% del metabolismo del glucosio mediato dall'insulina, la produzione della citochina aumenta in corso di esercizio fisico; inoltre IL-6 sembra aumentare a questo livello l'espressione di GLUT4 e, di conseguenza, la captazione del glucosio. Viceversa, altri studi hanno mostrato che l'infusione di IL-6 in modelli murini causa una riduzione dell'uptake di glucosio insulinomediato da parte del muscolo scheletrico [96]. A livello degli epatociti, ci sono evidenze più consistenti di come l'IL-6 riduca la sensibilità all'insulina. Il motivo per cui gli epatociti reagiscano in maniera più consistente alla citochina rispetto al tessuto adiposo e muscolare resta ancora un quesito irrisolto[89].

Negli ultimi anni un'altra citochina sta assumendo una crescente importanza per il suo ruolo nell'infiammazione correlata all'obesità e all'insulinoresistenza: l'*interleuchina 17*. Essa è prodotta da molte cellule dell'immunità innata o adattativa anche se la maggior fonte sono i linfociti Th17. IL-17A e F sono membri di una famiglia di citochine di cui IL-17A è la più rappresentata e forma un

eterodimero con IL-17F. Questo complesso in parte induce il reclutamento dei neutrofili verso i siti di infiammazione attraverso il rilascio di chemochine come C-X-C motif ligand 1 (CXCL1), C-X-C motif ligand 2 (CXCL2), C-X-C motif ligand 8 o interleuchina 8 (CXCL-8 o IL-8) e C-X-C motif ligand 6 (CXCL-6). Inoltre IL-17A o F aumentano i livelli di attività della elastasi neutrofila e della mieloperossidasi, rappresentando una forma di difesa importante contro i batteri e i funghi che non sono stati eliminati dalle cellule Th1 e Th2. Accanto a questi effetti fisiologici, le cellule Th17 sono anche state implicate nella patogenesi di patologie autoimmuni/ infiammatorie (come l'artrite reumatoide, la sclerosi multipla, la psoriasi) e del cancro [99]. L'obesità sembra promuovere l'espansione delle cellule T produttrici di IL-17 nel tessuto adiposo sia murino che umano. A supporto dell'implicazione di IL-17 nella sindrome metabolica, i livelli di espressione di IL-17R nel fegato o nel muscolo sembrano correlare con l'insulinoresistenza, e il blocco di IL-17 porta ad una riduzione dell'infiammazione epatica e della steatoepatite non alcolica (NASH) [99]. Le cellule coinvolte nella polarizzazione delle cellule T verso la secrezione di IL-17 sono i macrofagi e le ASC. I macrofagi M1 del tessuto adiposo producono IL-1 $\beta$ , IL-6 e IL-23 che correlano con l'espansione del pool dei Th17. Inoltre un'altra sottopopolazione di macrofagi recentemente identificata attiva i Th17 e inibisce i Th1 e Th2: si tratta dei MIS-MQ, mycobacterial infection-induced suppressor macrophage. Questo gruppo di macrofagi si distingue dagli altri per livelli di espressione genica di IL-1 $\beta$  e TNF- $\alpha$  più elevati [99]. L'IL-17 riduce l'espressione di fattori proadipogenici come PPAR- $\gamma$  e C/EBP $\alpha$  e aumenta l'espressione di sostanze che hanno un effetto antiadipogenico nel tessuto adiposo. L'effetto anti-adipogenico di IL-17 può anche essere attivato da COX-2 e dai conseguenti aumentati livelli di PGE2[99].



## **1.4. Cellule staminali mesenchimali (MSC)**

### **1.4.1. Definizione e caratterizzazione**

Le cellule staminali mesenchimali sono cellule multipotenti, presenti in diversi tessuti adulti, che possono differenziare nelle linee cellulari del mesoderma. La Mesenchymal and Tissue Stem Cell Committee della International Society for Cellular Therapy ha proposto i criteri minimi per la definizione di MSC umane. Tre criteri sono i fondamentali per definire le MSC [100]:

- Aderenza alla plastica
- Presenza di specifici antigeni di superficie
- Presenza di un potenziale di differenziazione multipotente.

Per prima cosa le MSC devono aderire alla plastica quando sono mantenute in condizioni standard utilizzando le fiasche per la coltura dei tessuti. Inoltre, più del 95% della popolazione cellulare delle MSC deve esprimere CD105, CD73 e CD90, misurati con la citofluorimetria. Invece, l'espressione di CD45, CD34, CD14 o CD11b, CD79 $\alpha$  o CD19 e HLA di classe II devono essere assenti. Infine queste cellule devono essere in grado di differenziarsi in osteoblasti, adipociti e condroblasti in vitro in condizioni standard [100].

Il concetto di cellula staminale ha avuto origine alla fine del XIX secolo come postulato teorico a spiegazione della capacità di alcuni tessuti (sangue, cute, ecc.) di auto-rinnovarsi per tutta la vita di un organismo, pure essendo esso costituito di cellule con vita breve [101]. Le cellule staminali ematopoietiche (HSC) furono identificate dopo un lungo periodo di ricerca volta a permettere la sopravvivenza dopo l'esposizione a radiazioni. Durante questo periodo, diversi studi dimostrarono che il midollo osseo era in grado di formare nuovo osso quando trapiantato in sedi ectopiche. L'isolamento e la coltura di questo tipo di cellule vennero dapprima dimostrate da Friedenstein et al. usando come modello il porcellino d'India. Successivamente numerosi gruppi pubblicarono dati simili per cellule di ratto e di coniglio coltivate dal midollo osseo e da altri tessuti. Similmente a quanto accaduto per le HSC, iniziò ad emergere il concetto della possibile esistenza di una cellula

staminale mesenchimale, una singola cellula capace di formare osso, cartilagine e altri tessuti mesenchimali. Haynesworth et al. furono capaci di coltivare MSC in quantità terapeutiche; successivamente esperimenti in vitro dimostrarono che le MSC umane erano capaci di differenziarsi in diverse linee cellulari tra cui osteoblasti, condrociti e adipociti. Studi in vitro e in vivo hanno mostrato anche la capacità di differenziarsi in muscolo, precursori neurali e cardiomiociti. Inoltre le MSC si sono dimostrate in grado di fornire fattori di crescita e citochine per l'espansione di cellule staminali ematopoietiche ed embrionarie [102].

#### **1.4.2. Isolamento**

Le MSC possono essere isolate da diversi tessuti, forse dalla maggior parte, sebbene il midollo osseo sia quello più utilizzato. Le MSC costituiscono una piccola frazione della popolazione cellulare del midollo osseo (0,001-0,01%), tuttavia possono essere isolate ed espanse con alta efficienza in coltura con condizioni ben definite. Le MSC sono generalmente isolate nell'uomo da un aspirato di midollo osseo raccolto dalla cresta iliaca superiore della pelvi. Esse sono state anche isolate dal compartimento midollare tibiale e femorale e dalla colonna toracica e lombare. Negli animali di grossa taglia le MSC sono isolate dagli stessi siti mentre nei topi sono solitamente raccolte dalla metafisi della tibia e del femore [103]. Il campione intero di midollo osseo è soggetto a frazionamento su una soluzione a gradiente di densità come il Percoll, dopodiché le cellule vengono coltivate con un medium basale e in presenza di siero fetale bovino (FBS) al 10%. Le cellule in coltura hanno un fenotipo fibroblastico e aderiscono al substrato tissutale della coltura [103]. Queste cellule mantengono la loro pluripotenza per 6-10 cicli [104]. Le colture primarie sono solitamente mantenute per 12-16 giorni durante i quali la frazione di cellule ematopoietiche non aderente è ridotta. La proprietà di aderire alla plastica non è sufficiente per permettere la purificazione delle MSC, almeno nel caso di cellule ottenute dal midollo di ratto. Negli anni sono stati sviluppati metodi eleganti per generare colture purificate di MSC, come l'immunodeplezione CD34/CD35/CD11b. Alcuni autori notarono che le cellule murine, ma non quelle umane, richiedono leukemia inhibitory factor (LIF) per la loro espansione. Inoltre

riportarono che le cellule di ratto necessitano di fattore di crescita dell'epidermide (epidermal growth factor o EGF) e di platelet-derived growth factor (PDGF-BB) in aggiunta al LIF, condizione simile a quella richiesta dalle cellule staminali embrionarie.

Negli ultimi anni le MSC sono state isolate anche da siti diversi dal midollo osseo: questa procedura prevede infatti il reperimento di aspirato midollare che è una procedura invasiva e che espone a rischio infettivo [105]. Le cellule staminali mesenchimali sono dunque state isolate da tessuto adiposo, cordone ombelicale crio-preserved, decidua del dente esfoliata, pelle e anche sangue periferico [104].

La quantità di cellule ottenute dai diversi tessuti è molto varia: Pittenger et al. isolarono le MSC da midollo osseo tramite centrifugazione su gradiente di concentrazione e le MSC rappresentavano lo 0,001-0,1% di tutte le cellule isolate. Invece da 1 g di tessuto adiposo possono essere isolate  $5 \times 10^3$  cellule mesenchimali, cioè una quantità 500 volte maggiore di quella ottenuta dal midollo osseo [105].

In aggiunta ai diversi tessuti adulti da cui si possono ottenere cellule staminali, anche alcuni tessuti associati alla nascita possono essere una fonte di MSC: placenta, amnios, cordone ombelicale e sangue del cordone ombelicale. Un vantaggio di questi tessuti è che sono prontamente disponibili e permettono di evitare procedure invasive. In più questi tessuti ospitano una serie di popolazioni di cellule embrionarie o premature che possono avere ulteriori proprietà biologiche rispetto alle MSC ottenute dai tessuti adulti [105]. Il sangue ottenuto da cordone ombelicale è una fonte di HSC ma i dati sul contenuto di MSC sembravano contrastanti fino a quanto Lee et al. dimostrarono che una frazione di cellule mononucleate dal sangue del cordone ombelicale conteneva cellule staminali con caratteristiche del tutto simili alle MSC derivate dal midollo osseo [106].

Sia le cellule staminali mesenchimali derivate dal midollo osseo che quelle che originano dal tessuto adiposo sono prontamente disponibili, anche se originano da nicchie di cellule staminali che forniscono segnali chimici, biochimici e meccanici diversi. Anche quando derivano dallo stesso tessuto le MSC dimostrano una grande variabilità tra donatori diversi; la salute del donatore può influenzare la disponibilità e la funzionalità delle MSC. In maniera simile, con l'aumentare dell'età del

donatore declinano anche la disponibilità di MSC, la capacità di auto-rinnovarsi e il potenziale di differenziazione [107]. Comunque, anche MSC isolate da donatori giovani e sani mostrano nette differenze nel loro tasso di proliferazione, nella capacità di differenziarsi e nell'utilità clinica e queste differenze si riscontrano anche sul versante biomolecolare. Ad esempio nello studio di Mindaye et al, su una popolazione di MSC estratte da sei donatori e analizzate con la spettroscopia di massa, solo il 62% di tutte le proteine identificate furono riscontrate in almeno la metà dei donatori e solo il 13% di queste furono trovate nelle cellule di ciascun donatore [108].

### 1.4.3. Proprietà

Una delle principali proprietà delle MSC, che è anche una condizione per definire come tale una cellula, è la capacità di **differenziarsi** in varie linee cellulari del mesoderma. La differenziazione delle MSC in osso, cartilagine e tessuto adiposo è stata descritta da molti laboratori. L'attivazione osteogenica richiede la presenza di  $\beta$ -glicerolo-fosfato, acido ascorbico 2-fosfato, desametasone e siero fetale bovino. Quando sono coltivate su un unico strato in presenza di questi fattori, le cellule staminali mesenchimali acquisiscono una morfologia osteoblastica, con aumento dell'attività della fosfatasi alcalina e deposizione di una matrice extracellulare ricca di calcio. L'aggiunta di fattori di crescita come FGF-2 porta ad un aumento del potenziale osteogenico [103].

La differenziazione adipogenica è solitamente definita come l'apparizione di cellule contenenti gocce lipidiche intracellulari. Le MSC coltivate su singolo strato con isobutil-metil-xantina diventano adipociti, con formazione di grandi vacuoli intracellulari contenenti lipidi [103]: inoltre è stato dimostrato che anche il fibroblast growth factor 2 (FGF2), i tiazolidinedioni, e il  $17\text{-}\beta$  estradiolo sono in grado di indurre la differenziazione delle MSC in adipociti [105].

Infine per quanto riguarda la differenziazione condrogenica, essa è messa in evidenza dalla comparsa nel pellet della coltura di cellule sferiche e brillanti che esprimono collagene di tipo II e sintetizzano glicosamminoglicani [105]. Questo tipo di differenziazione è resa possibile da tre condizioni: (1) formato

tridimensionale della coltura, (2) aggiunta di un medium senza siero, (3) aggiunta alla coltura di membri della superfamiglia del TGF- $\beta$  [103].

Il meccanismo attraverso il quale le MSC esercitano un effetto **anti-cicatrizzante** e **anti-fibrotico** è ancora in parte sconosciuto, anche se recentemente si è scoperto che hepatocyte growth factor (HGF) e basic fibroblast growth factor (bFGF) potrebbero essere coinvolte [109].

Le cellule staminali mesenchimali offrono **supporto** alla crescita e al differenziamento delle cellule progenitrici con cui sono messe in coltura; ad esempio esse supportano l'ematopoiesi in vitro tramite la secrezione di LIF, Sk1, Cullins, F-box proteins (SCF), IL-6, macrophage colony stimulating factor (M-CSF) e l'effetto è aumentato dalla secrezione di granulocyte colony stimulating factor (G-CSF) e granulocyte-macrophage colony stimulating factor (GM-CSF) indotta da IL-1 $\alpha$ . Altri fattori sembrano essere coinvolti in vivo, ad esempio stromal cell-derived factor-1 (SDF-1) e angiopoietina-1 [109].

La capacità di promuovere l'**angiogenesi** invece è regolata da molecole come bFGF, VEGF, placental growth factor (PIGF), MCP-1 e IL-6. Infine le MSC in coltura sono in grado di secernere diverse molecole **chemotattiche** quali CCL2 (MCP-1), CCL3, CCL4, CCL5, CCL7, CCL20, CCL26, CX3CL1, CXCL5, CXCL11, CXCL1, CXCL12, CXCL8 (IL-8), CXCL2 e CXCL10 [109].

Una ulteriore e cruciale caratteristica delle MSC è la loro abilità di **migrazione** selettiva nei siti di danno cellulare. Certe chemochine sono maggiormente implicate in questa migrazione preferenziale e dal momento che le MSC esprimono un gran numero di recettori per le chemochine e di molecole di adesione, è probabile che questi giochino un ruolo significativo anche in vivo [110]. Il trapianto di MSC umane in feti di pecora ha avuto come risultato un attecchimento a lungo termine delle cellule in vari tessuti, anche dopo lo sviluppo di immunocompetenza. Sembra anche che le MSC infuse per via endovenosa siano capaci di migrare in specifiche sedi di danno, come nel caso di fratture di osso, infarto miocardico e danno ischemico cerebrale. Il meccanismo che guida l'"homing" delle cellule staminali non è chiaro ma in uno studio Wang et al. (2002) hanno dimostrato che la chemochina MCP-1 (monocyte chemoattractant protein-1) nei tessuti cerebrali

ischemici promuoveva la migrazione di MSC infuse verso la zona danneggiata [111]. MCP-1 non è normalmente presente nel cervello sano ma la sua espressione aumenta rapidamente dopo l'occlusione dell'arteria cerebrale media nei modelli murini ed essa esercita un effetto chemiotattico nei confronti delle cellule staminali [103].

Altri studi in vitro hanno dimostrato che le MSC sono in grado di migrare verso diversi fattori di crescita e chemochine secondo un meccanismo concentrazione-dipendente e questa migrazione guidata dalle chemochine è stimolata dalla citochina TNF- $\alpha$ . Un altro meccanismo che guida l'homing è l'adesione all'endotelio danneggiato che esprime vascular cell adhesion protein (VCAM-1) ed E-selectina, a cui le MSC si legano tramite specifiche molecole di superficie [109].

Più recentemente le MSC hanno dimostrato avere anche delle **proprietà immunomodulatorie** [112]. Queste proprietà sono: (1) l'IMMUNOPRIVILEGIO e (2) l'IMMUNOSOPPRESSIONE.

*Immunoprivilegio* significa che le stesse MSC sono in qualche modo protette da meccanismi immunologici di difesa e quindi non stimolano una risposta in cellule immunitarie allogeniche [105]. Il meccanismo è ancora in gran parte sconosciuto ma sembra essere dovuto al basso grado di espressione di MHC di classe I e di MHC II. Tuttavia è stato recentemente dimostrato che lo stato di immunoprivilegio non è stabile e che la differenziazione causa il passaggio ad un fenotipo immunogenico che induce una reazione cellulare immunitaria o citotossica. In più le cellule staminali neonatali e quelle adulte mostrano un grado diverso di immunogenicità e di immunosoppressione, maggiore nelle cellule neonatali rispetto a quelle adulte [105]. Per le applicazioni cliniche delle MSC, i linfociti B sono dei target particolari poiché, mentre i linfociti T e le cellule NK sono costantemente sopresse dalle MSC, per i linfociti B i dati sono discordanti. Queste discordanze sono difficili da spiegare e possono essere dovute a diverse condizioni sperimentali. Indubbiamente c'è del vero riguardo le proprietà immunologiche mediate dalle MSC nonostante ci siano ancora dei dati contrastanti. Questo può essere dovuto alla diversità delle popolazioni delle colture primarie e al diverso tessuto di origine e alla diversa specie delle cellule [105].

Per quanto riguarda la capacità *immunosoppressiva* le MSC sono capaci di sopprimere diverse funzioni esercitate da cellule dell'immunità, come i linfociti T e B e le cellule NK. Le funzioni inibite sono la proliferazione, la produzione di fattori solubili, la citotossicità cellulare, attraverso il contatto cellula-cellula o la produzione di fattori solubili [105]. Per quanto riguarda il primo meccanismo, è descritto in letteratura che diverse molecole di superficie contribuiscono alla soppressione linfocitaria. Un meccanismo specifico di soppressione delle cellule NK è rappresentato dalla down-regolazione dei recettori che le attivano, quali CD337, CD336, CD314. Anche immunoglobuline-like transcript 2 (ILT-2) è un recettore inibitorio espresso dalle cellule NK; questa molecola lega HLA-G sulle MSC e il risultato è l'inibizione della funzionalità dei granuli litici contenuti nelle cellule NK [105]. Le MSC, inoltre, agiscono sulle cellule immunitarie tramite la produzione di molecole solubili; in particolare iNOS, indolamina 2,3-diossigenasi (IDO), PGE2 e HLA-G5 possono sopprimere la funzione dei linfociti T e cellule NK mentre la galectina-1 inibisce i linfociti T ma non le cellule NK [105]. Anche HGF e TGF- $\beta$  sembrano coinvolte nell'attività immunomodulatrice delle MSC poiché l'aggiunta delle due molecole in coltura sembra parzialmente in grado di ristabilire il pool di cellule CD2+ in presenza di MSC [112]. Estesi studi in vitro hanno dimostrato che le MSC inibiscono la produzione di IFN- $\gamma$  e di TNF- $\alpha$  e aumentano la produzione di IL-10, limitando l'espansione dei linfociti T [112]. Le MSC sembrano inibire il segnale proinfiammatorio delle cellule DC1 e promuovere il pathway antinfiammatorio delle DC2. Quando sono presenti linfociti T immaturi, le MSC interagiscono direttamente con loro per inibire lo sviluppo del signalling infiammatorio dei Th1 e delle cellule NK e promuovono lo sviluppo di linfociti Th2 e/o l'espansione dei linfociti T regolatori [102], [105]. Quando le MSC sono presenti in un ambiente proinfiammatorio alterano l'esito della risposta immunitaria, alterando il profilo di secrezione delle citochine espresse dai diversi tipi di cellule dendritiche (DC1 e 2) e di cellule T (Th1, Th2, Treg), e tutto ciò porta a una transizione verso un ambiente antinfiammatorio [102] (**Figura 2**).

Studi recenti hanno portato alla luce altri possibili mediatori degli effetti che le cellule staminali mesenchimali esercitano su altri tipi cellulari con i quali entrano in contatto. Le MSC in coltura primaria possono esibire diversi stati di attivazione

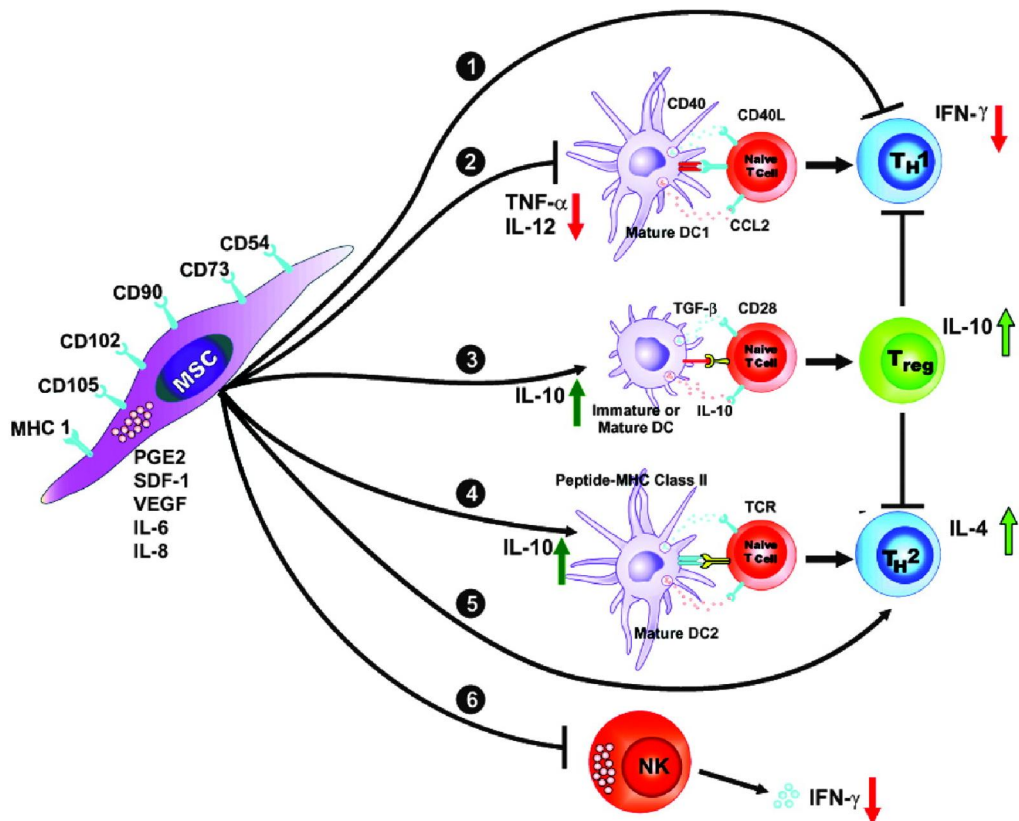
che possono essere correlati a diversi livelli di espressione di certi microRNA. Questi sono piccoli RNA non codificanti, con una lunghezza che varia dai 20 ai 22 nucleotidi, che legano sequenze specifiche sull'mRNA, reprimono la traduzione delle rispettive proteine e inducono la degradazione del complesso miRNA/mRNA. Una gran varietà di miRNA gioca un ruolo importante nel regolare i pathways di differenziazione e il destino cellulare delle MSC. Ad esempio la differenziazione verso la via osteogenica può essere bloccata da miR-125b, miR-133, miR135 e miR206 che attenuano rispettivamente l'espressione di ERBB2, RUNX2, Smad5 e connessina-43. In più le MSC possono anche rilasciare vescicole extracellulari che contengono certi pre-microRNA [105].

<b>EFFETTO</b>	<b>MOLECOLA</b>
<b>Antiapoptotico</b>	VEGF,IGF-1, HGF, Stanniocalcina-1, TGF- $\beta$ , bFGF, GM-CSF
<b>Immunomodulatorio</b>	PGE-2, TGF-b , HGF , mpCCL2 , IDO , iNOS, HLA-G5, LIF
<b>Anti-cicatrizante</b>	Bfgf, HGF, Adrenomedullina (?)
<b>Di supporto</b>	SCF , LIF, IL-6, M-CSF, SDF-1, Angiopoietina-1
<b>Angiogenico</b>	bFGF, VEGF, PIGF, MCP-1, IL-6, Molecole della matrice extracellulare
<b>Chemiotattico</b>	CCL2 , CCL3 , CCL4, CCL5 , CCL7 , CCL20 , CCL26 , CX3CL1 , CXCL5, CXCL11 ,CXCL1 , CXCL2 , CXCL8, CCL10 , CXCL12

(Riadattata da McLeod e Mauck, 2009, [107])

**Tabella 1:** Fattori secreti dalle MSC e i loro effetti





(Riadattata da Aggarwal e Pittenger, 2005, [102])

**Figura 2:** MSC e immunomodulazione

La comunicazione intercellulare è una caratteristica essenziale di tutti gli organismi multicellulari e può essere mediata attraverso il contatto diretto cellula-cellula o il trasferimento di molecole secrete. Nelle ultime due decadi è emerso un nuovo meccanismo di comunicazione extracellulare che coinvolge il trasferimento di vescicole extracellulari [113]. Nonostante sia noto da tempo che durante il fenomeno dell'apoptosi vengono rilasciati corpi apoptotici, il fatto che anche cellule perfettamente in salute condividano vescicole è stato apprezzato solo recentemente [113].

Le vescicole extracellulari sono frammenti di citoplasma circondati da un doppio strato lipidico e da proteine idrofiliche, con una struttura simile a quella della membrana plasmatica cellulare [114]. Esse possono essere classificate sulla base di dimensioni, biogenesi e composizione in microvescicole (50–1000 nm di diametro), esosomi (40-200nm) e corpi apoptotici (1-5 $\mu$ m) [115] (**Figura 3**).

Le microvescicole gemmano direttamente dalla membrana plasmatica mentre gli esosomi sono generati da un processo di invaginazione della membrana endosomiale dei corpi multivescicolari (MVB); successivamente avviene la fusione degli MVB con la plasmamembrana e ciò porta all'esocitosi e al rilascio degli esosomi [115], [116].

Molti studi in letteratura indicano che c'è una diversa espressione di molecole tra le due classi principali di EV, in particolare le microvescicole trasportano alte concentrazioni di colesterolo e fosfatidilserina anche se la loro composizione è piuttosto variabile in funzione della cellula da cui hanno origine. Gli esosomi invece mostrano molecole di superficie come Alix, CD63, CD81, CD9 e quantità minori di fosfatidilserina. Tuttavia le EV prodotte dalle cellule e rilasciate nel surnatante o nei fluidi extracellulari costituiscono una popolazione molto eterogenea ed è difficile distinguere tra esosomi e microvescicole [114].

Le EV vengono rilasciate sia in condizioni patologiche che fisiologiche da diversi tipi cellulari come cellule dendritiche, epiteliali, endoteliali e neuroni, nonché da cellule staminali embrionali e adulte e cellule tumorali [113], [116].

Le EV secrete sono un mezzo di comunicazione mediato da contatto cellula-cellula attraverso interazioni ligando-recettore e/o tramite fusione diretta con cellule

residenti, con conseguente trasferimento orizzontale di diverse proteine e di materiale genetico (mRNA e miRNA). È stato inoltre riportato che le vescicole extracellulari inducono cambiamenti fenotipici nelle cellule riceventi e generano un collegamento funzionale tra le cellule mesenchimali e i tessuti in determinate circostanze fisiologiche e patologiche [116].

Il contenuto delle vescicole extracellulari è molto eterogeneo poiché esse possono trasportare proteine, acidi nucleici, lipidi e il carico di proteine comprende sia molecole di superficie (probabilmente per mediare le interazioni intercellulari) che intra-vescicolari. Il contenuto delle EV non è solo un riflesso della composizione cellula donatrice, piuttosto è il risultato di un processo regolato ma ancora largamente incompreso [117]. Ciò che sembra essere chiaro è che il meccanismo di selezione permette di discriminare tra le molecole che devono essere incluse nel messaggio che le EV devono consegnare e quelle che invece devono esserne escluse.

La natura e la quantità del carico di molecole incluso nelle microvescicole è spesso influenzato dal tipo e dalle condizioni fisiologiche e patologiche della cellula donatrice, dallo stimolo che modula e promuove il rilascio di EV e più probabilmente dai pathways che portano alla formazione di diversi tipi di EV. Questi diversi livelli di regolazione spiegano, almeno in parte, come il messaggio possa essere finemente modulato [117].

Attraverso il trasferimento di proteine, lipidi bioattivi, mRNA e micro RNA, le microvescicole agiscono come veicoli di informazioni che possono portare a alterazione del fenotipo delle cellule riceventi. Lo scambio di informazioni tra cellule staminali e cellule tissutali danneggiate è reciproco. Il trasferimento di informazioni tessuto-specifiche dai tessuti danneggiati alle cellule staminali potrebbe riprogrammare le ultime per guadagnare caratteristiche fenotipiche e funzionali della cellula di origine. Dall' altro lato le MV rilasciate dalle cellule staminali potrebbero conferire alle cellule danneggiate un fenotipo simil-staminale con conseguente attivazione di programmi di autorigenerazione [118].

Le EV sono in grado di comunicare con il sistema immunitario e di modulare quindi l'immunità.

Il sistema immunitario può essere diviso in due rami: la risposta immunitaria innata (un sistema conservato durante l'evoluzione e comune a molti organismi multicellulari) e la risposta immunitaria adattativa, caratteristica esclusiva dei vertebrati [119].

Nell'ambito della risposta immunitaria innata, le EV sembrano agire come messaggeri paracrini, permettendo la propagazione del segnale pro-infiammatorio. D'altro canto è stato anche riportato come esse possano contribuire negativamente alla propagazione della risposta infiammatoria, attraverso il rilascio di molecole come TGF $\beta$  e altri mediatori con funzione immunosoppressiva. Tuttavia il ruolo delle EV nella regolazione della risposta immunitaria innata è complesso e non ancora del tutto compreso [120].

Laddove la risposta immunitaria innata è una difesa di prima linea contro microbi e altri insulti tissutali, la risposta immunitaria adattativa è una risposta specifica indotta dopo il riconoscimento di antigeni e seguita dall'attivazione ed espansione clonale delle cellule immunitarie che presentano recettori specifici per l'antigene riconosciuto [121].

In questo scenario le microvescicole possono agire non solo come carriers di antigeni, in quanto possono trasportare virus, batteri e componenti tumorali alle cellule presentanti l'antigene, ma anche come modulatori diretti e indiretti della presentazione dell'antigene [120].

Recentemente molti studi hanno documentato l'effetto dicotomico delle microvescicole sul sistema immunitario. Ci sono studi che hanno riportato che le EV sono in grado di promuovere la risposta immunitaria mediante il trasporto di antigeni e di citochine infiammatorie e quindi intervengono nell'infiammazione cronica e nelle malattie autoimmuni [120]. Ad esempio le EV isolate dal liquido sinoviale di pazienti con artrite reumatoide presentano livelli più elevati di TNF $\alpha$  rispetto ai controlli sani [122]. È stato inoltre recentemente dimostrato che le EV rilasciate da adipociti umani sono coinvolte in un processo infiammatorio che coinvolge a spirale adipociti e macrofagi e che potrebbe aggravare l'insulinoresistenza [116]. In aggiunta le EV rilasciate dagli osteoblasti sono un mezzo di comunicazione tra osteoblasti e osteoclasti, attraverso l'interazione

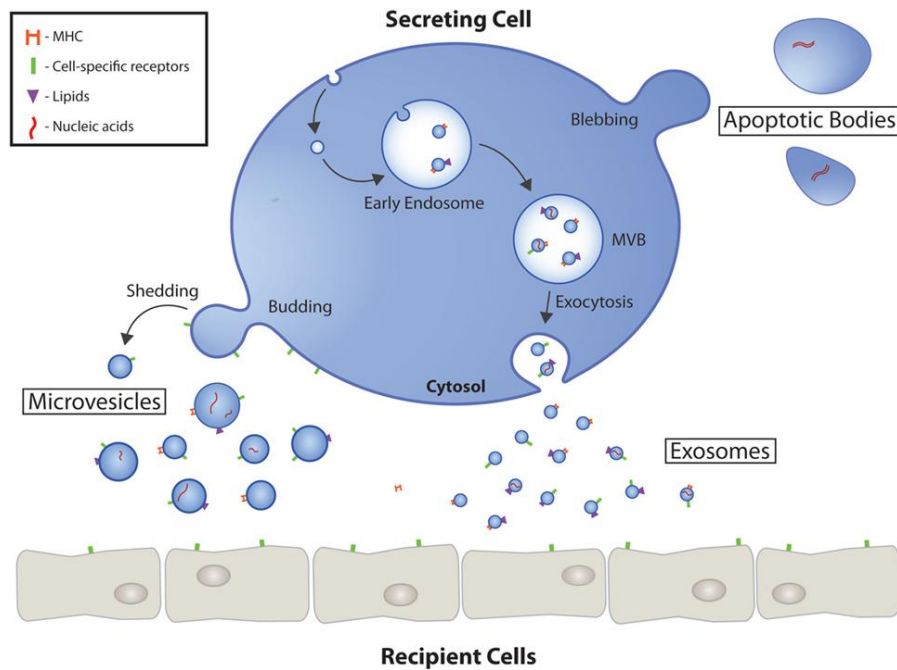
ligando-recettore, che facilita la formazione degli osteoclasti e rappresentano un nuovo meccanismo di rimodellamento osseo [123].

D'altro canto le EV possono anche avere l'effetto opposto: l'analisi delle MV isolate dalle MSC in modelli di infiammazione animali suggerisce un effetto immunosoppressivo, probabilmente attraverso il trasferimento di RNA e proteine [124]. Sebbene la funzione delle EV nella soppressione o promozione della risposta immune sia legata alla tipologia della cellula di origine, sembra che le microvescicole derivate dalle cellule staminali mesenchimali del midollo osseo abbiano un ruolo immunosoppressivo [120].

Oltre ad avere un ruolo nella regolazione della risposta immunitaria, è probabile che le EV partecipino anche alla degenerazione tissutale età-correlata, alla modulazione delle infezioni microbiche, alla patogenesi delle malattie infiammatorie e autoimmuni, all'iniziazione e alla progressione tumorale [124]. La comprensione di come funzionano le EV di diversi tipi di cellule immuni nella regolazione della risposta infiammatoria può favorire lo sviluppo di nuovi approcci terapeutici; ad esempio inibire le funzioni degli esosomi derivati da cellule tumorali potrebbe dare una riduzione del processo di metastatizzazione e fornire una migliore risposta immunitaria antitumorale. Invece, modificare la funzione delle APC o delle MSC in vivo o in vitro per facilitare il rilascio di microvescicole immunosoppressive potrebbe essere utilizzato per trattare patologie infiammatorie e autoimmuni come la graft-versus-host disease [125], [126] e facilitare i trapianti. La fattibilità e sicurezza dell'uso delle EV in clinica è stato dimostrato in diversi studi clinici utilizzando EV autologhe, derivate dal sangue o da MSC [124].

Le principali applicazioni delle MSC-EV in clinica sono state il trattamento di un gruppo di pazienti con GVHD refrattaria agli steroidi, nei quali, per evitare la comparsa di effetti collaterali inaspettati le EV sono state somministrate a dosi crescenti; i pazienti hanno riportato una riduzione significativa dei sintomi, delle dosi di steroidi utilizzate e non sono stati riportati effetti collaterali. Nassar et al nel 2016 hanno pubblicato uno studio in cui 77 pazienti affetti da malattia renale cronica da almeno 6 mesi venivano trattati con MSC-EV riportando un miglioramento dei sintomi [127].

Il vantaggio di utilizzare le MSC-EV in clinica al posto di MSC è rappresentato dal fatto che grazie alle loro dimensioni le microvescicole possono essere purificate tramite filtrazione e ciò può ridurre il rischio di contaminazione biologica e, dal momento che le EV non possono replicarsi autonomamente, non sono dotate di potenziale oncogeno. Inoltre le EV sono molto più maneggevoli e facilmente conservabili rispetto alle cellule e possono essere facilmente ottenute dal surnatante di linee cellulari in coltura [125].



(riadattata da Gustafson et al., 2017, [128])

**Figura 3:** Genesi e caratteristiche delle vescicole extracellulari

#### 1.4.4. Applicazioni terapeutiche

Il principio fondamentale della terapia cellulare staminale in vivo è che le cellule indifferenziate migrino nei siti danneggiati e si differenzino nei tipi cellulari appropriati ma ci sono ancora pochi dati circa gli specifici segnali che danno il via alla differenziazione in situ. Un'altra teoria alla base dell'applicazione clinica delle MSC è che in alcune patologie degenerative, dove c'è un danno progressivo e una incapacità alla riparazione, la popolazione di cellule staminali sia ridotta o funzionalmente alterata. In uno studio di Murphy et al. del 2002 [129] si è osservato come le MSC estratte dal midollo osseo di pazienti con osteoartrite avevano una capacità proliferativa ridotta, indipendentemente dal sito di prelievo, e anche l'attività condrogenica e adipogenica erano significativamente ridotte [103].

In termini di applicazioni cliniche ci sono 4 aree principali nelle quali le MSC sono state testate: (1) rigenerazione tissutale per cartilagine, osso, muscolo, tendine e neuroni; (2) veicolo per terapia genica; (3) aumento dell'attecchimento delle cellule staminali ematopoietiche; (4) trattamento di GVHD, artrite reumatoide, encefalomielite autoimmune sperimentale, sepsi, pancreatite acuta e sclerosi multipla.

Una delle patologie più interessanti per l'applicazione delle proprietà immunomodulatrici delle MSC è la graft-versus-host disease acuta. Le Blanc et al. (2004) riportarono il primo trattamento andato a buon fine di una forma severa di GVHD acuta refrattaria agli steroidi utilizzando MSC aploidentiche espanse in vivo [130]. La GVHD di grado IV mostrò una risposta completa dopo 2 infusioni. Questo studio fu seguito da altri con risultati positivi, utilizzando però sempre MSC non clonali e quindi che potevano contenere anche altri tipi cellulari. Lim et al. nel 2010, invece, utilizzarono MSC allogeneiche clonali, cioè ottenute da una singola cellula: queste cellule vennero testate in vivo per trattare una GVHD acuta e in 2 dei pazienti trattati ci fu un netto miglioramento [131]. Altre patologie in cui c'è stata un'applicazione in vivo delle MSC sono state il Morbo di Crohn [132], con un netto miglioramento del Crohn's disease activity index dopo 6 settimane di trattamento, anche se in alcuni pazienti ci fu un peggioramento della malattia, e la sclerosi multipla [133], in cui la somministrazione intratecale di MSC derivate dal midollo

osseo ed espanso ex vivo ha portato benefici in 10 dei pazienti trattati. Per quanto riguarda l'encefalite autoimmune sperimentale, la fibrosi polmonare e la pancreatite acuta sono stati notati dei miglioramenti in cavie trattate con MSC [88].

Il diabete mellito di tipo 1 è stato oggetto di studio per l'applicazione clinica delle MSC poiché negli ultimi anni ha notevolmente aumentato la sua prevalenza e poiché le proprietà immunomodulatrici del MSC derivate dal midollo osseo sembrano avere come target ottimale la patogenesi infiammatoria del DMT1. Una disfunzione immunitaria delle cellule e la presenza di un microambiente ricco di citochine infiammatorie portano a una disfunzione nel mantenimento della tolleranza nei confronti delle  $\beta$  cellule [110]. Le MSC si sono dimostrate attive nell'abolire in vitro la risposta proinfiammatoria dei linfociti T helper di tipo 1 alla stimolazione con GAD nel diabete di tipo 1. Le MSC inducono le cellule a produrre IL-4, suggerendo un possibile switch del signalling dei linfociti T verso un fenotipo antinfiammatorio di tipo Th2 [134]. Anche le microvescicole derivate dalle MSC possono inibire questo tipo di risposta proinfiammatoria in vitro, coinvolgendo le vie di segnale di PGE2 e di TGF- $\beta$  e stimolando la produzione di IL-10 [135].

Anche il diabete mellito di tipo 2 è una patologia per la quale, data la patogenesi infiammatoria, è stato proposto l'utilizzo delle MSC come trattamento. Jiang et al. nel 2011 mostrarono che MSC derivate dalla placenta umana erano in grado di migliorare la severità della malattia in pazienti con diabete di tipo 2 [136]; essi ricevettero tre dosi di infusioni di PD-MSK a distanza di un mese luna dall'altra con una riduzione significativa della dose media di insulina utilizzata e un aumento dei livelli di C-peptide. Inoltre 4 dei 10 pazienti presi in considerazione nello studio ridussero le dosi di insulina di più del 50% dopo il trattamento [112]. Un primo trial randomizzato sulla fattibilità e sicurezza dell'utilizzo di precursori allogenici nel trattamento del DMT2 è stato portato a termine nel 2015 da Skyler et al. Lo studio non ha riportato significativi effetti avversi (risposta immunogenica acuta contro l'HLA del donatore, reazione polmonari o del tratto respiratorio superiore e formazione di tessuto indesiderata) nei pazienti a seguito del trattamento. Per quanto riguarda l'efficacia sul controllo glicemico si è notata una riduzione dell'HbA1c del 7% in 8 pazienti su 45 (contro gli 0 pazienti sui 15 trattati con placebo) a 12 settimane di trattamento. Tuttavia la numerosità campionaria dello



studio è troppo bassa per permettere di trarre conclusione sugli effetti della terapia sul controllo glicemico [137].

### **1.5. Cellule staminali mesenchimali ottenute da tessuto adiposo (ASC)**

Come è stato prima ampiamente descritto le cellule staminali mesenchimali possono essere isolate anche da tessuti diversi dal midollo osseo, tra i quali emerge il tessuto adiposo ma non è noto se vi siano differenze di funzioni legate a questo tessuto.

Il primo lavoro che ha avuto come obiettivo quello di confermare che le cellule staminali mesenchimali sono presenti anche nel tessuto adiposo e che hanno lo stesso potenziale differenziativo di quelle derivate dal midollo osseo risale al 2001 [138]. In aggiunta, queste cellule, isolate da lipoaspirati umani, potevano essere indotte ad esprimere markers compatibili con un fenotipo neurogenico, suggerendo quindi la presenza di un potenziale ectodermico [138]. In questo studio venne anche notato che oltre alle similitudini tra le ASC e le MSC, vi erano anche delle differenze che riguardavano l'espressione delle molecole di superficie e di alcuni geni (**tabella 2**); gli autori interpretarono questi dati come una prova che il tessuto adiposo contiene delle cellule staminali distinte da quelle presenti nel midollo osseo. Tuttavia, la possibilità che le cellule isolate sul lipoaspirato siano una variante delle MSC circolanti non poteva essere esclusa [138]. Altri studi hanno dimostrato che molecole di superficie come CD34 sono presente sulle ASC ai primi passaggi ma sono assenti sulle MSC [139], [140]. Non tutte le differenze riportate in letteratura sono però valide, infatti molecole come STRO-1, una classica proteina associata alle MSC, secondo alcuni autori è presente sulle ASC mentre secondo altri risulta assente [139].

Altri studi in seguito confermarono che le cellule derivate dal tessuto adiposo (denominate PLA o processed lipoaspirate cells) avevano la stessa capacità delle MSC di differenziazione condrogenica, osteogenica e adipogenica [141] [142]. È stato anche dimostrato che in coltura, in determinate condizioni, quali la presenza di Neurobasal Medium, supplementato con B27, basic fibroblast growth factor

(bFGF), brain-derived neurotrophic factor (BDNF) ed epidermal growth factor (EGF), le cellule staminali derivate da tessuto adiposo possono dare origine a neurosfere, cioè ammassi di cellule della linea neuronale [143].

L'isolamento delle ASC è più semplice rispetto a quelle delle MSC vista la localizzazione anatomica più facilmente accessibile e l'abbondanza del tessuto adiposo sottocutaneo. Generalmente il tessuto adiposo può essere raccolto da procedure di liposuzione, lipoplastica o lipectomia. Le procedure mini-invasive hanno il vantaggio di provocare meno dolore rispetto alla classica lipectomia. Per evitare il rischio dell'anestesia generale, piccole quantità di tessuto adiposo possono essere ottenute anche con procedure di liposuzione in anestesia locale [144]. Il materiale ottenuto con le diverse metodiche viene lavato con PBS, digerito con collagenasi e centrifugato. La maggior parte del prodotto di centrifugazione contiene adipociti che possono essere lisati e morire durante il processo. Un'altra frazione ottenuta dalla centrifugazione è la SVF, che contiene una popolazione cellulare molto eterogenea: cellule del sangue, fibroblasti, periciti, cellule endoteliali e cellule staminali. A questo punto vengono lisati i globuli rossi, vengono eliminati i detriti cellulari e le cellule staminali sono messe in coltura [144].

Le ASC secernono HGF, coinvolto sia in meccanismi fisiologici che patologici, in risposta a esposizione a fattori di crescita e ad ascorbato mentre se stimulate con lipopolisaccaride producono IL-6, IL-8, M-CSF e GM-CSF [145]. Il profilo di secrezione di citochine delle ASC mostra una grande importanza nella funzionalità del tessuto adiposo e nella patologia umana. I fattori angiogenici rilasciati dalle ASC sembrano stimolare l'angiogenesi richiesta per lo sviluppo del tessuto adiposo durante lo sviluppo dell'obesità. Inoltre le citochine aumentate nell'obesità sono le stesse che sono chiamate in causa nella patogenesi delle altre componenti della sindrome metabolica, come le patologie cardiovascolari, diabete e l'ipertensione. Scoperte recenti hanno dimostrato che, oltre ai macrofagi, anche le ASC possono contribuire alla produzione di elevati livelli di citochine proinfiammatorie [145]. Inoltre è stato recentemente dimostrato che la secrezione di EV derivate dalle ASC, sotto lo stimolo di PGE<sub>2</sub>, è in grado di aumentare e potenziare l'angiogenesi [146].

I miRNA circolanti che derivano dalle cellule del tessuto adiposo sono in grado di regolare l'espressione genica in altri tessuti. In uno studio del 2017, Thomou et al. hanno valutato topi con una delezione specifica di Dicer, l'enzima che processa i miRNA. In questi topi, così come negli uomini con lipodistrofia, si verifica una riduzione dei miRNA circolanti all'interno degli esosomi. Il trapianto di adipociti bianchi ma soprattutto bruni nel tessuto adiposo di questi soggetti è in grado di ristabilire i livelli di miRNA circolanti e di migliorare la tolleranza al glucosio. Questo dimostra che il tessuto adiposo è una delle maggiori fonti di miRNA circolanti, i quali possono regolare l'espressione genica in tessuti distanti, agendo come una nuova forma di adipochine [147] .

<b>Markers</b>	<b>MSC</b>	<b>ASC</b>
<b>Positivi</b>	CD13, CD44, CD73, CD90, CD166, STRO-1	CD9, CD13, CD29, CD44, CD54, CD73, CD90, CD105, CD106, CD146, CD166, HLA-I, STRO-1
<b>Negativi</b>	CD14, CD34, CD45	CD11b, CD14, CD19, CD31, CD34, CD45, CD79 $\alpha$ , CD133, CD144, HLA-DR
<b>Referenze</b>	[148], [149]	[150], [151]

(riadattata da Hass et al., 2011 [105])

**Tabella 2:** Espressione di molecole di superficie su MSC e ASC

## **2. OBIETTIVO DELLO STUDIO**

L'obiettivo del presente studio è valutare l'effetto in vitro di vescicole extracellulari rilasciate da cellule staminali mesenchimali ottenute dal tessuto adiposo (ASC-EV) sui linfociti dei pazienti con diabete mellito di tipo 1 all'esordio e di tipo 2 di lunga durata, analizzandone gli effetti pro e antinfiammatori.

Le EV sono purificate da cellule staminali mesenchimali di tessuto adiposo attraverso ultracentrifugazione e successivamente caratterizzate.

Le cellule mononucleate del sangue periferico (PBMC) sono ottenute da 8 pazienti con diabete di tipo 1 di recente insorgenza e da 8 pazienti con diabete di tipo 2 di lunga diagnosi in terapia con metformina e vengono incubate con ASC-EV.

L'attivazione dei PBMC dopo stimolazione con l'antigene acido glutammico decarbossilasi (GAD65) e con vaccino polivalente Pentavac (PV), rispettivamente per pazienti con diabete mellito di tipo 1 e di tipo 2, è valutata analizzando il numero dei linfociti T attivati produttori IFN- $\gamma$ , mediante la metodica Enzyme-Linked ImmunoSPOT (ELISPOT) in esperimenti paralleli, con o senza ASC-EV.

Si intende valutare la produzione di citochine pro e antinfiammatorie quali IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$ , IL-6, IL-17 e TGF- $\beta$  mediante Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay (ELISA) nei surnatanti delle colture cellulari, con o senza ASC-EV, e la popolazione di linfociti T helper 17 (Th17), coinvolti nell'infiammazione, mediante analisi intracitofluorimetrica dell'IL-17.

A livello molecolare, l'espressione di TGF- $\beta$  ed il profilo di espressione del microRNA 146 saranno valutati con tecnica Real-Time-PCR quantitativa.

### **3. MATERIALI E METODI**

#### **3.1. Isolamento e caratterizzazione delle ASC-EV**

Le cellule staminali mesenchimali ottenute dal tessuto adiposo o adipose stem cells (ASC) sono state ottenute dalla Lonza (Basel, Svizzera). Le cellule sono state coltivate in MSCBM Mesenchymal Stem Cell Basal Medium (Lonza) con siero fetale bovino (FBS) al 10%. Per l'estrazione di EV sono state utilizzate cellule ASC al quarto-sesto passaggio. Le ASC sono state messe in coltura con terreno Dulbecco Modified Eagle Medium (DMEM) senza siero per 24 ore. Il surnatante delle ASC è stato centrifugato innanzitutto a 3000 giri per 30 minuti, per rimuovere i detriti cellulari, i corpi apoptotici e le vescicole più grosse, e poi ultracentrifugato a 4°C a 100000 g per 3 ore (ultracentrifuga Beckman Coulter Optima L-90K; tipo di rotore 45 Ti 45000RPM). Il pellet è stato risospeso in terreno DMEM senza siero con dimetilsolfossido (DMSO) al 1% e conservato a -80°C fino al successivo utilizzo. L'analisi di caratterizzazione delle EV (in particolare della quantità e delle dimensioni) è stata effettuata utilizzando lo strumento Nanosight che consente di visualizzare particelle di dimensioni di nanometri (Nanosight Ltd, Minton Park UK). Il Nanosight è una metodica che permette di visualizzare il movimento delle piccole particelle in sospensione liquida sotto l'effetto del moto browniano, cioè il moto disordinato delle particelle presenti in fluidi o sospensioni fluide [152]. Le ASC-EV sono state caratterizzate con l'analisi al citofluorimetro per le molecole d'adesione o per le loro molecole caratteristiche. La citofluorimetria è una metodica che permette un'analisi automatica di sospensioni cellulari monodisperse, misurando le caratteristiche citologiche e/o biochimiche all'intero di un flusso laminare che interseca una sorgente luminosa, memorizzando per ogni cellula diversi parametri, quali dimensioni, granulosità e fluorescenza. Le cellule di una popolazione eterogenea vengono aspirate dalla provetta e immerse in un sistema fluidico che tende a trasportare le cellule in maniera separata e ordinata fino al punto di misurazione. Ogni singola cellula viene attraversata da un fascio di luce che eccita i fluorocromi e determina l'emissione di un segnale fluorescente; questo segnale, passando attraverso un sistema di lenti e di filtri ottici, viene inviato ai

sensori che ne misurano l'intensità. I segnali elettrici provenienti da ogni sensore, opportunamente amplificati, vengono processati e digitalizzati e sono inviati ad un analizzatore che elabora il dato e lo visualizza tramite un grafico. I segnali di fluorescenza sono emessi da anticorpi marcati con fluorocromi specifici per antigeni presenti sulla membrana, nel citoplasma o nel nucleo.

Per poterne seguire l'internalizzazione, le vescicole extracellulari sono state colorate con il cromoforo alifatico verde fluorescente PKH67 (Sigma-Aldrich) in grado di intercalarsi nel doppio strato lipidico. Successivamente, le EV colorate sono state ultracentrifugate a 100000 g e risospese in terreno DMEM.

Per dimostrare che le EV derivate dalle ASC contenevano la frazione esosomica, le proteine CD63 e CD81, marker caratteristici degli esosomi, e le proteine tipiche delle ASC sono state rilevate all'analisi con citofluorimetro. Una sospensione di circa  $5 \times 10^{10}$  particelle/30  $\mu$ L è stata incubata per 30 minuti a 37°C con gli anticorpi. Le EV marcate con gli anticorpi sono state analizzate con il citofluorimetro (Becton Dickinson, Franklin Lakes, NJ, USA). Sono stati utilizzati i seguenti anticorpi monoclonali coniugati con ficoeritrina (PE) (1:50): anti-CD63 (Abnova), -CD81 (BD Pharmigen San Diego, CA, USA), -HLA di classe I e II (BD Pharmigen San Diego, CA, USA).

### **3.2. Isolamento dei PBMC dai pazienti diabetici e stimolazione con le ASC-EV**

Le cellule mononucleate del sangue periferico sono state ottenute e isolate tramite centrifugazione su gradiente di densità da 8 pazienti con diabete di tipo 1 di nuova insorgenza, selezionate sulla base di una risposta positiva dell'IFN- $\gamma$ , tramite stimolazione con GAD65, valutata attraverso l'analisi con ELISPOT (Enzyme Linked Immunosorbent- Spot). I PBMC sono stati ottenuti anche da 8 pazienti caucasici con diabete di tipo 2 di lunga data, trattati con metformina e con un buon controllo glicemico; i PBMC sono stati attivati tramite stimolazione con vaccino polivalente Pentavac (PV, Sanofi Pasteur, Lyon, France) (5ng/ml) ed è stata effettuata l'analisi con l'ELISPOT.

Lo studio è stato approvato dal comitato etico locale.

I PBMC freschi, seminati in una piastra a 48 pozzetti e a una densità di  $2 \times 10^6$ /ml, sono stati stimolati per 48 ore con il vaccino polivalente Pentavac (PV, Sanofi Pasteur, Lyon, France) (5ng/ml), per valutare la risposta policlonale aspecifica, o con GAD65 ricombinante umano (10  $\mu$ mol/ml). Successivamente, sono state aggiunte le ASC-EV in una concentrazione di circa  $1 \times 10^{10}$ /ml. Dopo l'incubazione con le EV, i linfociti in coltura sono stati analizzati tramite ELISPOT, analisi citofluorimetrica e Real-time-PCR quantitativa e i surnatanti prodotti sono stati analizzati tramite ELISA.

### **3.3. Internalizzazione delle ASC-EV nei PBMC e misurazione dell'espressione dei markers di attivazione**

Le ASC-EV marcate con il colorante verde fluorescente PKH67 sono state aggiunte ai PBMC in tubi sterili per la citofluorimetria per 24 ore. Successivamente l'analisi con il citofluorimetro è stata eseguita usando il cytoFLEX Flow Cytometer. Per l'analisi dei marker di attivazione i PBMC sono stati coltivati con o senza le ASC-EV (non marcate) per 48 ore. L'analisi con il citofluorimetro è stata effettuata per CD40, CD69, CD80 e CD86 (BD Pharmingen San Diego, CA, USA).

### **3.4. Estrazione di RNA e microRNA e loro profilo di espressione con Real-Time-PCR**

L'RNA totale dal campione di EV e di PBMC è stato estratto con RNAeasy kit (Qiagen), poi l'RNA è stato quantificato spettrofotometricamente (Nanodrop ND-1000, Wilmington DE). Approssimativamente 300 ng di RNA sono stati retrotrascritti in DNA complementare (cDNA) utilizzando il miScript RT Kit con HyFlex Buffer (Qiagen) che permette di analizzare sia i campioni di mRNA che di microRNA, secondo il protocollo dei produttori.

Il cDNA così ottenuto è stato utilizzato per individuare e quantificare l'RNA di interesse con la qRT-PCR utilizzando il SYBR Green PCR Kit (Qiagen, Valencia, CA, USA). Tutti i campioni sono stati analizzati in triplicato, utilizzando 3 ng di cDNA per ogni reazione come descritto nel protocollo della ditta produttrice

(Qiagen). Sono stati utilizzati primers specifici per TGF- $\beta$  e per i miR146, ricavati da PrimerBank (<http://pga.mgh.harvard.edu/primerbank/>).

### **3.5. Analisi con ELISPOT ed ELISA**

L'ELISPOT è una metodica immunologica utilizzata per valutare l'attivazione linfocitaria specifica sulla base della rilevazione di citochine espresse per numero di cellule attivate. In questo studio è stata utilizzata per valutare la produzione di IFN- $\gamma$  nei PBMC dei pazienti.

I PBMC, disposti in una piastra a 48 pozzetti a una densità di  $2 \times 10^6$ /ml sono stati stimolati per 48 ore con GAD65 umano ricombinante (Dyamid, Stoccolma, Svezia) ( $10 \mu\text{mol/l}$ ) per i pazienti con diabete di tipo 1 e con vaccino polivalente Pentavac (PV, Sanofi Pasteur, Lyone, Francia) ( $5 \mu\text{g/ml}$ ) per i pazienti con diabete di tipo 2. La produzione di IFN- $\gamma$  è stata misurata con l'ELISPOT.

L'ELISA o (enzyme-linked immunosorbent assay) è una metodica immunoistochimica che permette di rilevare la presenza di una proteina in modo diretto o indiretto, utilizzando uno o più anticorpi, ad uno dei quali è legato un enzima.

È stata effettuata l'ELISA sui surnatanti secreti dai PBMC dopo la stimolazione con le ASC-EV usando kit specifici (DuoSet ELISA Development System, R&D System, Milano, Italia) per le citochine pro e antinfiammatorie TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$ , IL-6, IL-17 e TGF- $\beta$ .



### **3.6. Analisi con citofluorimetria dei linfociti T helper 17 e delle cellule esprimenti IFN- $\gamma$ e TGF- $\beta$**

I PBMC dei pazienti diabetici sono stati stimolati per 48 ore con GAD65 o con PV e coltivati con o senza ASC-EV per analizzare i linfociti T helper 17 e le cellule positive a IFN- $\gamma$  e TGF- $\beta$ . Le cellule mononucleate del sangue periferico sono state stimolate con PMA (50 ng/ml) e ionomicina (2  $\mu$ g/ml) per tutta la notte in presenza di brefeldina A (Sigma), che ha la funzione di bloccare l'apparato del Golgi, marcate con anticorpi monoclonali anti-CD4 (Biolegend), fissate, permeabilizzate e incubate con anticorpi monoclonali anti-IL-17, anti-IFN- $\gamma$  e anti-TGF- $\beta$ .

### **3.7. Analisi statistica**

Gli spot e i livelli di citochine sono stati paragonati utilizzando il test non parametrico di Mann-Whitney. I dati sono stati analizzati utilizzando il software SPSS statistical package (SPSS, Chicago, USA), ed è stata considerata statisticamente significativa una  $p < 0,05$ .

## 4. RISULTATI

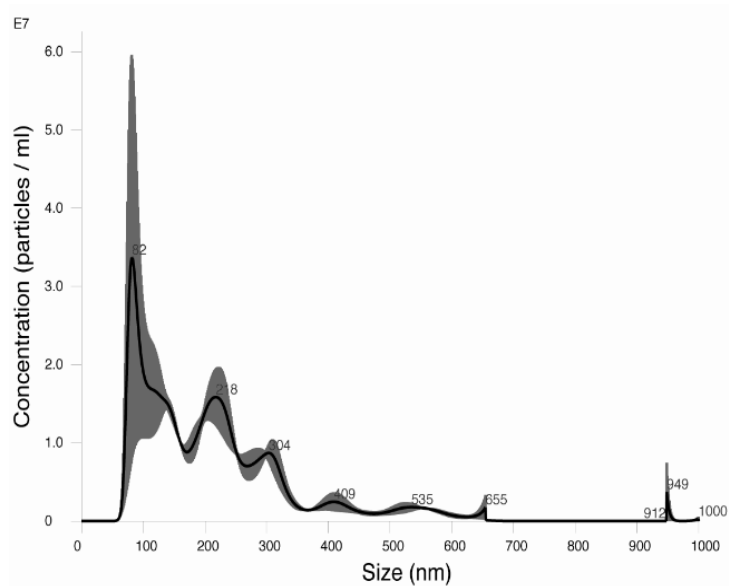
### 4.1. Caratterizzazione delle ASC-EV

La nanoparticle tracking analysis (NTA) e la microscopia elettronica hanno valutato che il diametro delle ASC-EV era compreso tra 90 e 120 nm. Il diametro medio e la distribuzione delle grandezze ha suggerito che il nostro campione di EV conteneva sia esosomi che microvescicole. La concentrazione del preparato di EV ultracentrifugate era approssimativamente di  $5 \times 10^{11}/\text{ml}$  secondo l'analisi con NTA (**figura 4A**). Questa sospensione di EV conteneva particelle che mostravano l'espressione di CD63 (media  $43,1 \pm 12$ ) e CD81 (media  $54 \pm 9$ ) secondo l'analisi con il citofluorimetro (**figure 4B e 4C**).

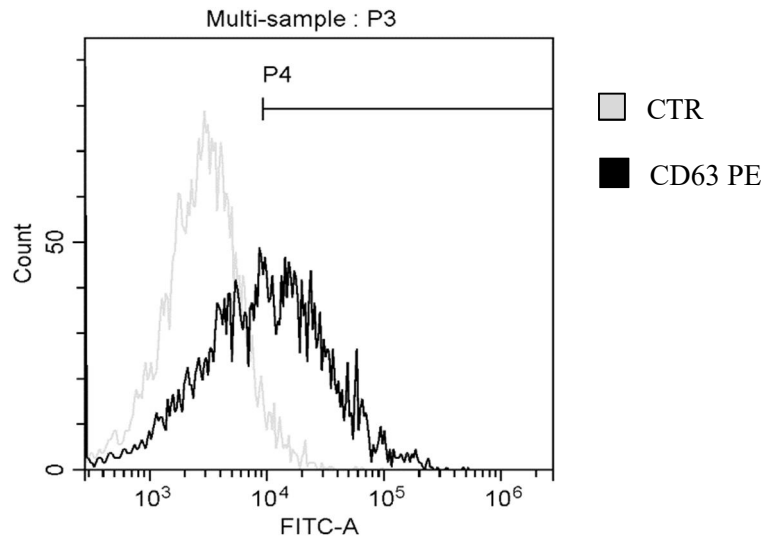
Inoltre le ASC-EV esprimevano molecole HLA di classe I ma non di classe II.

L'espressione di HLA di classe I (media  $86 \pm 2$ ) e l'assenza di HLA di classe II ( $4 \pm 1,2$ ) è stata confermata dall'analisi con citofluorimetria (**figura 4D e 4E**).

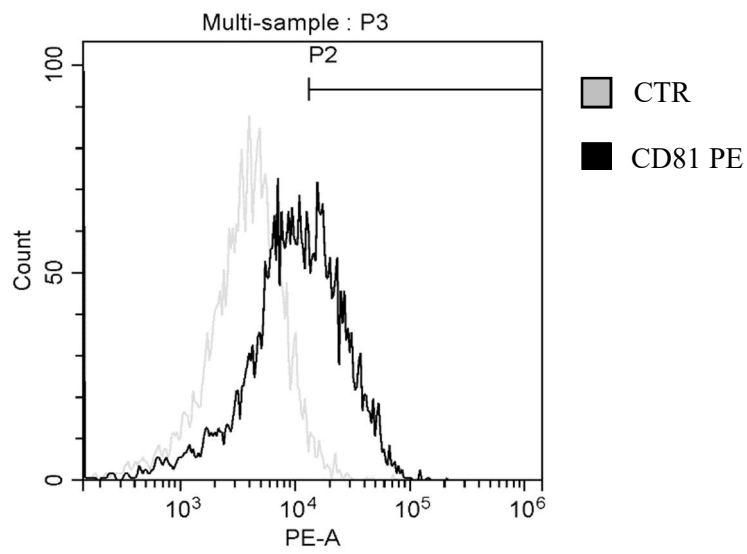
#### 4A)



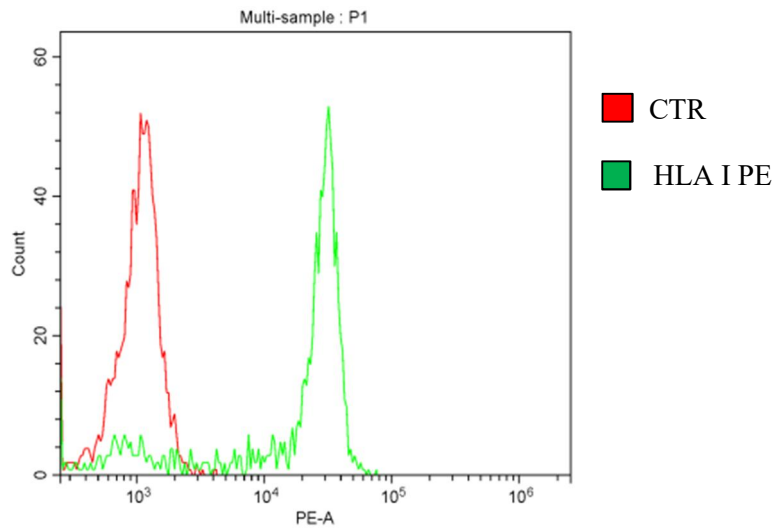
#### 4B) CD63



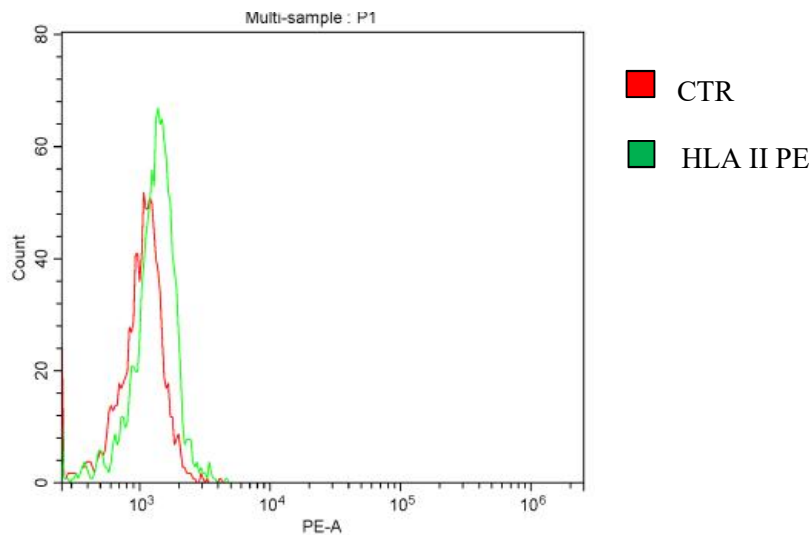
#### 4C) CD81



#### 4D) HLA DI CLASSE I



#### 4E) HLA DI CLASSE II



**Figura 4:** Caratterizzazione delle EV tramite Nanosight e analisi citofluorimetrica.

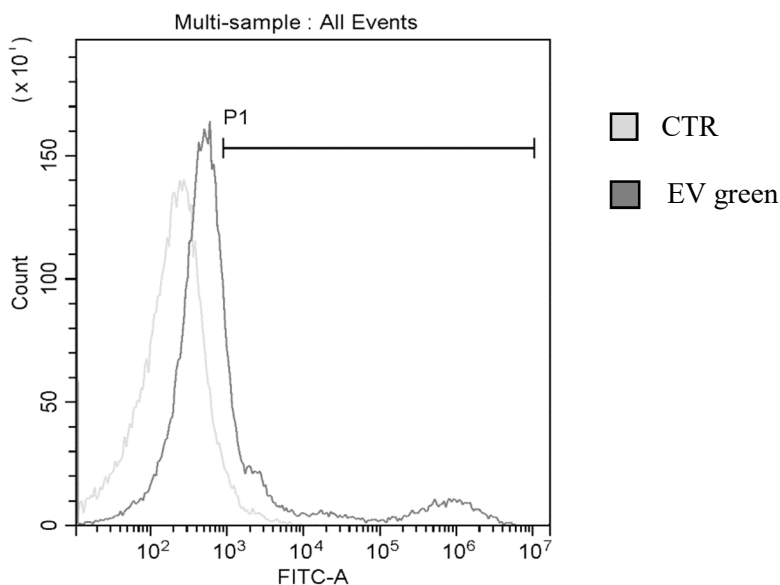
**A)** Caratterizzazione delle EV tramite Nanosight. L'analisi con il Nanosight evidenzia un diametro delle vescicole extracellulari compreso tra 90 e 120 nm.

**B-E)** Analisi citofluorimetrica. L'analisi citofluorimetrica evidenzia l'espressione delle proteine di membrana CD63 (B), CD81 (C), HLA I (D) e HLA II (E) sulle vescicole extracellulari.

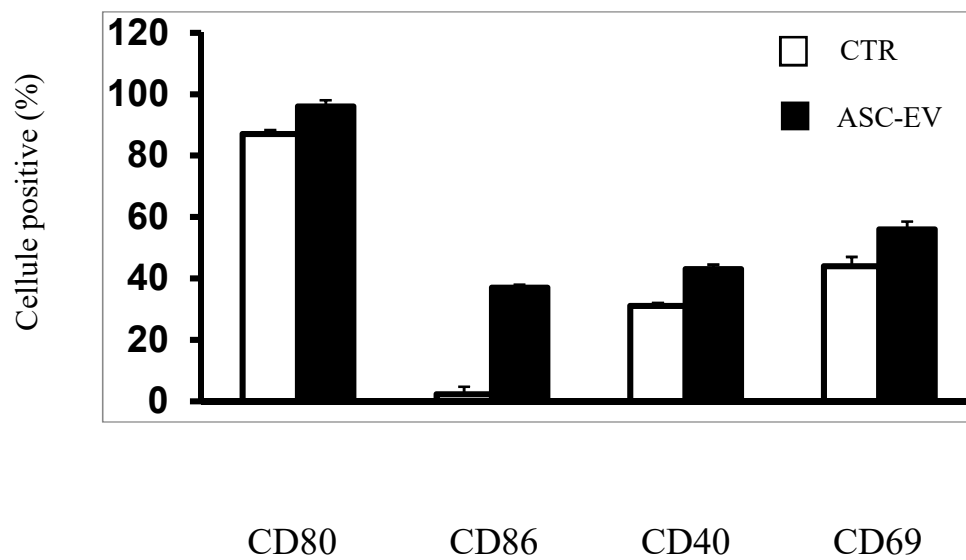
#### 4.2. Stimolazione dei PBMC con ASC-EV

L'analisi con citofluorimetria ha mostrato che le ASC-EV sono state internalizzate nei PBMC (**figura 5A**). Le ASC-EV hanno indotto un'aumentata espressione di markers di attivazione come CD40 (media senza ASC-EV  $31,5 \pm 1,3$ , media con ASC-EV  $34,5 \pm 1,7$ ,  $p < 0,05$ ), CD69 (media senza ASC-EV  $30,25 \pm 1,4$ , media con ASC-EV  $34,5 \pm 2$ ,  $p < 0,05$ ), CD80 (media senza ASC-EV  $90 \pm 2$ , media con ASC-EV  $96 \pm 1,5$ ,  $p < 0,05$ ) e CD86 (media senza ASC-EV  $5 \pm 1,6$ , media con ASC-EV  $37 \pm 1,8$ ,  $p < 0,05$ ) (**figura 5B**).

Per confermare l'effetto proinfiammatorio delle ASC-EV sui PBMC sono state valutate le citochine prodotte attraverso le analisi con l'ELISPOT e l'ELISA. Sulla base di quanto riscontrato con queste due metodiche, i PBMC hanno mostrato una maggior produzione di fattori proinfiammatori come IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$ , IL-6 e IL-17, accompagnata da una diminuzione significativa della molecola antinfiammatoria TGF $\beta$ .



**Figura 5A:** Analisi dell'internalizzazione delle EV nei PBMC tramite citofluorimetro.



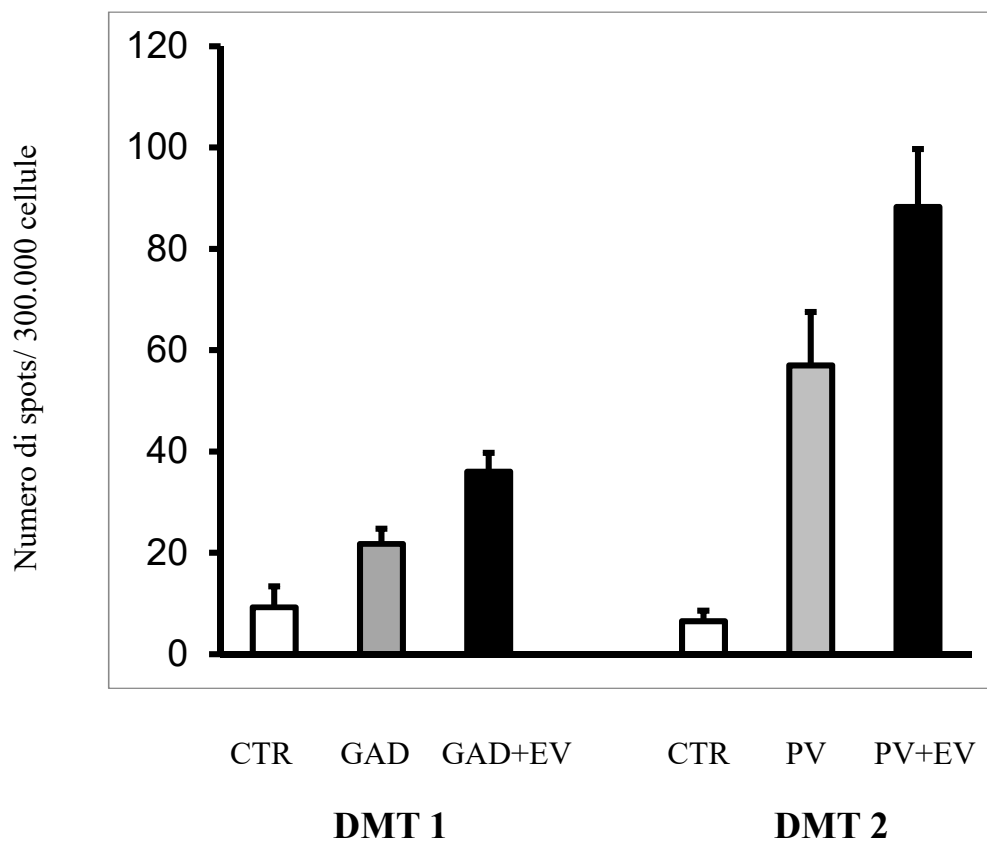
**Figura 5B:** Analisi citofluorimetrica dei PBMC.

L'analisi citofluorimetrica evidenzia l'espressione dei markers di attivazione nei PBMC trattati con ASC-EV, quali CD40, CD69, CD80, CD86.

### 4.3. Effetti delle ASC-EV sulla risposta dei linfociti T

Nei pazienti con diabete di tipo 1 le EV derivate dalle ASC hanno causato un aumento degli spots di IFN- $\gamma$  nei PBMC stimolati con GAD65 (media degli spots senza ASC-EV  $21,75 \pm 2,9$ , media degli spots con ASC-EV  $36 \pm 3,7$ ,  $p < 0,05$ ).

Nei diabetici di tipo 2 le ASC-EV hanno evidenziato un aumento degli spots dell'IFN- $\gamma$  nei PBMC stimolati con Pentavac (media degli spots senza ASC-EV  $57 \pm 10$ , media degli spots con ASC-EV  $88 \pm 11$ ,  $p < 0,05$ ) (**figura 6**).



**Figura 6:** Analisi della produzione di IFN- $\gamma$  nei PBMC tramite tecnica ELISPOT.

L'analisi con tecnica ELISPOT evidenzia un aumento di espressione dell'IFN- $\gamma$  nei PBMC stimolati con GAD65 e PV.

#### 4.4. Effetti delle ASC-EV sulla produzione di citochine

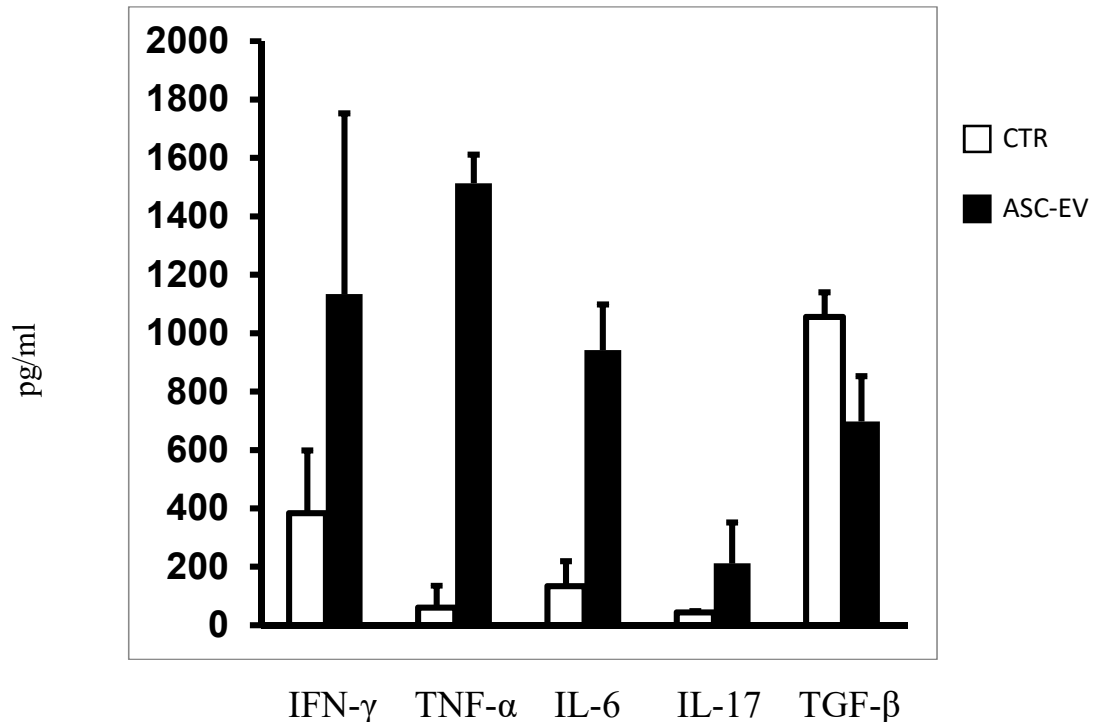
Nei PBMC ottenuti dai pazienti con diabete di tipo 1 e 2, le ASC-EV hanno causato un aumento dei livelli di IFN- $\gamma$  (media senza ASC-EV  $384 \pm 214$  pg/ml, media con ASC-EV  $1133 \pm 1243$  pg/ml,  $p < 0,05$ ), IL-6 (media senza ASC-EV  $134 \pm 280$  pg/ml, media con ASC-EV  $942 \pm 200$  pg/ml,  $p < 0,05$ ), TNF- $\alpha$  (media senza ASC-EV  $60 \pm 65$  pg/ml, media con ASC-EV  $1513 \pm 98$  pg/ml,  $p < 0,05$ ), IL-17 (media senza ASC-EV  $49,78 \pm 13$  pg/ml media con ASC-EV  $244,6 \pm 159$  pg/ml,  $p < 0,05$ ) e hanno ridotto i livelli di TGF- $\beta$  (media senza ASC-EV  $1055 \pm 85$  pg/ml, media con ASC-EV  $697 \pm 156$  pg/ml,  $p < 0,05$ ) (**figura 7A**).

I dati dell'analisi intracitofluorimetrica hanno confermato che le ASC-EV aumentano i livelli di IFN- $\gamma$  (media senza ASC-EV  $2 \pm 1,5$ , media con ASC-EV  $3,4 \pm 3,5$ ,  $p < 0,05$ ) (**figura 7B**) e riducono quelli di TGF- $\beta$  (media senza ASC-EV  $8,5 \pm 0,2$ , media con ASC-EV  $4,8 \pm 0,3$ ,  $p < 0,05$ ) (**figura 7C**).

L'espressione di TGF- $\beta$  è stata analizzata con real-time PCR. L'espressione del TGF- $\beta$  era significativamente ridotta dopo stimolazione con ASC-EV (media  $0,59 \pm 0,33$ ,  $p < 0,05$ ) (**figura 7D**). I dati ottenuti con l'ELISA hanno confermato che i livelli di espressione di TGF- $\beta$  erano significativamente più bassi dopo la stimolazione con le EV derivate dalle ASC.

Inoltre le ASC-EV hanno ridotto l'espressione del miRNA 146 (media con ASC-EV  $0,33 \pm 0,3$ ,  $p < 0,05$ ) (**figura 7E**).

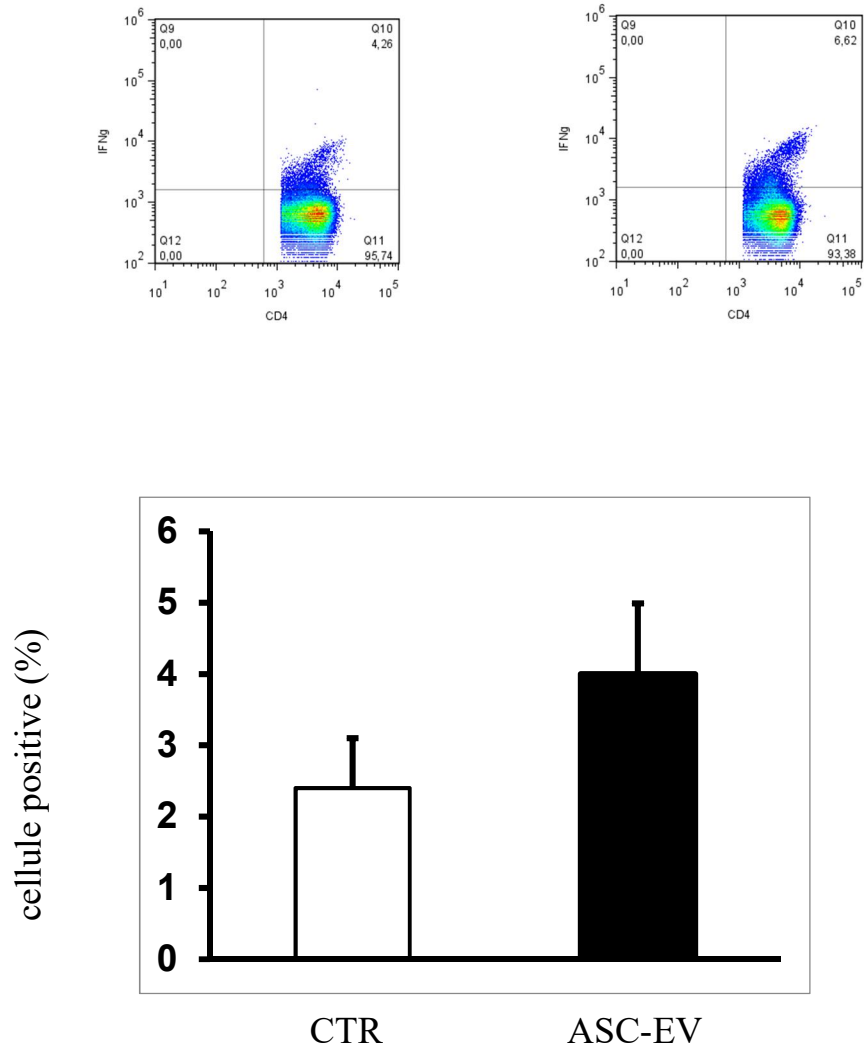




**Figura 7A:** Analisi della produzione di citochine pro e antinfiammatorie tramite tecnica ELISA.

L'analisi con tecnica ELISA evidenzia un aumento delle citochine proinfiammatorie IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$ , IL-6 e IL-17 e una riduzione della citochina antinfiammatoria TGF- $\beta$ .

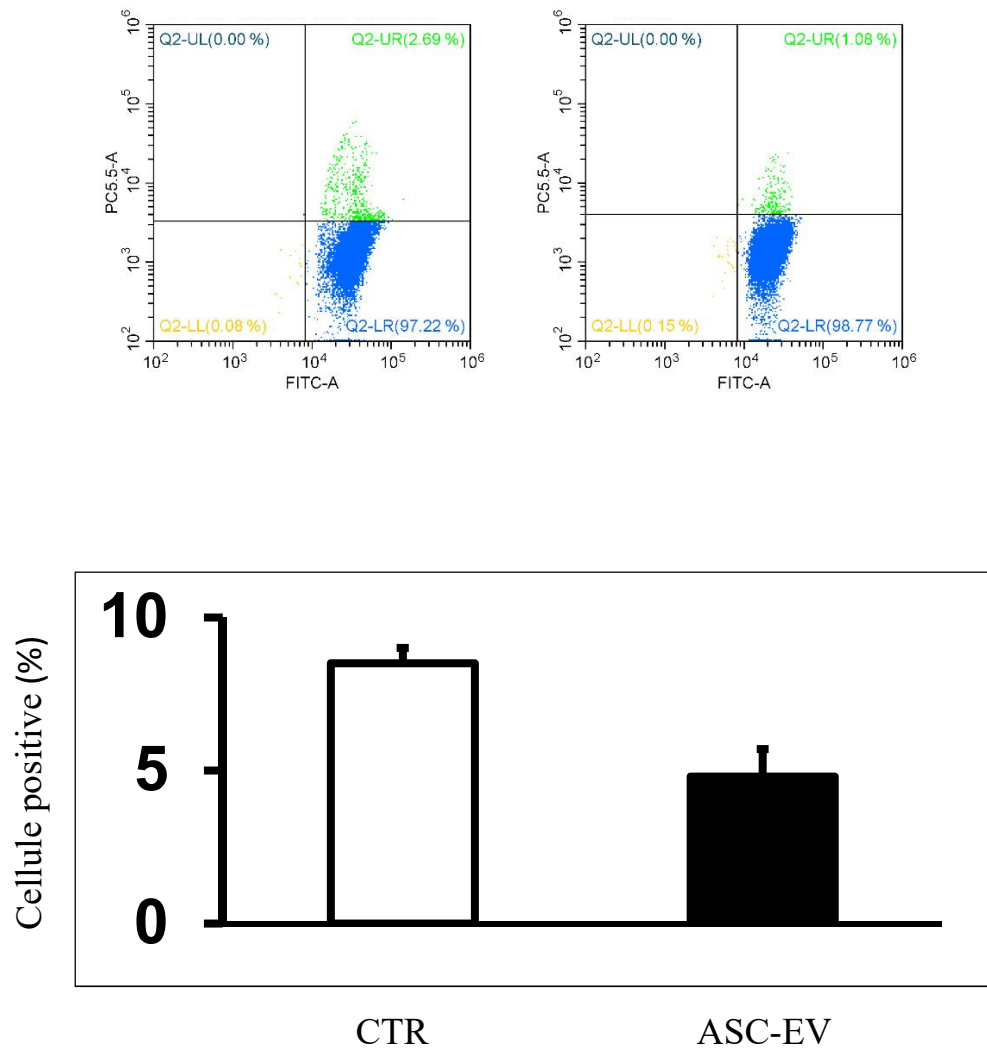
## IFN- $\gamma$ INTRACITOPLASMATICO



**Figura 7B:** Analisi intracitofluorimetrica dei PBMC stimolati con ASC-EV.

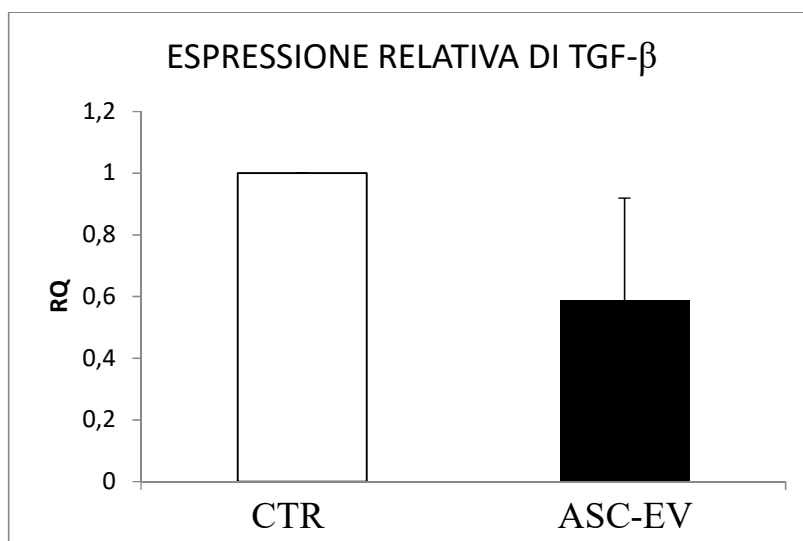
L'analisi intracitofluorimetrica evidenzia un aumento della citochina proinfiammatoria IFN- $\gamma$ .

## TGF- $\beta$ INTRACITOPLASMATICO



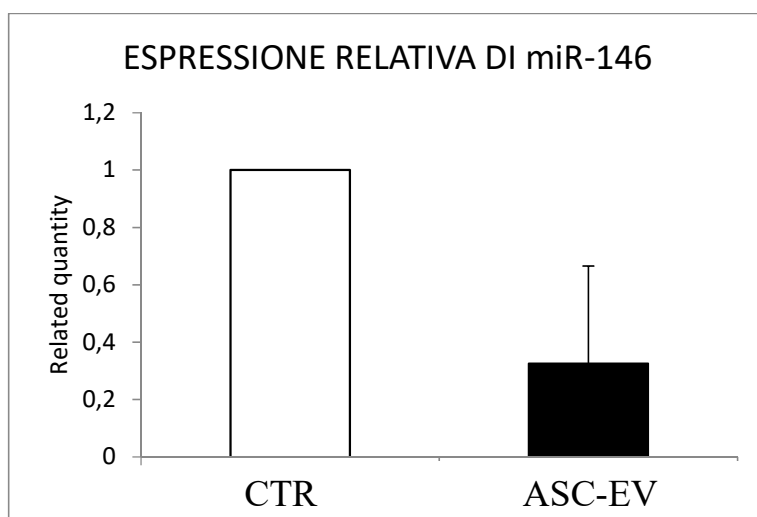
**Figura 7C:** Analisi intracitofluorimetrica dei PBMC stimolati con ASC-EV.

L'analisi intracitofluorimetrica evidenzia una riduzione della citochina antinfiammatoria TGF- $\beta$ .



**Figura 7D:** Analisi dell'espressione di TGF-β con RT-PCR.

L'analisi evidenzia una riduzione dei livelli di espressione di TGF-β.



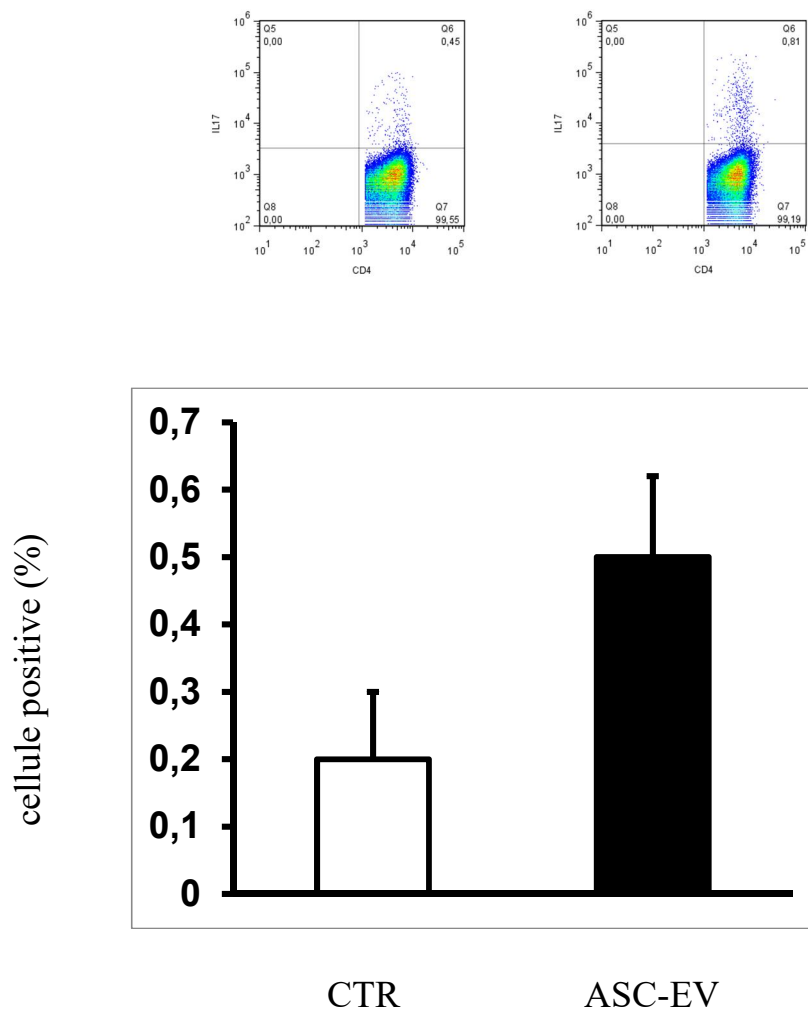
**Figura 7E:** Analisi dell'espressione di miR-146 con RT-PCR.

L'analisi evidenzia una riduzione dei livelli di espressione di miR-146.

#### 4.5. Effetti delle ASC-EV sui linfociti T helper 17

Le EV derivate dalle ASC hanno provocato un aumento della percentuale di linfociti T positivi per IL-17 (media senza ASC-EV  $0,2 \pm 0,15$ , media con ASC-EV  $0,5 \pm 0,3$ , con  $p < 0,05$ ). (figura 8).

#### IL-17 INTRACITOPLASMATICO



**Figura 8:** Analisi intracitofluorimetrica degli effetti delle ASC-EV sulla positività all'IL-17 intracitoplasmatico da parte dei PBMC.

La percentuale di linfociti Th17, positivi per IL-17, aumenta dopo trattamento con ASC-EV.

## 5. DISCUSSIONE

Il tessuto adiposo è un organo endocrino metabolicamente attivo che, oltre ad avere la funzione di stoccaggio dei grassi in eccesso, secerne ormoni, adipochine (molecole in grado di modulare la risposta infiammatoria, di regolare il bilancio energetico, il metabolismo lipidico e glicidico, l'angiogenesi e la pressione arteriosa), fattori di crescita (come TGF- $\beta$ ), proteine di fase acuta (come aptoglobina e  $\alpha$ 1 glicoproteina acida) e citochine pro e antinfiammatorie (come TNF $\alpha$ , IL-1, IL-4, IL-6, IL-8, IL-10, IL-13) [5]. Il tessuto adiposo è formato da adipociti maturi, pre-adipociti, cellule mesenchimali e da una frazione stroma-vascolare che comprende endotelio vascolare, cellule muscolari lisce, fibroblasti e diverse popolazioni di leucociti [2]. Il tessuto adiposo è anche una delle principali fonti di microRNA circolanti; questi, tramite le vescicole extracellulari, possono raggiungere siti lontani e influenzare la loro espressione genica a diversi livelli [147]. Numerosi studi hanno evidenziato come un'espansione del tessuto adiposo a seguito di un eccessivo introito calorico correli con un aumento dell'infiltrato infiammatorio, soprattutto della popolazione macrofagica, con polarizzazione dei macrofagi verso un fenotipo proinfiammatorio caratterizzato da elevati livelli di espressione di TNF- $\alpha$  e NO [39].

È noto da tempo che il tessuto adiposo e la disfunzione adipocitaria sono coinvolti nella patogenesi del diabete mellito di tipo 2 ma è stato recentemente proposto che essi giochino un ruolo importante anche nel diabete di tipo 1 [91]. In particolare essi sarebbero responsabili della perdita di tolleranza che porta all'attivazione del sistema immunitario e alla conseguente aggressione delle isole pancreatiche. Il tessuto adiposo peri-pancreatico agisce sulla funzionalità pancreatica sia attraverso effetti sistemici che tramite meccanismi paracrini. Studi prospettici sul diabete di tipo 1 hanno messo in luce come in fasi precliniche della malattia possano essere riscontrati elevati livelli di citochine proinfiammatorie come IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$  e IFN- $\gamma$ . L'IL-1 $\beta$  potrebbe essere responsabile dell'inibizione della produzione di insulina e, insieme a TNF- $\alpha$  e IFN- $\gamma$ , contribuirebbe direttamente alla morte delle  $\beta$  cellule [69].

Il tessuto adiposo contiene cellule staminali della linea mesenchimale (ASC), che potrebbero condividere con quelle derivate dal midollo osseo (MSC) le proprietà angiogeniche, di rigenerazione tissutale e di immunomodulazione [138], [141]. Tuttavia, in alcuni studi recenti, le ASC di pazienti diabetici si sono dimostrate in grado di generare un microambiente proinfiammatorio se messe in coltura con cellule mononucleate del sangue periferico (PBMC). Le ASC sono infatti in grado di portare ad uno sbilanciamento dei linfociti T verso il fenotipo Th17, con conseguente aumento della secrezione di IL-1 $\beta$ , IL-6 e IL-17 e conseguente stato di infiammazione cronica, inibizione dell'adipogenesi e della risposta periferica all'insulina [99], [153].

Le vescicole extracellulari possono essere rilasciate da diversi tessuti, tra cui il tessuto adiposo e in particolare dagli adipociti e dalle ASC, e hanno un ruolo attivo nella comunicazione intercellulare. Il loro contenuto è piuttosto eterogeneo ma in generale comprende proteine di membrana o intracitoplasmatiche, lipidi, RNA e miRNA, selezionati con un processo finemente regolato ma ancora in parte sconosciuto [117]. Le EV possono quindi agire su cellule e tessuti lontani da quelli di origine e possono andare ad influenzarne il fenotipo. Esse possono avere anche un effetto di immunomodulazione a livello dei tessuti bersaglio e sembrano in grado di agire in maniera dicotomica sul sistema immunitario, promuovendo o inibendo la risposta immune. Il tipo di effetto esercitato varia a seconda del tipo di cellula da cui vengono rilasciate e dalle condizioni del microambiente in cui esse si trovano [120].

L'infiammazione ha un ruolo centrale nella patogenesi sia del diabete mellito di tipo 1 che, come è stato recentemente messo in evidenza, del diabete mellito di tipo 2. Essa contribuisce all'esaurimento della funzione  $\beta$  cellulare e agisce negativamente sui tessuti sensibili all'insulina.

È da tempo risaputo che nella patogenesi del diabete di tipo 1 sono coinvolte sia l'immunità cellulare che quella umorale. L'infiltrato infiammatorio presente nel pancreas di soggetti affetti dalla patologia dà origine al quadro anatomopatologico noto come "insulite" ed è composto da diverse cellule dell'immunità innata e adattativa, soprattutto macrofagi, linfociti B e linfociti T CD4+ e CD8+ produttori

di IL-1, TNF- $\alpha$ , MCP-1, mentre vi è una riduzione del numero di cellule produttrici di citochine antinfiammatorie come IL-10 [84]. Anche l'attivazione dei TLR sui macrofagi e sulle cellule dell'immunità innata porta alla produzione di IL-1, TNF- $\alpha$  e IFN- $\gamma$  che causano la morte delle  $\beta$  cellule [86].

La presenza di autoanticorpi circolanti diretti contro antigeni insulari (anticorpi ICA, GADA, IA-2A, IAA, ZnT8A) depone per un coinvolgimento dell'immunità umorale nel DMT1; tuttavia il ruolo dei linfociti B è ancora oggetto di dibattito e si pensa che essi si attivino in un secondo momento, successivamente all'attivazione dell'immunità cellulare [59], [64].

Il diabete di tipo 2, invece, ha una eziopatogenesi differente e il fenotipo del paziente è molto diverso da quello del diabetico di tipo 1. Non si tratta di una patologia autoimmune, mentre vi è una stretta correlazione con l'obesità e con la sindrome metabolica. Recentemente è stato evidenziato che anche nel diabete di tipo 2 è presente un quadro infiammatorio, con attivazione dell'immunità innata e adattativa, soprattutto correlata all'espansione del tessuto adiposo nel quadro clinico dell'obesità [72], [92].

Le evidenze di un'attivazione dei meccanismi infiammatori nel diabete mellito di tipo 2 sono supportate innanzitutto da un aumento delle proteine di fase acuta in circolo e poi dalla presenza di segni di flogosi a livello pancreatico e dei tessuti sensibili all'azione dell'insulina [92].

A livello pancreatico sono stati riscontrati depositi di amiloide, fibrosi e presenza di citochine proinfiammatorie come IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-11 e IL-33 e chemochine quali IL-8, CCL2, CCL11 e CCL33 [94]. Nel tessuto adiposo invece, oltre ai macrofagi produttori di TNF- $\alpha$  e NO, si riscontrano altre cellule immunitarie come linfociti Th1 CD4+ e linfociti T CD8+, che producono IFN- $\gamma$ , IL-17 e IL-22 [92].

Il presente studio ha valutato gli effetti di vescicole extracellulari derivate dalle ASC sulle cellule mononucleate del sangue periferico ottenute da pazienti con diabete di tipo 1 e di tipo 2. I risultati ottenuti hanno evidenziato un aumento dell'attivazione dei linfociti T e della produzione di citochine proinfiammatorie nelle cellule trattate con ASC-EV.



Le EV derivate dalle ASC, dopo essere internalizzate dai PBMC, come dimostrato tramite analisi citofluorimetrica, sono state in grado di alterare il profilo di secrezione delle citochine nei PBMC portando alla produzione di citochine proinfiammatorie.

Dall'analisi effettuata tramite tecnica ELISPOT è stato evidenziato che la produzione di IFN- $\gamma$  aumenta in conseguenza della stimolazione dei linfociti T con le ASC-EV rispetto alla sola attivazione con GAD65 e con Pentavac.

L'analisi con la metodica ELISA ha inoltre permesso di valutare che nel surnatante delle cellule mononucleate del sangue periferico, messe in coltura con le ASC-EV, si evidenzia una aumentata produzione delle citochine proinfiammatorie IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$ , IL-6 e IL-17. Come riportato precedentemente, IFN- $\gamma$  e TNF- $\alpha$  sono i mediatori, prodotti dai linfociti T CD4+, responsabili della distruzione delle  $\beta$  cellule pancreatiche che si verifica nel contesto del DMT1 [87]. TNF- $\alpha$  è stata la prima citochina i cui livelli sono stati correlati con l'obesità e l'insorgenza di insulinoresistenza: la produzione di TNF dalle cellule adipose dei topi obesi fornì la prima evidenza del coinvolgimento dell'infiammazione tissutale nello sviluppo dell' insulinoresistenza [35]. La concentrazione di IL-6 è correlata all'obesità e all'incidenza di DMT2 nei soggetti predisposti; la produzione epatica e adipocitaria di IL-6 sembra promuovere l'insulinoresistenza mentre il suo ruolo è più controverso nel DMT1 [89]. Infine l'obesità sembra promuovere l'espansione dei linfociti T produttori di IL-17 nel tessuto adiposo sia murino che umano. La citochina e i linfociti che la producono risultano aumentati anche nel DMT1 [90].

L'effetto protettivo di TGF- $\beta$  è stato dimostrato in diverse patologie autoimmuni, tra cui il DMT1 [154] [155]; in precedenti esperimenti su pazienti con diabete mellito di tipo 1, le MSC-EV si sono dimostrate capaci di aumentare la produzione della citochina antinfiammatoria TGF- $\beta$  da parte dei PBMC [135]. Nel presente studio, invece, la citochina antinfiammatoria TGF- $\beta$  risulta significativamente ridotta nei PBMC trattati con ASC-EV rispetto ai controlli. Tali risultati sono stati confermati tramite real-time-PCR quantitativa.

La produzione delle citochine IFN- $\gamma$  e TGF- $\beta$  è stata valutata anche con analisi intracitofluorimetrica. Questa metodica ha confermato un aumento dei livelli di

IFN- $\gamma$  e una riduzione di quelli di TGF- $\beta$  all'interno dei PBMC stimolati con ASC-EV.

Una sottopopolazione di cellule dell'immunità adattativa di cui recentemente è stata compresa l'importanza nella patogenesi del diabete è quella dei linfociti Th17 [99], [153]. Queste cellule sono responsabili della produzione di IL-17 nei linfonodi peripancreatici dei soggetti con diabete di tipo 1, in seguito a esposizione ad antigeni specifici come GAD65, ma ciò non avviene nei soggetti sani [90]. Nel diabete di tipo 2, invece, i macrofagi di tipo M1 (tramite produzione di IL-1 $\beta$ , IL-6 e IL-13) e le ASC sono i responsabili della polarizzazione linfocitaria verso il fenotipo Th17 [99]. I linfociti Th17 producono IL-17 e una dimostrazione del coinvolgimento di queste cellule nella perdita della sensibilità periferica all'insulina è data dal fatto che i livelli di IL-17R sono aumentati nel fegato e nei muscoli nell'insulinoresistenza e il blocco dell'IL-17 nel quadro della NASH riduce la flogosi epatica [99]. Nel presente studio, le vescicole extracellulari derivate dalle ASC sono state in grado di orientare i linfociti T verso il fenotipo Th17 con aumentata produzione di IL-17, come è stato dimostrato dall'analisi intracitofluorimetrica.

Infine, per quanto riguarda le indagini di biologia molecolare, è stato valutato il profilo di espressione di miR-146. Diversi studi hanno dimostrato che miR146 ha un ruolo critico nella regolazione di varie cellule dell'immunità innata e previene lo sviluppo della risposta infiammatoria mantenendo una condizione di omeostasi cellulare [155]. I livelli di miR-146 sono significativamente ridotti in pazienti con diabete di tipo 2 ma una sua riduzione è stata riscontrata anche in pazienti con diabete di tipo 1 [157], [158]. miR-146 riduce l'attività di NF- $\kappa$ B e sopprime i geni target di questa molecola, come IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-8 e TNF- $\alpha$ , e inibisce l'espressione di interleukin-1 associated kinase 1 (IRAK1) e TNF receptor-associated factor 6 (TRAF6) [159]. Una riduzione dei livelli di miR-146 sembra inoltre essere correlata allo sviluppo della neuropatia diabetica [160], [161] e della nefropatia diabetica [162], mentre una sua somministrazione in sede intravitreale sembra ridurre l'insorgenza di complicanze micro e macrovascolari in modelli murini [163]. Nel presente studio l'espressione di miR-146 è stata valutata con qRT-PCR e si è

osservata una riduzione dei suoi livelli di espressione nei PBMC di pazienti con diabete mellito di tipo 1 e di tipo 2.

## 6. CONCLUSIONI

Il diabete mellito di tipo 1 e il diabete mellito di tipo 2 sono patologie ad eziopatogenesi diversa ma che condividono tra loro alcuni aspetti, tra cui la presenza di infiammazione cronica e il contributo della disfunzione adipocitaria alla patogenesi della malattia. Le cellule staminali mesenchimali del tessuto adiposo sono una popolazione di cellule staminali adulte che condividono con le cellule staminali mesenchimali derivate dal midollo osseo alcune caratteristiche, tra cui la capacità di differenziarsi nelle linee cellulari osteogenica, condrogenica e adipogenica, se sottoposte a determinati stimoli, e la capacità di giungere nelle sedi di danno cellulare. Le ASC come le MSC comunicano con le altre cellule sia direttamente, tramite contatto cellula-cellula, che con meccanismi paracrini come il rilascio di vescicole extracellulari. Alcuni studi hanno dimostrato che le ASC condividono con la controparte midollare la proprietà esercitare effetti antinfiammatori su vari tipi cellulari mentre altri studi recenti hanno mostrato che le microvescicole derivate dalle cellule mesenchimali del tessuto adiposo orientano i linfociti T con cui sono messe in coltura verso un fenotipo proinfiammatorio, produttore di IL-17. In linea con tali evidenze scientifiche, il presente studio ha evidenziato come le ASC-EV attivino le cellule mononucleate del sangue periferico con le quali sono messe in coltura, le inducano a esprimere citochine proinfiammatorie e le stimolino ad assumere un fenotipo Th17. Si è evidenziato inoltre come l'espressione dei microRNA possa essere alterata nei PBMC dei pazienti diabetici trattati con ASC-EV; in particolare i livelli di miR-146 risultano ridotti.

Tali dati potrebbero aprire nuove linee di ricerca sul ruolo del tessuto adiposo e dei precursori adipocitari in esso contenuti nella patogenesi del diabete e sulla valutazione degli effetti delle ASC e delle EV da esse derivate nella terapia cellulare del diabete.

## 7. BIBLIOGRAFIA

- [1] A. Cignarelli, V. A. Genchi, S. Perrini, N. Natalicchio, L. Laviola, e F. Giorgino, «Tessuto adiposo, obesità e diabete», *Il Diabete Online Soc. Ital. Diabetol. Rassegna*, vol. 29, mar. 2017.
- [2] P. Mancuso, «The role of adipokines in chronic inflammation», *ImmunoTargets Ther.*, vol. 5, pag. 47, 2016.
- [3] R. N. Bergman *et al.*, «Central role of the adipocyte in the metabolic syndrome», *J. Investig. Med. Off. Publ. Am. Fed. Clin. Res.*, vol. 49, n. 1, pagg. 119–126, gen. 2001.
- [4] T. McLaughlin, C. Lamendola, A. Liu, e F. Abbasi, «Preferential fat deposition in subcutaneous versus visceral depots is associated with insulin sensitivity», *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, vol. 96, n. 11, pagg. E1756-1760, nov. 2011.
- [5] M. Esteve Ràfols, «Adipose tissue: cell heterogeneity and functional diversity», *Endocrinol. Nutr. Organo Soc. Espanola Endocrinol. Nutr.*, vol. 61, n. 2, pagg. 100–112, feb. 2014.
- [6] S. Cinti, «The adipose organ at a glance», *Dis. Model. Mech.*, vol. 5, n. 5, pagg. 588–594, set. 2012.
- [7] C. H. Saely, K. Geiger, e H. Drexel, «Brown versus white adipose tissue: a mini-review», *Gerontology*, vol. 58, n. 1, pagg. 15–23, 2012.
- [8] P. Trayhurn, «Hypoxia and adipose tissue function and dysfunction in obesity», *Physiol. Rev.*, vol. 93, n. 1, pagg. 1–21, gen. 2013.
- [9] B. M. Spiegelman e J. S. Flier, «Obesity and the regulation of energy balance», *Cell*, vol. 104, n. 4, pagg. 531–543, feb. 2001.
- [10] J. Wu *et al.*, «Beige adipocytes are a distinct type of thermogenic fat cell in mouse and human», *Cell*, vol. 150, n. 2, pagg. 366–376, lug. 2012.
- [11] A. M. Cypess *et al.*, «Anatomical localization, gene expression profiling and functional characterization of adult human neck brown fat», *Nat. Med.*, vol. 19, n. 5, pagg. 635–639, mag. 2013.
- [12] H. Kwon e J. E. Pessin, «Adipokines mediate inflammation and insulin resistance», *Front. Endocrinol.*, vol. 4, pag. 71, 2013.
- [13] S. Galic, J. S. Oakhill, e G. R. Steinberg, «Adipose tissue as an endocrine organ», *Mol. Cell. Endocrinol.*, vol. 316, n. 2, pagg. 129–139, mar. 2010.
- [14] N. Kubota *et al.*, «Adiponectin stimulates AMP-activated protein kinase in the hypothalamus and increases food intake», *Cell Metab.*, vol. 6, n. 1, pagg. 55–68, lug. 2007.
- [15] K. Smitka e D. Marešová, «Adipose Tissue as an Endocrine Organ: An Update on Pro-inflammatory and Anti-inflammatory Microenvironment», *Prague Med. Rep.*, vol. 116, n. 2, pagg. 87–111, 2015.
- [16] B. K. Tan, R. Adya, e H. S. Randeva, «Omentin: a novel link between inflammation, diabetes, and cardiovascular disease», *Trends Cardiovasc. Med.*, vol. 20, n. 5, pagg. 143–148, lug. 2010.
- [17] H. Tilg e A. R. Moschen, «Adipocytokines: mediators linking adipose tissue, inflammation and immunity», *Nat. Rev. Immunol.*, vol. 6, n. 10, pagg. 772–783, ott. 2006.
- [18] J. Ye, «Emerging role of adipose tissue hypoxia in obesity and insulin resistance», *Int. J. Obes. 2005*, vol. 33, n. 1, pagg. 54–66, gen. 2009.
- [19] U. Smith e B. B. Kahn, «Adipose tissue regulates insulin sensitivity: role of adipogenesis, de novo lipogenesis and novel lipids», *J. Intern. Med.*, vol. 280, n. 5, pagg. 465–475, 2016.

- [20] M. Coelho, T. Oliveira, e R. Fernandes, «Biochemistry of adipose tissue: an endocrine organ», *Arch. Med. Sci. AMS*, vol. 9, n. 2, pagg. 191–200, apr. 2013.
- [21] C. Arroyo-Johnson e K. D. Mincey, «Obesity Epidemiology Worldwide», *Gastroenterol. Clin. North Am.*, vol. 45, n. 4, pagg. 571–579, 2016.
- [22] U. J. Jung e M.-S. Choi, «Obesity and its metabolic complications: the role of adipokines and the relationship between obesity, inflammation, insulin resistance, dyslipidemia and nonalcoholic fatty liver disease», *Int. J. Mol. Sci.*, vol. 15, n. 4, pagg. 6184–6223, apr. 2014.
- [23] Y. Zheng, S. H. Ley, e F. B. Hu, «Global aetiology and epidemiology of type 2 diabetes mellitus and its complications», *Nat. Rev. Endocrinol.*, vol. 14, n. 2, pagg. 88–98, feb. 2018.
- [24] A. Tchernof e J.-P. Després, «Pathophysiology of human visceral obesity: an update», *Physiol. Rev.*, vol. 93, n. 1, pagg. 359–404, gen. 2013.
- [25] K. Sun, C. M. Kusminski, e P. E. Scherer, «Adipose tissue remodeling and obesity», *J. Clin. Invest.*, vol. 121, n. 6, pagg. 2094–2101, giu. 2011.
- [26] C. J. Lavie, A. De Schutter, e R. V. Milani, «Healthy obese versus unhealthy lean: the obesity paradox», *Nat. Rev. Endocrinol.*, vol. 11, n. 1, pagg. 55–62, gen. 2015.
- [27] C. K. Kramer, B. Zinman, e R. Retnakaran, «Are metabolically healthy overweight and obesity benign conditions?: A systematic review and meta-analysis», *Ann. Intern. Med.*, vol. 159, n. 11, pagg. 758–769, dic. 2013.
- [28] K. L. Spalding *et al.*, «Dynamics of fat cell turnover in humans», *Nature*, vol. 453, n. 7196, pagg. 783–787, giu. 2008.
- [29] E. D. Rosen, C. J. Walkey, P. Puigserver, e B. M. Spiegelman, «Transcriptional regulation of adipogenesis», *Genes Dev.*, vol. 14, n. 11, pagg. 1293–1307, giu. 2000.
- [30] J. M. Stephens, «The fat controller: adipocyte development», *PLoS Biol.*, vol. 10, n. 11, pag. e1001436, 2012.
- [31] Z. Wang e W. E. Hoy, «Waist circumference, body mass index, hip circumference and waist-to-hip ratio as predictors of cardiovascular disease in Aboriginal people», *Eur. J. Clin. Nutr.*, vol. 58, n. 6, pagg. 888–893, giu. 2004.
- [32] B. Balkau *et al.*, «International Day for the Evaluation of Abdominal Obesity (IDEA): a study of waist circumference, cardiovascular disease, and diabetes mellitus in 168,000 primary care patients in 63 countries», *Circulation*, vol. 116, n. 17, pagg. 1942–1951, ott. 2007.
- [33] E. J. Boyko, W. Y. Fujimoto, D. L. Leonetti, e L. Newell-Morris, «Visceral adiposity and risk of type 2 diabetes: a prospective study among Japanese Americans», *Diabetes Care*, vol. 23, n. 4, pagg. 465–471, apr. 2000.
- [34] J. Ye, «Mechanisms of insulin resistance in obesity», *Front. Med.*, vol. 7, n. 1, pagg. 14–24, mar. 2013.
- [35] G. S. Hotamisligil, N. S. Shargill, e B. M. Spiegelman, «Adipose expression of tumor necrosis factor-alpha: direct role in obesity-linked insulin resistance», *Science*, vol. 259, n. 5091, pagg. 87–91, gen. 1993.
- [36] K. A. Wichterman, I. H. Chaudry, e A. E. Baue, «Studies of peripheral glucose uptake during sepsis», *Arch. Surg. Chic. Ill 1960*, vol. 114, n. 6, pagg. 740–745, giu. 1979.
- [37] M. Zeyda e T. M. Stulnig, «Obesity, inflammation, and insulin resistance--a mini-review», *Gerontology*, vol. 55, n. 4, pagg. 379–386, 2009.
- [38] K. A. Harford, C. M. Reynolds, F. C. McGillicuddy, e H. M. Roche, «Fats, inflammation and insulin resistance: insights to the role of macrophage and T-cell accumulation in adipose tissue», *Proc. Nutr. Soc.*, vol. 70, n. 4, pagg. 408–417, nov. 2011.

- [39] B.-C. Lee e J. Lee, «Cellular and molecular players in adipose tissue inflammation in the development of obesity-induced insulin resistance», *Biochim. Biophys. Acta*, vol. 1842, n. 3, pagg. 446–462, mar. 2014.
- [40] T. Suganami e Y. Ogawa, «Adipose tissue macrophages: their role in adipose tissue remodeling», *J. Leukoc. Biol.*, vol. 88, n. 1, pagg. 33–39, lug. 2010.
- [41] I. Wernstedt Asterholm *et al.*, «Adipocyte inflammation is essential for healthy adipose tissue expansion and remodeling», *Cell Metab.*, vol. 20, n. 1, pagg. 103–118, lug. 2014.
- [42] Y. Bai e Q. Sun, «Macrophage recruitment in obese adipose tissue», *Obes. Rev. Off. J. Int. Assoc. Study Obes.*, vol. 16, n. 2, pagg. 127–136, feb. 2015.
- [43] C. Buechler, S. Krautbauer, e K. Eisinger, «Adipose tissue fibrosis», *World J. Diabetes*, vol. 6, n. 4, pagg. 548–553, mag. 2015.
- [44] T. Khan *et al.*, «Metabolic dysregulation and adipose tissue fibrosis: role of collagen VI», *Mol. Cell. Biol.*, vol. 29, n. 6, pagg. 1575–1591, mar. 2009.
- [45] J. Ye, Z. Gao, J. Yin, e Q. He, «Hypoxia is a potential risk factor for chronic inflammation and adiponectin reduction in adipose tissue of ob/ob and dietary obese mice», *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.*, vol. 293, n. 4, pagg. E1118–1128, ott. 2007.
- [46] M. Stumvoll, B. J. Goldstein, e T. W. van Haeften, «Type 2 diabetes: principles of pathogenesis and therapy», *Lancet Lond. Engl.*, vol. 365, n. 9467, pagg. 1333–1346, apr. 2005.
- [47] S. Corvera e O. Gealekman, «Adipose tissue angiogenesis: impact on obesity and type-2 diabetes», *Biochim. Biophys. Acta*, vol. 1842, n. 3, pagg. 463–472, mar. 2014.
- [48] I. S. Wood, F. P. de Heredia, B. Wang, e P. Trayhurn, «Cellular hypoxia and adipose tissue dysfunction in obesity», *Proc. Nutr. Soc.*, vol. 68, n. 4, pagg. 370–377, nov. 2009.
- [49] O.-K. Kim, W. Jun, e J. Lee, «Mechanism of ER Stress and Inflammation for Hepatic Insulin Resistance in Obesity», *Ann. Nutr. Metab.*, vol. 67, n. 4, pagg. 218–227, 2015.
- [50] I. Gabriely *et al.*, «Removal of visceral fat prevents insulin resistance and glucose intolerance of aging: an adipokine-mediated process?», *Diabetes*, vol. 51, n. 10, pagg. 2951–2958, ott. 2002.
- [51] F. Camanni e E. Ghigo, *Malattie del sistema endocrino e del metabolismo*, IV. Ediermes, 2012.
- [52] A. M. Ahmed, «History of diabetes mellitus», *Saudi Med. J.*, vol. 23, n. 4, pagg. 373–378, apr. 2002.
- [53] American Diabetes Association, «2. Classification and Diagnosis of Diabetes: Standards of Medical Care in Diabetes—2018», *Diabetes Care*, vol. 41, n. Supplement 1, pagg. S13–S27, gen. 2018.
- [54] M. A. Atkinson, G. S. Eisenbarth, e A. W. Michels, «Type 1 diabetes», *Lancet Lond. Engl.*, vol. 383, n. 9911, pagg. 69–82, gen. 2014.
- [55] A.-G. Ziegler e G. T. Nepom, «Prediction and pathogenesis in type 1 diabetes», *Immunity*, vol. 32, n. 4, pagg. 468–478, apr. 2010.
- [56] American Diabetes Association, «Diagnosis and classification of diabetes mellitus», *Diabetes Care*, vol. 34 Suppl 1, pagg. S62–69, gen. 2011.
- [57] American Diabetes Association, «Standards of medical care in diabetes--2014», *Diabetes Care*, vol. 37 Suppl 1, pagg. S14–80, gen. 2014.
- [58] M. Songini e C. Lombardo, «The Sardinian way to type 1 diabetes», *J. Diabetes Sci. Technol.*, vol. 4, n. 5, pagg. 1248–1255, set. 2010.
- [59] M. J. Gan, A. Albanese-O'Neill, e M. J. Haller, «Type 1 diabetes: current concepts in epidemiology, pathophysiology, clinical care, and research», *Curr. Probl. Pediatr. Adolesc. Health Care*, vol. 42, n. 10, pagg. 269–291, dic. 2012.

- [60] P. Zimmet, K. G. Alberti, e J. Shaw, «Global and societal implications of the diabetes epidemic», *Nature*, vol. 414, n. 6865, pagg. 782–787, dic. 2001.
- [61] M. Wållberg e A. Cooke, «Immune mechanisms in type 1 diabetes», *Trends Immunol.*, vol. 34, n. 12, pagg. 583–591, dic. 2013.
- [62] L. A. DiMeglio, C. Evans-Molina, e R. A. Oram, «Type 1 diabetes», *Lancet Lond. Engl.*, vol. 391, n. 10138, pagg. 2449–2462, giu. 2018.
- [63] M. Rewers e J. Ludvigsson, «Environmental risk factors for type 1 diabetes», *Lancet Lond. Engl.*, vol. 387, n. 10035, pagg. 2340–2348, giu. 2016.
- [64] T. L. van Belle, K. T. Coppieters, e M. G. von Herrath, «Type 1 diabetes: etiology, immunology, and therapeutic strategies», *Physiol. Rev.*, vol. 91, n. 1, pagg. 79–118, gen. 2011.
- [65] M. P. Morran, A. Vonberg, A. Khadra, e M. Pietropaolo, «Immunogenetics of type 1 diabetes mellitus», *Mol. Aspects Med.*, vol. 42, pagg. 42–60, apr. 2015.
- [66] M. M. Zanone *et al.*, «Glutamic acid decarboxylase and ICA512/IA-2 autoantibodies as disease markers and relationship to residual beta-cell function and glycemic control in young type 1 diabetic patients», *Metabolism.*, vol. 52, n. 1, pagg. 25–29, gen. 2003.
- [67] D. Devendra, E. Liu, e G. S. Eisenbarth, «Type 1 diabetes: recent developments», *BMJ*, vol. 328, n. 7442, pagg. 750–754, mar. 2004.
- [68] B. O. Roep, «The role of T-cells in the pathogenesis of Type 1 diabetes: from cause to cure», *Diabetologia*, vol. 46, n. 3, pagg. 305–321, mar. 2003.
- [69] K. C. Herold *et al.*, «Anti-CD3 monoclonal antibody in new-onset type 1 diabetes mellitus», *N. Engl. J. Med.*, vol. 346, n. 22, pagg. 1692–1698, mag. 2002.
- [70] E. F. Lampeter *et al.*, «Transfer of insulin-dependent diabetes between HLA-identical siblings by bone marrow transplantation», *Lancet Lond. Engl.*, vol. 341, n. 8855, pagg. 1243–1244, mag. 1993.
- [71] S. Martin *et al.*, «Development of type 1 diabetes despite severe hereditary B-cell deficiency», *N. Engl. J. Med.*, vol. 345, n. 14, pagg. 1036–1040, 04 2001.
- [72] M. Stumvoll, B. J. Goldstein, e T. W. van Haeften, «Type 2 diabetes: pathogenesis and treatment», *Lancet Lond. Engl.*, vol. 371, n. 9631, pagg. 2153–2156, giu. 2008.
- [73] E. A. Gulve, «Exercise and glycemic control in diabetes: benefits, challenges, and adjustments to pharmacotherapy», *Phys. Ther.*, vol. 88, n. 11, pagg. 1297–1321, nov. 2008.
- [74] A. J. Scheen e L. F. Van Gaal, «Combating the dual burden: therapeutic targeting of common pathways in obesity and type 2 diabetes», *Lancet Diabetes Endocrinol.*, vol. 2, n. 11, pagg. 911–922, nov. 2014.
- [75] B. G. Katzung, *Farmacologia generale e clinica*, VII. Padova: Piccin Nuova Libreria, S.p.A., 2009.
- [76] D. E. DeWitt e I. B. Hirsch, «Outpatient insulin therapy in type 1 and type 2 diabetes mellitus: scientific review», *JAMA*, vol. 289, n. 17, pagg. 2254–2264, mag. 2003.
- [77] D. M. Nathan *et al.*, «Medical management of hyperglycemia in type 2 diabetes: a consensus algorithm for the initiation and adjustment of therapy: a consensus statement of the American Diabetes Association and the European Association for the Study of Diabetes», *Diabetes Care*, vol. 32, n. 1, pagg. 193–203, gen. 2009.
- [78] J. W. Kleinberger e T. I. Pollin, «Personalized medicine in diabetes mellitus: current opportunities and future prospects», *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, vol. 1346, n. 1, pagg. 45–56, giu. 2015.
- [79] E. Otto-Buczowska e N. Jainta, «Pharmacological Treatment in Diabetes Mellitus Type 1 - Insulin and What Else?», *Int. J. Endocrinol. Metab.*, vol. 16, n. 1, pag. e13008, gen. 2018.



- [80] D. Greco, «Diabete Mellito Tipo 2 Riassorbimento del Glucosio Dapaglifozin», pag. 7.
- [81] S. A. Jabbour *et al.*, «Targeting renal glucose reabsorption for the treatment of type 2 diabetes mellitus using the SGLT2 inhibitor dapagliflozin», *Postgrad. Med.*, vol. 124, n. 4, pagg. 62–73, lug. 2012.
- [82] R. M. Pollack, M. Y. Donath, D. LeRoith, e G. Leibowitz, «Anti-inflammatory Agents in the Treatment of Diabetes and Its Vascular Complications», *Diabetes Care*, vol. 39 Suppl 2, pagg. S244-252, 2016.
- [83] N. Esser, N. Paquot, e A. J. Scheen, «Anti-inflammatory agents to treat or prevent type 2 diabetes, metabolic syndrome and cardiovascular disease», *Expert Opin. Investig. Drugs*, vol. 24, n. 3, pagg. 283–307, mar. 2015.
- [84] M. Cnop, N. Welsh, J.-C. Jonas, A. Jorns, S. Lenzen, e D. L. Eizirik, «Mechanisms of Pancreatic  $\beta$ -Cell Death in Type 1 and Type 2 Diabetes: Many Differences, Few Similarities», *Diabetes*, vol. 54, n. Supplement 2, pagg. S97–S107, dic. 2005.
- [85] D. L. Eizirik, M. L. Colli, e F. Ortis, «The role of inflammation in insulinitis and beta-cell loss in type 1 diabetes», *Nat. Rev. Endocrinol.*, vol. 5, n. 4, pagg. 219–226, apr. 2009.
- [86] S. Devaraj, M. R. Dasu, S. H. Park, e I. Jialal, «Increased levels of ligands of Toll-like receptors 2 and 4 in type 1 diabetes», *Diabetologia*, vol. 52, n. 8, pagg. 1665–1668, ago. 2009.
- [87] L. E. Padgett, K. A. Broniowska, P. A. Hansen, J. A. Corbett, e H. M. Tse, «The role of reactive oxygen species and proinflammatory cytokines in type 1 diabetes pathogenesis: Cytokines, autoimmunity, and death pathways in T1D», *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, vol. 1281, n. 1, pagg. 16–35, apr. 2013.
- [88] M. A. Russell e N. G. Morgan, «The impact of anti-inflammatory cytokines on the pancreatic  $\beta$ -cell», *Islets*, vol. 6, n. 3, pag. e950547, mag. 2014.
- [89] O. P. Kristiansen e T. Mandrup-Poulsen, «Interleukin-6 and Diabetes: The Good, the Bad, or the Indifferent?», *Diabetes*, vol. 54, n. Supplement 2, pagg. S114–S124, dic. 2005.
- [90] C. Kopan, T. Tucker, M. Alexander, M. R. Mohammadi, E. J. Pone, e J. R. T. Lakey, «Approaches in Immunotherapy, Regenerative Medicine, and Bioengineering for Type 1 Diabetes», *Front. Immunol.*, vol. 9, giu. 2018.
- [91] L. Shao *et al.*, «SENPI-mediated NEMO deSUMOylation in adipocytes limits inflammatory responses and type-1 diabetes progression», *Nat. Commun.*, vol. 6, n. 1, dic. 2015.
- [92] M. Y. Donath e S. E. Shoelson, «Type 2 diabetes as an inflammatory disease», *Nat. Rev. Immunol.*, vol. 11, n. 2, pagg. 98–107, feb. 2011.
- [93] E. Dalmas *et al.*, «T Cell-Derived IL-22 Amplifies IL-1 $\beta$ -Driven Inflammation in Human Adipose Tissue: Relevance to Obesity and Type 2 Diabetes», *Diabetes*, vol. 63, n. 6, pagg. 1966–1977, giu. 2014.
- [94] N. Esser, S. Legrand-Poels, J. Piette, A. J. Scheen, e N. Paquot, «Inflammation as a link between obesity, metabolic syndrome and type 2 diabetes», *Diabetes Res. Clin. Pract.*, vol. 105, n. 2, pagg. 141–150, ago. 2014.
- [95] P. Marchetti, «Islet inflammation in type 2 diabetes», *Diabetologia*, vol. 59, n. 4, pagg. 668–672, apr. 2016.
- [96] M. Akbari e V. Hassan-Zadeh, «IL-6 signalling pathways and the development of type 2 diabetes», *Inflammopharmacology*, vol. 26, n. 3, pagg. 685–698, giu. 2018.
- [97] D. Qu, J. Liu, C. W. Lau, e Y. Huang, «IL-6 in diabetes and cardiovascular complications», *Br. J. Pharmacol.*, vol. 171, n. 15, pagg. 3595–3603, ago. 2014.
- [98] S. Rose-John, «IL-6 trans-signaling via the soluble IL-6 receptor: importance for the pro-inflammatory activities of IL-6», *Int. J. Biol. Sci.*, vol. 8, n. 9, pagg. 1237–1247, 2012.

- [99] M. Chehimi, H. Vidal, e A. Eljaafari, «Pathogenic Role of IL-17-Producing Immune Cells in Obesity, and Related Inflammatory Diseases», *J. Clin. Med.*, vol. 6, n. 7, lug. 2017.
- [100] M. Dominici *et al.*, «Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement», *Cytotherapy*, vol. 8, n. 4, pagg. 315–317, 2006.
- [101] P. Bianco, P. G. Robey, e P. J. Simmons, «Mesenchymal stem cells: revisiting history, concepts, and assays», *Cell Stem Cell*, vol. 2, n. 4, pagg. 313–319, apr. 2008.
- [102] S. Aggarwal e M. F. Pittenger, «Human mesenchymal stem cells modulate allogeneic immune cell responses», *Blood*, vol. 105, n. 4, pagg. 1815–1822, feb. 2005.
- [103] F. P. Barry e J. M. Murphy, «Mesenchymal stem cells: clinical applications and biological characterization», *Int. J. Biochem. Cell Biol.*, vol. 36, n. 4, pagg. 568–584, apr. 2004.
- [104] D. Magne, C. Vinatier, M. Julien, P. Weiss, e J. Guicheux, «Mesenchymal stem cell therapy to rebuild cartilage», *Trends Mol. Med.*, vol. 11, n. 11, pagg. 519–526, nov. 2005.
- [105] R. Hass, C. Kasper, S. Böhm, e R. Jacobs, «Different populations and sources of human mesenchymal stem cells (MSC): A comparison of adult and neonatal tissue-derived MSC», *Cell Commun. Signal. CCS*, vol. 9, pag. 12, mag. 2011.
- [106] R. H. Lee *et al.*, «Characterization and expression analysis of mesenchymal stem cells from human bone marrow and adipose tissue», *Cell. Physiol. Biochem. Int. J. Exp. Cell. Physiol. Biochem. Pharmacol.*, vol. 14, n. 4–6, pagg. 311–324, 2004.
- [107] C. M. McLeod e R. L. Mauck, «On the origin and impact of mesenchymal stem cell heterogeneity: new insights and emerging tools for single cell analysis», *Eur. Cell. Mater.*, vol. 34, pagg. 217–231, 27 2017.
- [108] S. T. Mindaye, M. Ra, J. L. Lo Surdo, S. R. Bauer, e M. A. Alterman, «Global proteomic signature of undifferentiated human bone marrow stromal cells: evidence for donor-to-donor proteome heterogeneity», *Stem Cell Res.*, vol. 11, n. 2, pagg. 793–805, set. 2013.
- [109] L. da S. Meirelles, A. M. Fontes, D. T. Covas, e A. I. Caplan, «Mechanisms involved in the therapeutic properties of mesenchymal stem cells», *Cytokine Growth Factor Rev.*, vol. 20, n. 5–6, pagg. 419–427, dic. 2009.
- [110] R. Abdi, P. Fiorina, C. N. Adra, M. Atkinson, e M. H. Sayegh, «Immunomodulation by mesenchymal stem cells: a potential therapeutic strategy for type 1 diabetes», *Diabetes*, vol. 57, n. 7, pagg. 1759–1767, lug. 2008.
- [111] L. Wang *et al.*, «MCP-1, MIP-1, IL-8 and ischemic cerebral tissue enhance human bone marrow stromal cell migration in interface culture», *Hematol. Amst. Neth.*, vol. 7, n. 2, pagg. 113–117, apr. 2002.
- [112] T. Yi e S. U. Song, «Immunomodulatory properties of mesenchymal stem cells and their therapeutic applications», *Arch. Pharm. Res.*, vol. 35, n. 2, pagg. 213–221, feb. 2012.
- [113] G. Raposo e W. Stoorvogel, «Extracellular vesicles: Exosomes, microvesicles, and friends», *J. Cell Biol.*, vol. 200, n. 4, pagg. 373–383, feb. 2013.
- [114] C. Tetta, E. Ghigo, L. Silengo, M. C. Deregibus, e G. Camussi, «Extracellular vesicles as an emerging mechanism of cell-to-cell communication», *Endocrine*, vol. 44, n. 1, pagg. 11–19, ago. 2013.
- [115] F. Pardo, R. Villalobos-Labra, B. Sobrevia, F. Toledo, e L. Sobrevia, «Extracellular vesicles in obesity and diabetes mellitus», *Mol. Aspects Med.*, vol. 60, pagg. 81–91, apr. 2018.
- [116] M. Nawaz *et al.*, «Extracellular Vesicles: Evolving Factors in Stem Cell Biology», *Stem Cells Int.*, vol. 2016, pag. 1073140, 2016.

- [117] V. R. Minciocchi, M. R. Freeman, e D. Di Vizio, «Extracellular vesicles in cancer: exosomes, microvesicles and the emerging role of large oncosomes», *Semin. Cell Dev. Biol.*, vol. 40, pagg. 41–51, apr. 2015.
- [118] G. Camussi, M. C. Deregibus, e V. Cantaluppi, «Role of stem-cell-derived microvesicles in the paracrine action of stem cells», *Biochem. Soc. Trans.*, vol. 41, n. 1, pagg. 283–287, feb. 2013.
- [119] S. Sirisinha, «Evolutionary insights into the origin of innate and adaptive immune systems: different shades of grey», *Asian Pac. J. Allergy Immunol.*, vol. 32, n. 1, pagg. 3–15, mar. 2014.
- [120] J. Burrello, S. Monticone, C. Gai, Y. Gomez, S. Kholia, e G. Camussi, «Stem Cell-Derived Extracellular Vesicles and Immune-Modulation», *Front. Cell Dev. Biol.*, vol. 4, pag. 83, 2016.
- [121] B. Zhang, Y. Yin, R. C. Lai, S. S. Tan, A. B. H. Choo, e S. K. Lim, «Mesenchymal stem cells secrete immunologically active exosomes», *Stem Cells Dev.*, vol. 23, n. 11, pagg. 1233–1244, giu. 2014.
- [122] H.-G. Zhang *et al.*, «A membrane form of TNF-alpha presented by exosomes delays T cell activation-induced cell death», *J. Immunol. Baltim. Md 1950*, vol. 176, n. 12, pagg. 7385–7393, giu. 2006.
- [123] L. Deng *et al.*, «Osteoblast-derived microvesicles: A novel mechanism for communication between osteoblasts and osteoclasts», *Bone*, vol. 79, pagg. 37–42, ott. 2015.
- [124] P. D. Robbins e A. E. Morelli, «Regulation of immune responses by extracellular vesicles», *Nat. Rev. Immunol.*, vol. 14, n. 3, pagg. 195–208, mar. 2014.
- [125] B. Giebel, L. Kordelas, e V. Börger, «Clinical potential of mesenchymal stem/stromal cell-derived extracellular vesicles», *Stem Cell Investig.*, vol. 4, pag. 84, 2017.
- [126] L. Kordelas *et al.*, «MSC-derived exosomes: a novel tool to treat therapy-refractory graft-versus-host disease», *Leukemia*, vol. 28, n. 4, pagg. 970–973, apr. 2014.
- [127] W. Nassar *et al.*, «Umbilical cord mesenchymal stem cells derived extracellular vesicles can safely ameliorate the progression of chronic kidney diseases», *Biomater. Res.*, vol. 20, pag. 21, 2016.
- [128] D. Gustafson, S. Veitch, e J. E. Fish, «Extracellular Vesicles as Protagonists of Diabetic Cardiovascular Pathology», *Front. Cardiovasc. Med.*, vol. 4, pag. 71, 2017.
- [129] J. M. Murphy, K. Dixon, S. Beck, D. Fabian, A. Feldman, e F. Barry, «Reduced chondrogenic and adipogenic activity of mesenchymal stem cells from patients with advanced osteoarthritis», *Arthritis Rheum.*, vol. 46, n. 3, pagg. 704–713, mar. 2002.
- [130] K. Le Blanc *et al.*, «Treatment of severe acute graft-versus-host disease with third party haploidentical mesenchymal stem cells», *Lancet Lond. Engl.*, vol. 363, n. 9419, pagg. 1439–1441, mag. 2004.
- [131] J. H. Lim, M. H. Lee, H. G. Yi, C. S. Kim, J. H. Kim, e S. U. Song, «Mesenchymal stromal cells for steroid-refractory acute graft-versus-host disease: a report of two cases», *Int. J. Hematol.*, vol. 92, n. 1, pagg. 204–207, lug. 2010.
- [132] M. Duijvestein *et al.*, «Autologous bone marrow-derived mesenchymal stromal cell treatment for refractory luminal Crohn's disease: results of a phase I study», *Gut*, vol. 59, n. 12, pagg. 1662–1669, dic. 2010.
- [133] B. Yamout *et al.*, «Bone marrow mesenchymal stem cell transplantation in patients with multiple sclerosis: a pilot study», *J. Neuroimmunol.*, vol. 227, n. 1–2, pagg. 185–189, ott. 2010.

- [134] M. M. Zanone *et al.*, «Human mesenchymal stem cells modulate cellular immune response to islet antigen glutamic acid decarboxylase in type 1 diabetes», *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, vol. 95, n. 8, pagg. 3788–3797, ago. 2010.
- [135] E. Favaro *et al.*, «Human mesenchymal stem cell-derived microvesicles modulate T cell response to islet antigen glutamic acid decarboxylase in patients with type 1 diabetes», *Diabetologia*, vol. 57, n. 8, pagg. 1664–1673, ago. 2014.
- [136] R. Jiang *et al.*, «Transplantation of placenta-derived mesenchymal stem cells in type 2 diabetes: a pilot study», *Front. Med.*, vol. 5, n. 1, pagg. 94–100, mar. 2011.
- [137] J. S. Skyler, V. A. Fonseca, K. R. Segal, e J. Rosenstock, «Allogeneic Mesenchymal Precursor Cells in Type 2 Diabetes: A Randomized, Placebo-Controlled, Dose-Escalation Safety and Tolerability Pilot Study», *Diabetes Care*, vol. 38, n. 9, pagg. 1742–1749, set. 2015.
- [138] P. A. Zuk *et al.*, «Multilineage cells from human adipose tissue: implications for cell-based therapies», *Tissue Eng.*, vol. 7, n. 2, pagg. 211–228, apr. 2001.
- [139] J. M. Gimble, A. J. Katz, e B. A. Bunnell, «Adipose-derived stem cells for regenerative medicine», *Circ. Res.*, vol. 100, n. 9, pagg. 1249–1260, mag. 2007.
- [140] K. McIntosh *et al.*, «The immunogenicity of human adipose-derived cells: temporal changes in vitro», *Stem Cells Dayt. Ohio*, vol. 24, n. 5, pagg. 1246–1253, mag. 2006.
- [141] D. A. De Ugarte *et al.*, «Comparison of Multi-Lineage Cells from Human Adipose Tissue and Bone Marrow», *Cells Tissues Organs*, vol. 174, n. 3, pagg. 101–109, 2003.
- [142] B. A. Bunnell, M. Flaate, C. Gagliardi, B. Patel, e C. Ripoll, «Adipose-derived stem cells: isolation, expansion and differentiation», *Methods San Diego Calif*, vol. 45, n. 2, pagg. 115–120, giu. 2008.
- [143] S. K. Kang *et al.*, «Neurogenesis of Rhesus adipose stromal cells», *J. Cell Sci.*, vol. 117, n. Pt 18, pagg. 4289–4299, ago. 2004.
- [144] J. W. Kuehner, B. Weyand, C. Radtke, P. M. Vogt, C. Kasper, e K. Reimers, «Isolation, Characterization, Differentiation, and Application of Adipose-Derived Stem Cells», in *Bioreactor Systems for Tissue Engineering II*, C. Kasper, M. Griensven, e R. Pörtner, A. c. di Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg, 2010, pagg. 55–105.
- [145] G. E. Kilroy *et al.*, «Cytokine profile of human adipose-derived stem cells: expression of angiogenic, hematopoietic, and pro-inflammatory factors», *J. Cell. Physiol.*, vol. 212, n. 3, pagg. 702–709, set. 2007.
- [146] T. Lopatina, S. Bruno, C. Tetta, N. Kalinina, M. Porta, e G. Camussi, «Platelet-derived growth factor regulates the secretion of extracellular vesicles by adipose mesenchymal stem cells and enhances their angiogenic potential», *Cell Commun. Signal. CCS*, vol. 12, pag. 26, apr. 2014.
- [147] T. Thomou *et al.*, «Adipose-derived circulating miRNAs regulate gene expression in other tissues», *Nature*, vol. 542, n. 7642, pagg. 450–455, 23 2017.
- [148] M. F. Pittenger *et al.*, «Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells», *Science*, vol. 284, n. 5411, pagg. 143–147, apr. 1999.
- [149] D. A. De Ugarte *et al.*, «Differential expression of stem cell mobilization-associated molecules on multi-lineage cells from adipose tissue and bone marrow», *Immunol. Lett.*, vol. 89, n. 2–3, pagg. 267–270, ott. 2003.
- [150] P. A. Zuk *et al.*, «Human adipose tissue is a source of multipotent stem cells», *Mol. Biol. Cell*, vol. 13, n. 12, pagg. 4279–4295, dic. 2002.
- [151] A. Schäffler e C. Büchler, «Concise review: adipose tissue-derived stromal cells--basic and clinical implications for novel cell-based therapies», *Stem Cells Dayt. Ohio*, vol. 25, n. 4, pagg. 818–827, apr. 2007.
- [152] F. Momen-Heravi *et al.*, «Alternative methods for characterization of extracellular vesicles», *Front. Physiol.*, vol. 3, pag. 354, 2012.

- [153] A. Eljaafari *et al.*, «Adipose Tissue-Derived Stem Cells From Obese Subjects Contribute to Inflammation and Reduced Insulin Response in Adipocytes Through Differential Regulation of the Th1/Th17 Balance and Monocyte Activation», *Diabetes*, vol. 64, n. 7, pagg. 2477–2488, lug. 2015.
- [154] F. Abbasi *et al.*, «TGF- $\beta$  and IL-23 gene expression in unstimulated PBMCs of patients with diabetes», *Endocrine*, vol. 41, n. 3, pagg. 430–434, giu. 2012.
- [155] M. Belghith, J. A. Bluestone, S. Barriot, J. Mégret, J.-F. Bach, e L. Chatenoud, «TGF- $\beta$ -dependent mechanisms mediate restoration of self-tolerance induced by antibodies to CD3 in overt autoimmune diabetes», *Nat. Med.*, vol. 9, pag. 1202, ago. 2003.
- [156] H.-M. Lee, T. S. Kim, e E.-K. Jo, «MiR-146 and miR-125 in the regulation of innate immunity and inflammation», *BMB Rep.*, vol. 49, n. 6, pagg. 311–318, giu. 2016.
- [157] M. Balasubramanyam *et al.*, «Impaired miR-146a expression links subclinical inflammation and insulin resistance in Type 2 diabetes», *Mol. Cell. Biochem.*, vol. 351, n. 1–2, pagg. 197–205, mag. 2011.
- [158] T. S. Assmann, M. Recamonde-Mendoza, B. M. De Souza, e D. Crispim, «MicroRNA expression profiles and type 1 diabetes mellitus: systematic review and bioinformatic analysis», *Endocr. Connect.*, vol. 6, n. 8, pagg. 773–790, nov. 2017.
- [159] D. Bhaumik, G. K. Scott, S. Schokrpur, C. K. Patil, J. Campisi, e C. C. Benz, «Expression of microRNA-146 suppresses NF-kappaB activity with reduction of metastatic potential in breast cancer cells», *Oncogene*, vol. 27, n. 42, pagg. 5643–5647, set. 2008.
- [160] N. Yousefzadeh, M. R. Alipour, e F. G. Soufi, «Deregulation of NF- $\kappa$ B-miR-146a negative feedback loop may be involved in the pathogenesis of diabetic neuropathy», *J. Physiol. Biochem.*, vol. 71, n. 1, pagg. 51–58, mar. 2015.
- [161] C. Ciccacci *et al.*, «Common polymorphisms in MIR146a, MIR128a and MIR27a genes contribute to neuropathy susceptibility in type 2 diabetes», *Acta Diabetol.*, vol. 51, n. 4, pagg. 663–671, ago. 2014.
- [162] Y. Huang *et al.*, «Involvement of inflammation-related miR-155 and miR-146a in diabetic nephropathy: implications for glomerular endothelial injury», *BMC Nephrol.*, vol. 15, pag. 142, set. 2014.
- [163] P. Zhuang, C. K. Muraleedharan, e S. Xu, «Intraocular Delivery of miR-146 Inhibits Diabetes-Induced Retinal Functional Defects in Diabetic Rat Model», *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.*, vol. 58, n. 3, pagg. 1646–1655, 01 2017.

## **RINGRAZIAMENTI**

A tutta la mia famiglia, in particolare a mia mamma e a mio papà, perché mi hanno permesso di intraprendere questo lungo percorso senza mai smettere di offrirmi il loro appoggio e di credere in me.

Ai nonni, che mi hanno supportata con la loro dolcezza nei momenti di scoraggiamento.

Ad Alberto, mio punto di riferimento, che mi ha aiutata a superare gli ostacoli incontrati lungo il percorso, a credere in me stessa e a capire che dalle grandi fatiche nascono grandi soddisfazioni.

A Martina, Giulia e Marta, le amiche di una vita, con le quali sono cresciuta e che da sempre mi sostengono e mi aiutano a vincere le mie paure.

Agli amici di sempre, Gloria, Claudia, Luca, Federico, Francisco e Maurizio, la mia seconda famiglia, perché non mi hanno mai fatto mancare il loro incoraggiamento.

Ai tanti nuovi amici che ho incontrato in questi lunghi e faticosi anni e in particolare a Ilaria, mia compagna di giornate di studio intense e di lunghe chiacchierate, che mi ha insegnato che l'ottimismo è l'atteggiamento migliore per affrontare le sfide.

Al Professor Porta e alla Dottoressa Zanone che mi hanno permesso di iniziare questo percorso all'interno del reparto di Medicina Interna 1 e hanno reso possibile il raggiungimento di questo traguardo.

A Enrica, che in questo lungo anno con la sua positività mi ha aiutata, sostenuta e incoraggiata, e a Tatiana che con pazienza e con dedizione mi ha trasmesso l'amore per il suo lavoro.