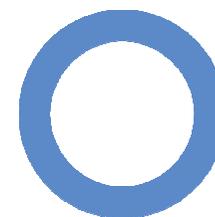


***MODELLI SPERIMENTALI  
PER LO STUDIO  
DEL DIABETE  
E DELL'OBESITA'***



# *Il Diabete Mellito*

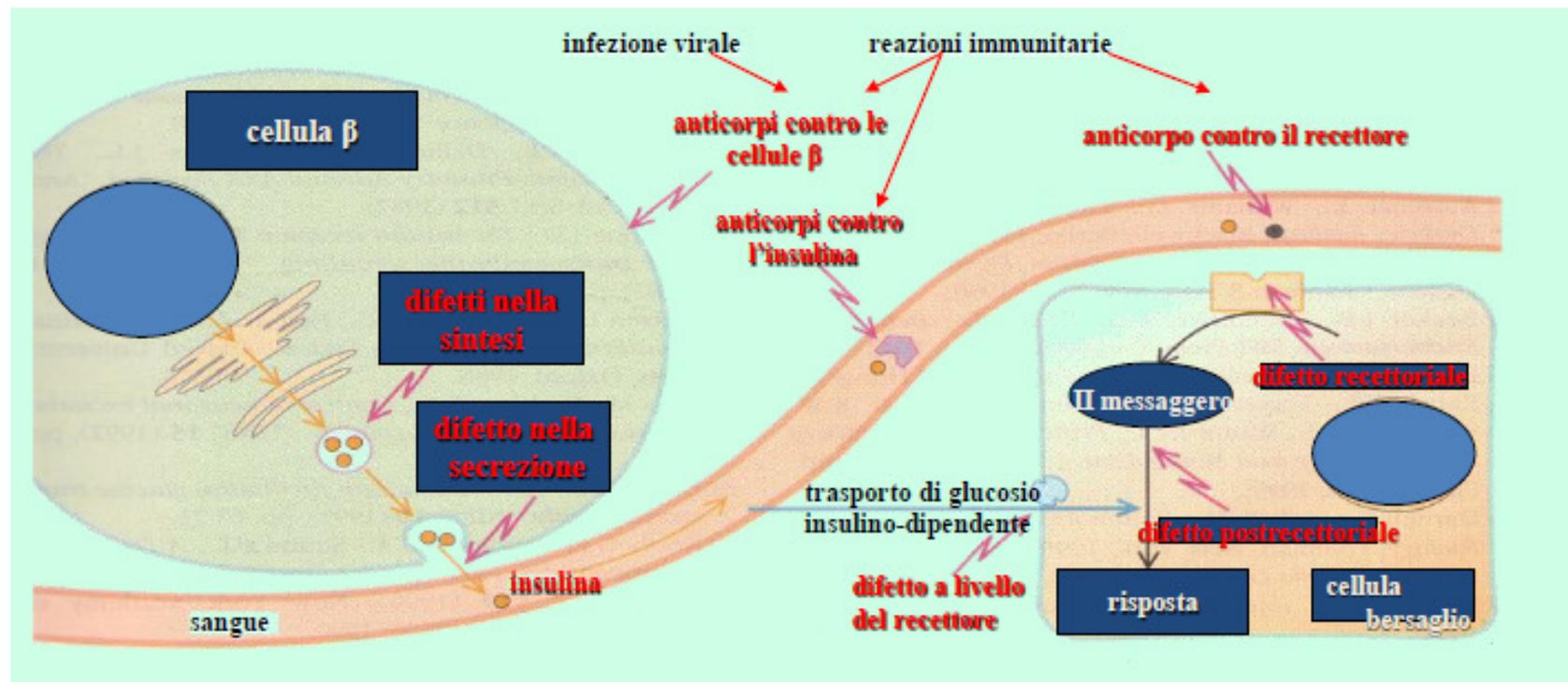


Giornata Mondiale del Diabete

14 Novembre

Il *diabete mellito* è una malattia metabolica causata da insufficiente secrezione di insulina dalle cellule  $\beta$  delle isole di Langherans del pancreas o da alterata responsività dei tessuti all'ormone.

[*National Diabetes Data Group, 1979*]



I difetti si possono verificare a vari livelli

Sintomi:

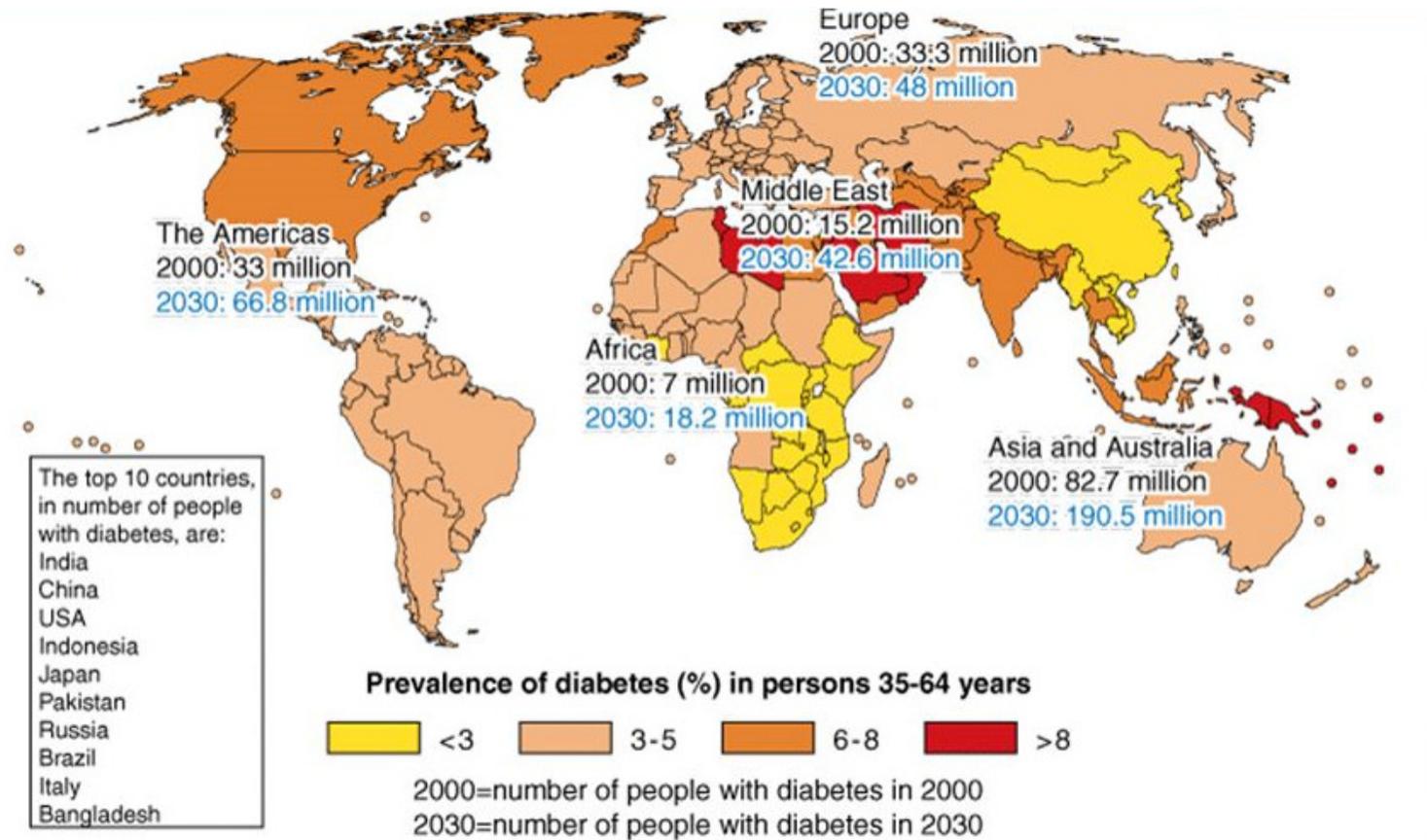
- instabilità del livello glicemico del sangue, con condizioni di iper e ipoglicemia
- aumento della diuresi (poliuria)
- aumento della sete (polidipsia) e della fame (polifagia)
- diminuzione del peso corporeo.

---

## ***Cenni storici***

1774	Matthew Dobson	Il sapore dolce delle urine è dovuto al glucosio
1889	Joseph von Mering e Oskar Minkowski	Nel cane asportato sperimentalmente del pancreas insorgono i segni e i sintomi del DM
1910	Sir Edward Albert Sharpey-Schafer	Pazienti con DM hanno carenza di una particolare sostanza prodotta dal pancreas, definita <u>"insulina"</u> (poiché prodotta dalle isole di Langerhans del pancreas)
1921	Frederick Grant Banting e Charles Herbert Best	Isolarono l'insulina, la condizione di DM nel cane pancreatectomizzato può essere risolta somministrando insulina estratta dalle isole di Langerhans di un cane sano
1923	Frederick Grant Banting e Charles Herbert Best	Premio Nobel per la Medicina

# Epidemiologia



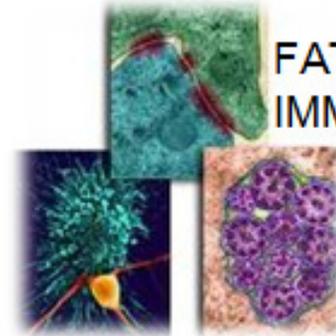
La percentuale di popolazione mondiale affetta viene stimata intorno al 5%.  
In Italia la percentuale di individui affetti da tale patologia è mediamente del 3%.

# *Eziologia*

Farmaci  
Stile di vita  
Fattori di rischio



FATTORI AMBIENTALI



FATTORI  
IMMUNOLOGICI

Infezioni  
Malattie del pancreas

# *Diabete*

FATTORI  
GENETICI



Difetti nell'azione insulinica  
Patologie genetiche

# ***Classificazione del Diabete Mellito***

## **□ Diabete Mellito di tipo 1 (IDDM)**

- caratterizzato dalla distruzione delle cellule  $\beta$  del pancreas ad opera del sistema immunitario
- Comporta profonda carenza insulinica
- Esistono due sottoforme:
  - Tipo 1A (immunomediato)
  - Tipo 1B (idiopatico), eziologia non nota, colpisce maggiormente soggetti di etnia asiatica e africana
- Riguarda circa il 10% delle persone ed interessa essenzialmente bambini e adolescenti

## **□ Diabete Mellito di tipo 2 (NIDDM)**

- iperglicemia legata a insulino-resistenza (= difetto di azione dell'insulina) + carenza insulinica relativa e progressiva
- interessa essenzialmente l'adulto
- rappresenta la forma di diabete più frequente (90-95% dei casi)
- comune associazione con obesità e altre malattie metaboliche

## ***Differenze tra Diabete Mellito di Tipo 1 e Tipo 2***

Enzo Boncompagni, MD	IDDM - Tipo I	NIDDM - Tipo II
Età di insorgenza	Sotto i 20 anni	Sopra i 40 anni
Sviluppo dei sintomi	Rapido	Lento
% di popolazione	10 %	90 %
Ketoacidosi	Comune	Rara
Obesità associata	Rara	Comune
Cellule Beta IL	Distrutte	Non distrutte
Secrezione di insulina	Diminuita	Normale o aumentata
Anticorpi cellule IL	Presenti	Assenti
Gemelli	50 %	90 - 100 %
Trattamento	Insulina	Dieta e farmaci orali

## ***Forme secondarie di Diabete Mellito***

### **☐ Diabete secondario**

- Malattie endocrine, patologie pancreatiche, farmaci...
- Alcune forme sono reversibili

### **☐ Malattie genetiche**

- Difetti genetici della secrezione o dell'azione dell'insulina
- Sindrome genetiche complesse con diabete

### **☐ Diabete gestazionale (DMG)**

- Frequenza del 7-14% di sviluppo di diabete nella madre
- Facilmente trattabile
- Può causare problemi nel feto
- il 30% delle madri sviluppano diabete di tipo 2 nel corso della vita

### **❖ Diabete insipido (DIN)**

- caratterizzato da abbondanti quantità di urine e da diminuita capacità del rene di concentrare le urine
- meccanismi fisiopatologici molto diversi rispetto al diabete mellito
- non vi sono alterazioni nella concentrazione di glucosio nel sangue e nelle urine

# ***Il Diabete mellito di tipo 1***

Malattia autoimmune caratterizzata da infiltrazione immunitaria (linfociti T CD4<sup>+</sup> e CD8<sup>+</sup>, linfociti B e macrofagi) delle isole di Langerhans pancreatiche, seguita da progressiva distruzione delle cellule  $\beta$ -pancreatiche e profonda carenza di produzione insulinica.

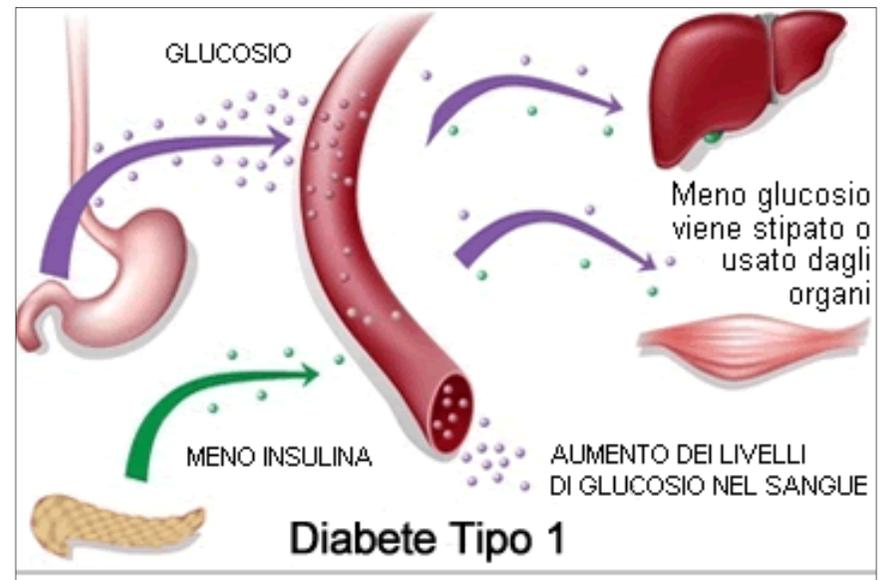
La carenza insulinica determina l'incapacità delle cellule ad utilizzare il glucosio, con 2 conseguenze immediate:

**1.** Accumulo di glucosio nel plasma → iperglicemia marcata → superamento della soglia renale di riassorbimento → glicosuria → poliuria → polidipsia

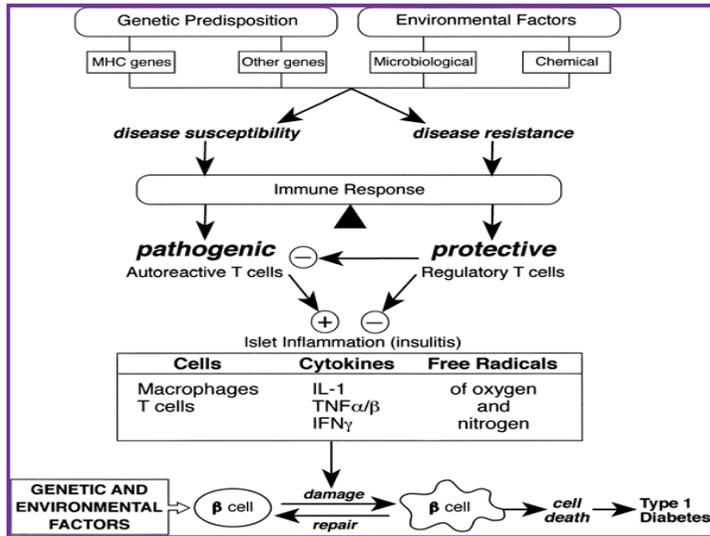
**2.** Utilizzo di fonti alternative di energia:

Riserve lipidiche → perdita di massa grassa

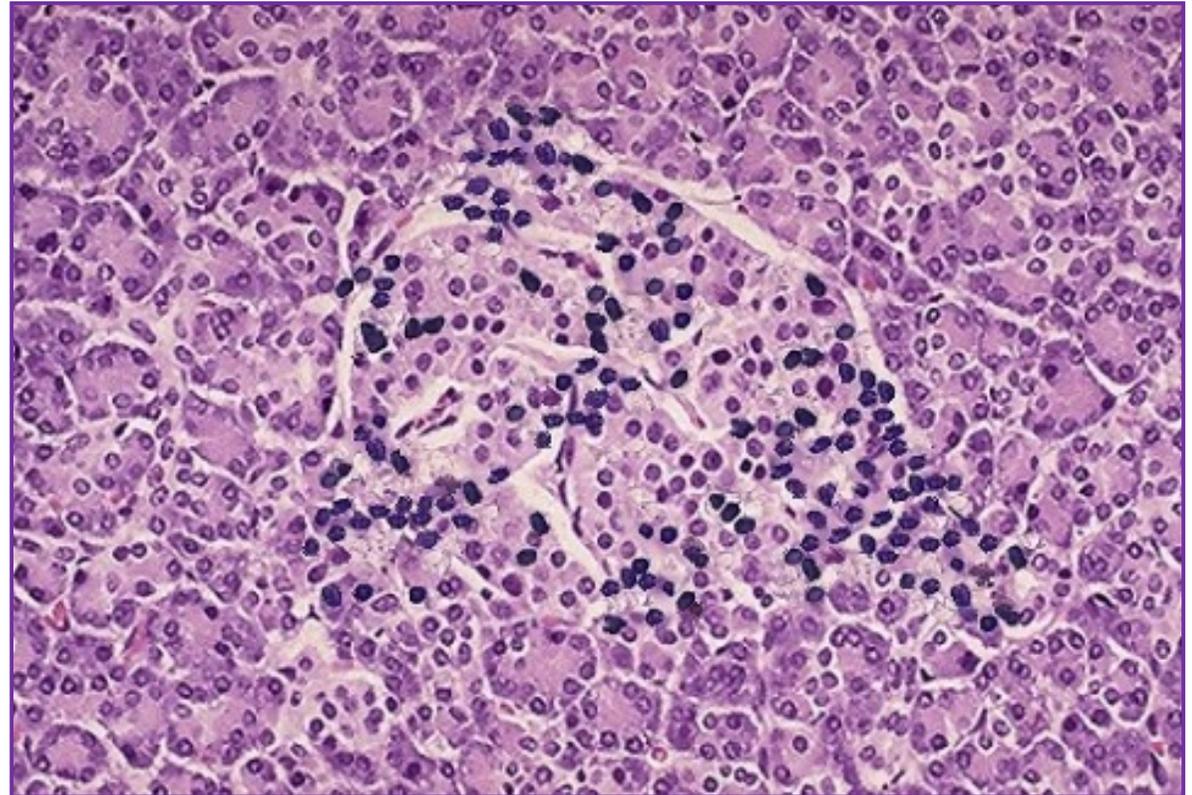
Riserve proteiche → perdita di massa magra (muscolare)



## Eziologia multifattoriale



## Sezione di un'isola di Langherans in soggetto con insulite



**L'infiltrato insulitico** è costituito da:

- cellule dendritiche (DCs)
- macrofagi
- cellule *natural killer* (NK)
- linfociti T (CD4<sup>+</sup> e CD8<sup>+</sup>)
- linfociti B
- citochine
- Auto-anticorpi (ICA, GAD, IA-2, IA-2 $\beta$ )

# ***Modelli sperimentali del T1DM***

**Topo NOD**  
***(Non-Obese Diabetic mouse)***



**Diabete-indotto da**  
**Streptozotocina**



# ***Topo NOD*** ***(Non-Obese Diabetic mouse)***



- Rappresenta il principale modello sperimentale per lo studio del Diabete Mellito di Tipo 1
- I topi di questo ceppo sviluppano spontaneamente una patologia con caratteristiche molto simili al T1DM umano

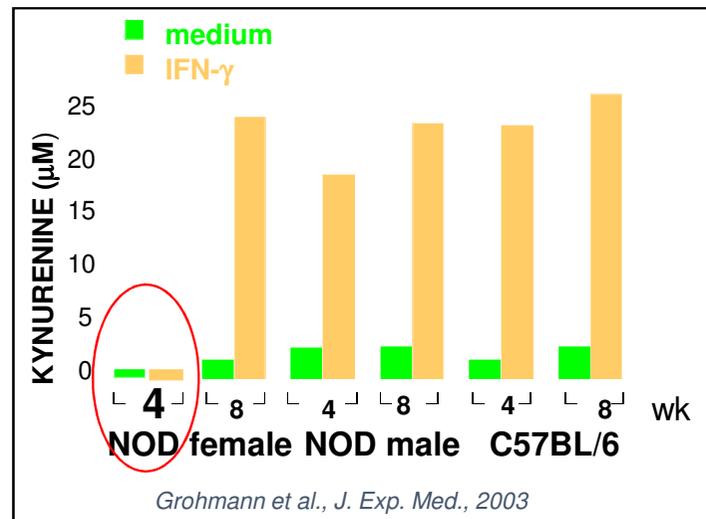
## Topo NOD femmina

- 3-4 weeks-old ➔ INSULITE
- 6-8 weeks-old ➔ IPERGLICEMIA
- 10-12 weeks-old ➔ DIABETE

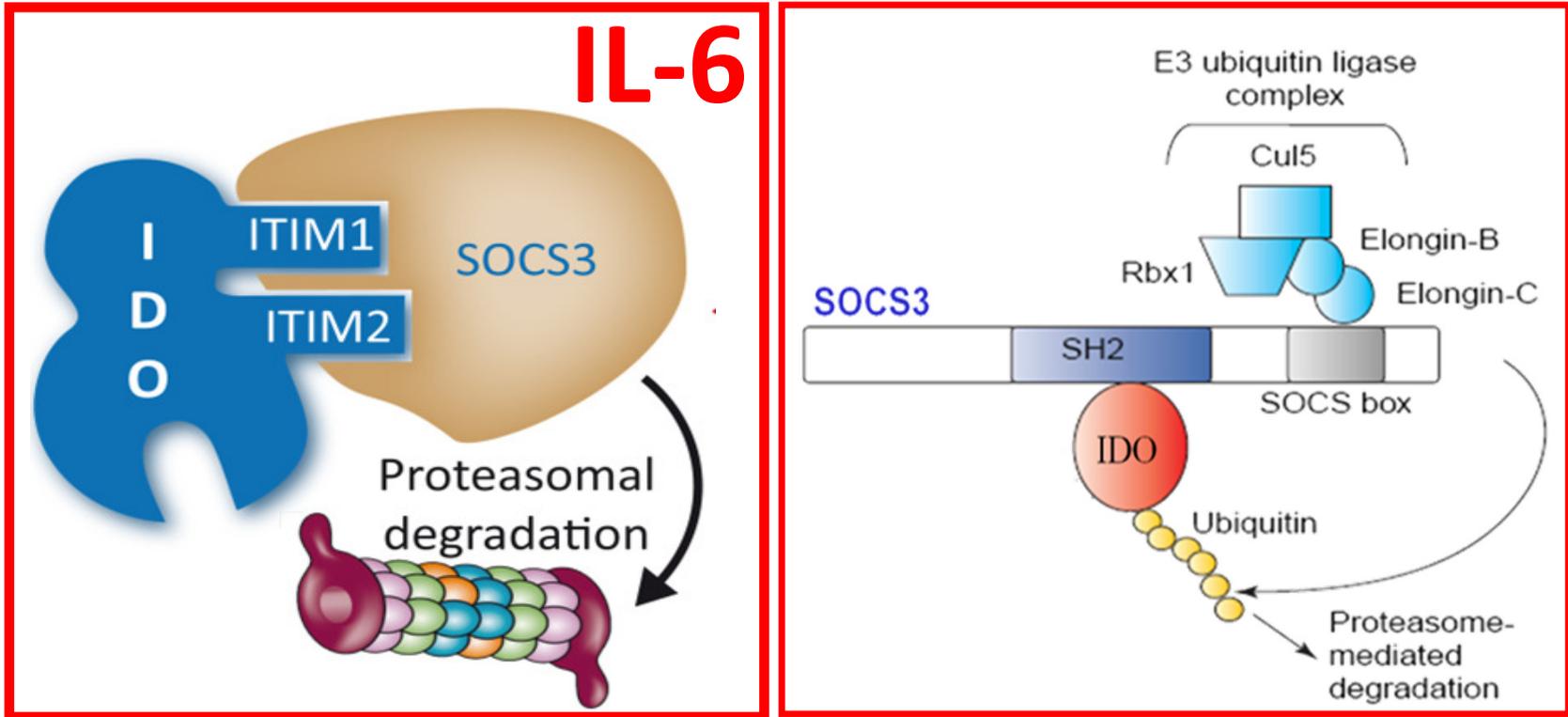
La predisposizione allo sviluppo di patologie autoimmuni è dovuta a meccanismi difettivi nella tolleranza immunologica:

- polimorfismi nel locus Idd3 che causa difettiva produzione di IL-2
- mutazione nell'esone 2 del CTLA-4 gene

Difetto nell'induzione di IDO da parte di IFN- $\gamma$



IDO è degradato attraverso un meccanismo proteasomiale



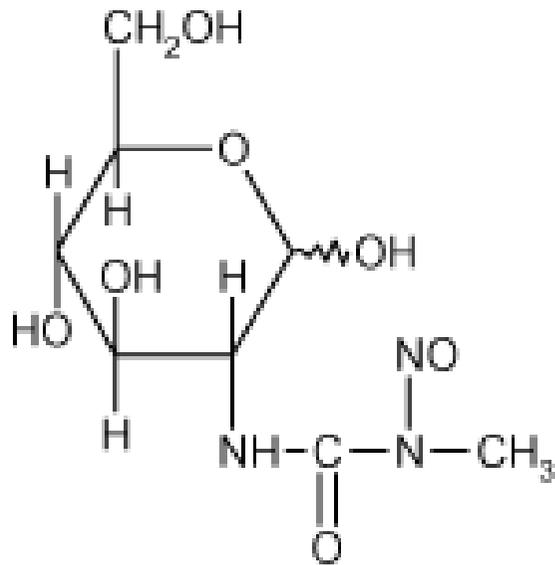
**IDO1**

Lost of the immune homeostasis

***Streptozotocin***  
***A Diabetogenic Agent in Animal Models***



## Streptozotocina (STZ)



2-deossi-2- (3-metil-3-nitrosourea) -1-D-glucosio

Peso molecolare: 265g/mol

Formula chimica:  $C_8H_{15}N_3O_7$

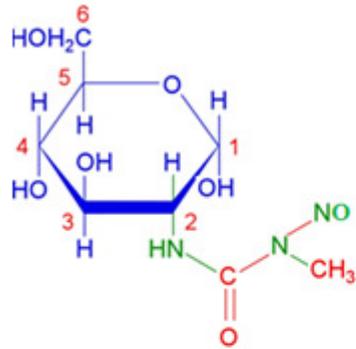


*Streptomyces achromogenes*

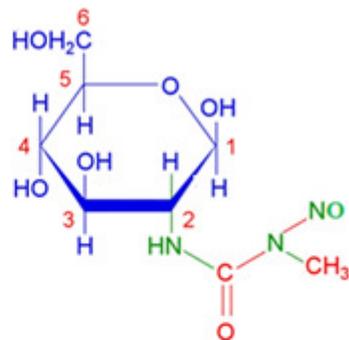
Rakieten L, Rakieten ML, Nadkarni MV: *Studies on the diabetogenic action of Streptozotocin* (NSC-37917). *Cancer Chem Rep* 1963, 29:91–98.

# Struttura chimica della STZ

## a. ANOMERIC FORMS OF STREPTOZOTOCIN

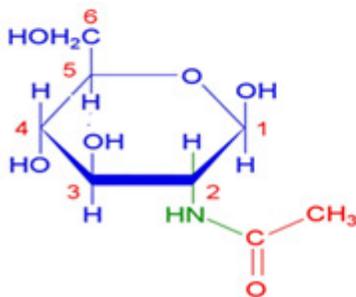


$\alpha$ -anomer of STZ

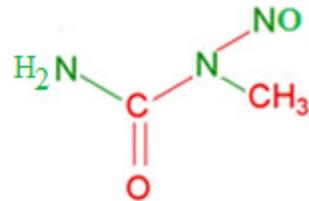


$\beta$ -anomer of STZ

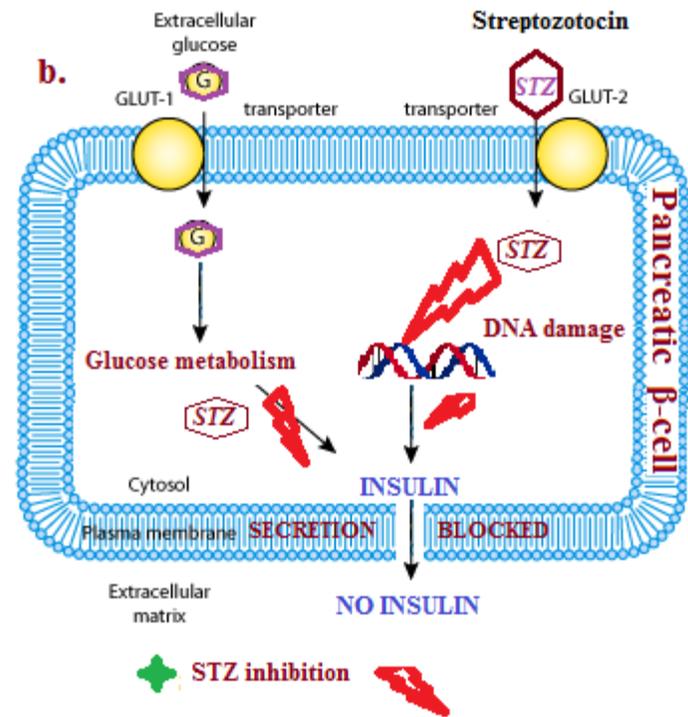
## b. N-ACETYL GLUCOSAMINE



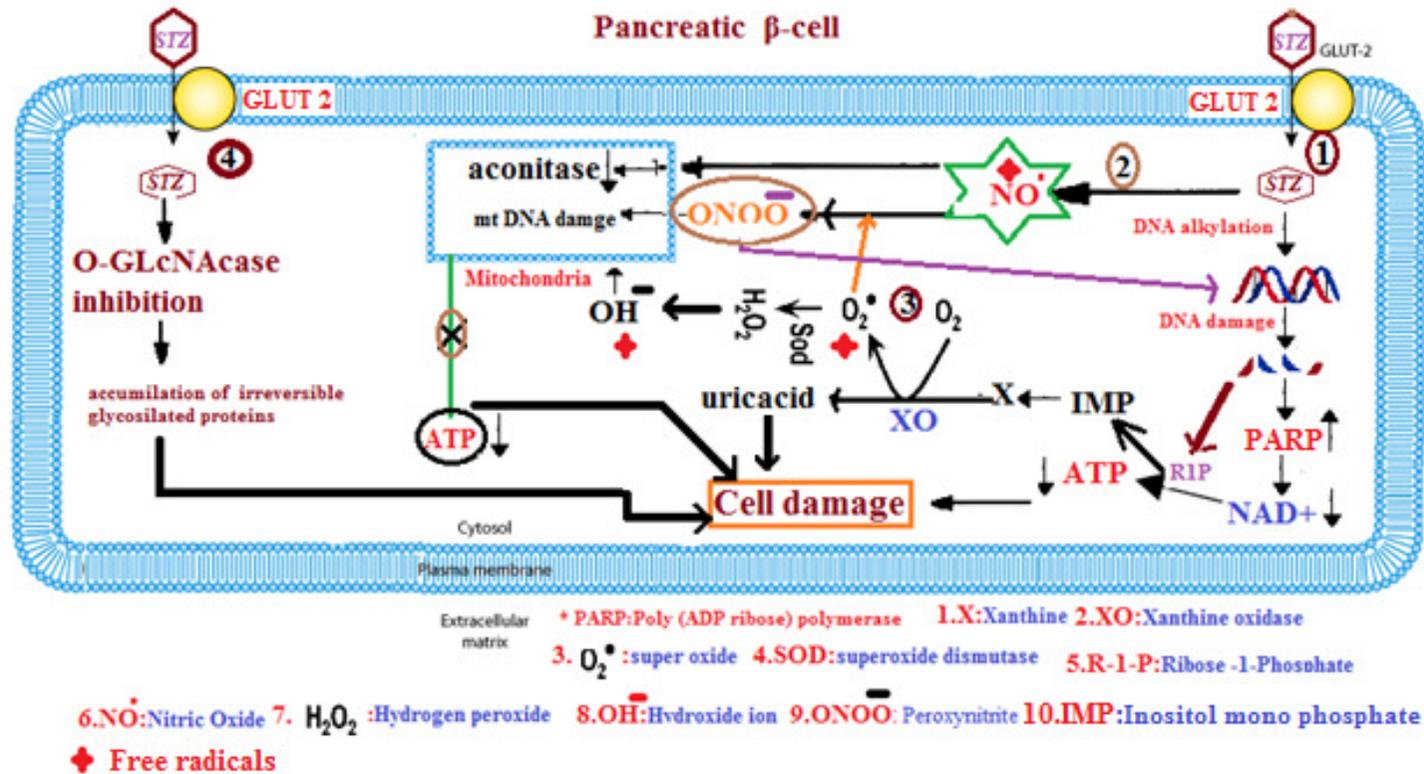
## c. METHYLNITROSOUREA



# Uptake selettivo della STZ da parte delle cellule $\beta$ del pancreas

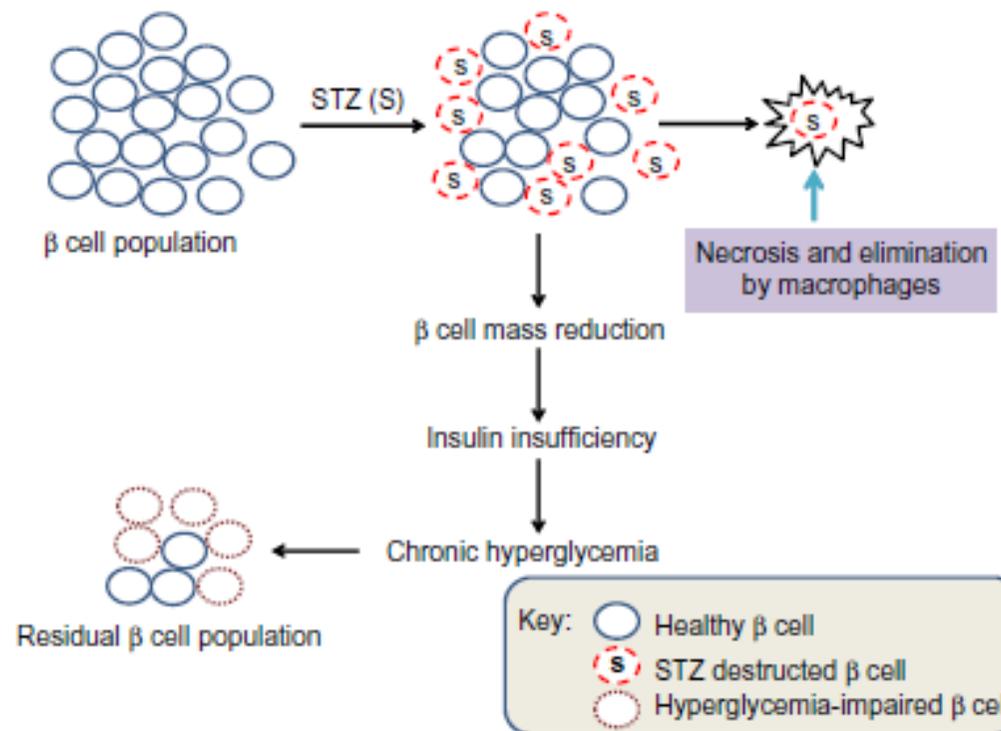


# Meccanismo d'azione della STZ



- Carbamilazione delle proteine
- Alchilazione del DNA
- Rilascio di ossido nitrico (NO)
- Generazione di radicali liberi e stress ossidativo
- Inibizione di O-GlcNAcase

# La distruzione delle cellule $\beta$ del pancreas indotta da STZ causa insufficienza di insulina e iperglicemia cronica



## Differenti dosaggi di STZ inducono tipi diversi di diabete



Rat + streptozotocine

Singola dose ad  
alto dosaggio

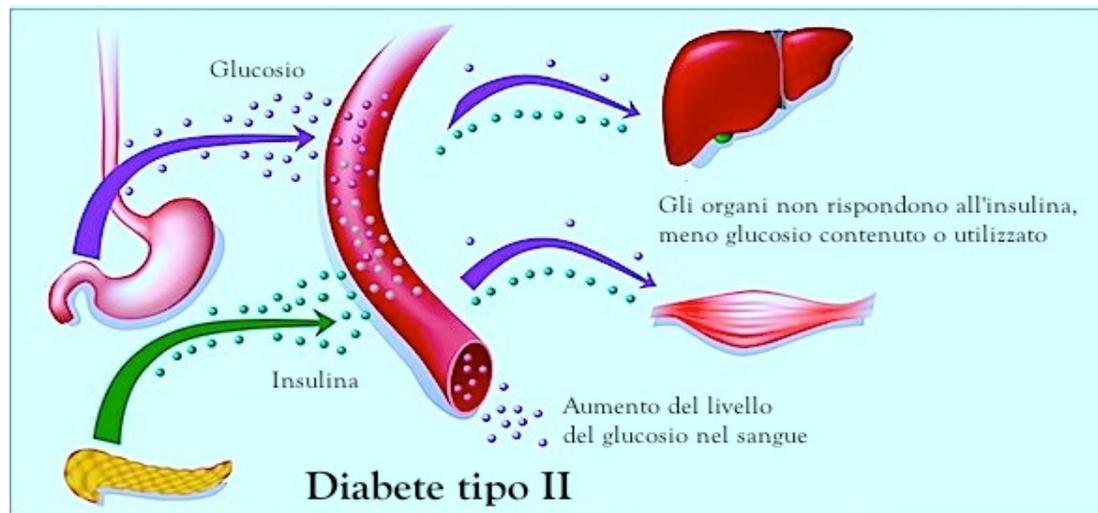
**Diabete di tipo 1**

Somm. ripetute  
basso dosaggio  
+nicotinamide  
+ high-fat diet

**Diabete di tipo 2**

# ***Il Diabete Mellito di tipo 2***

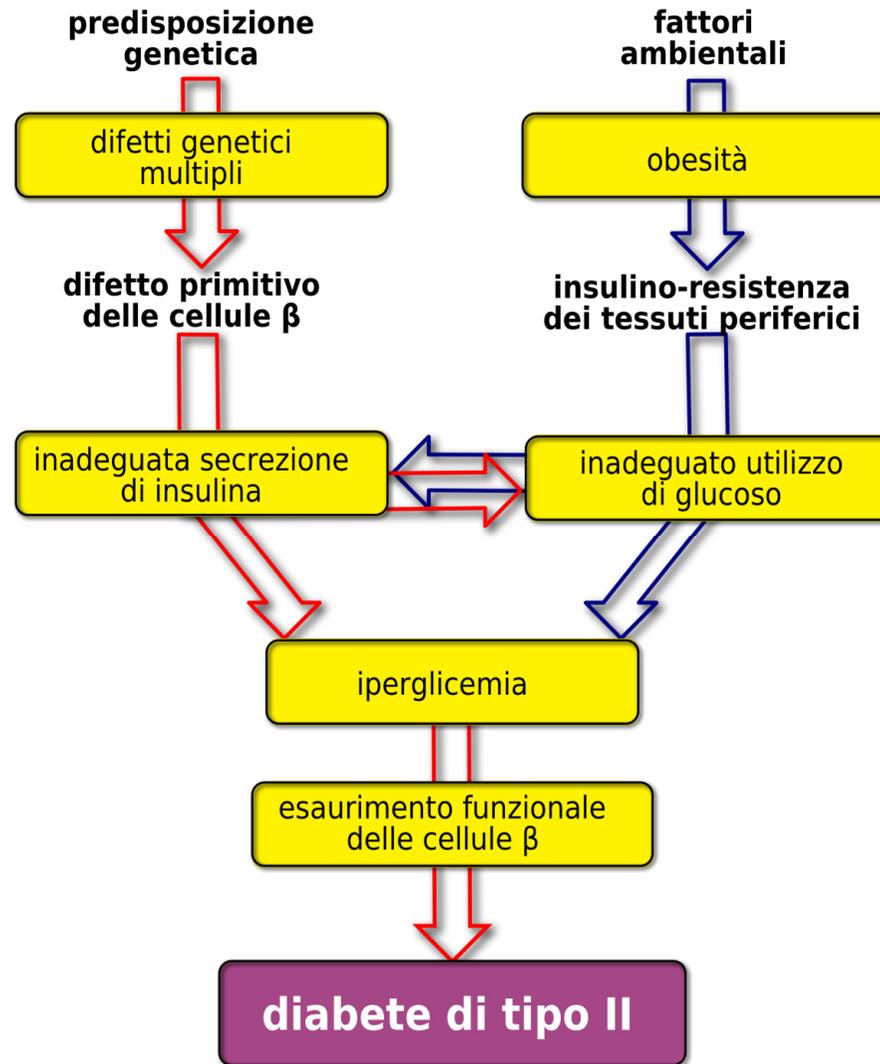
- **Insulino-resistenza**: inadeguata utilizzazione del glucosio da parte delle cellule, che non rispondono normalmente alla stimolazione insulinica; il difetto può essere di tipo pre-recettoriale, recettoriale o post-recettoriale.
- **Difetto della  $\beta$ -cellula**: anche se inizialmente relativo (la secrezione insulinica è a lungo conservata), è ormai ammesso che l'insorgenza del diabete di tipo 2 è legata a una produzione di insulina insufficiente a compensare la resistenza insulinica



## Cause dell'insulino-resistenza periferica

- 1) **MUTAZIONE DEL RECETTORE:** che porta incapacità a legare l'ormone o alterazione della trasduzione del segnale
- 2) **INIBITORI DI CHINASI:** presenza nelle cellule target di inibitori di chinasi sui recettori dell'insulina (PC1 e pp63)
- 3) **MUTAZIONE A CARICO DI IRS1:** (proteina di ancoraggio con SH2) Principale substrato della tirosina chinasi del recettore dell'insulina
- 4) **ALTERAZIONE DEI LIVELLI DI RAD:** che potrebbe bloccare GLUT4 che è il trasportatore del glucosio sensibile all'insulina
- 5) **ECCESSO IN CIRCOLO DI TNF:** che riduce l'attività chinasica del recettore per l'insulina

# Patogenesi del Diabete Mellito di Tipo 2



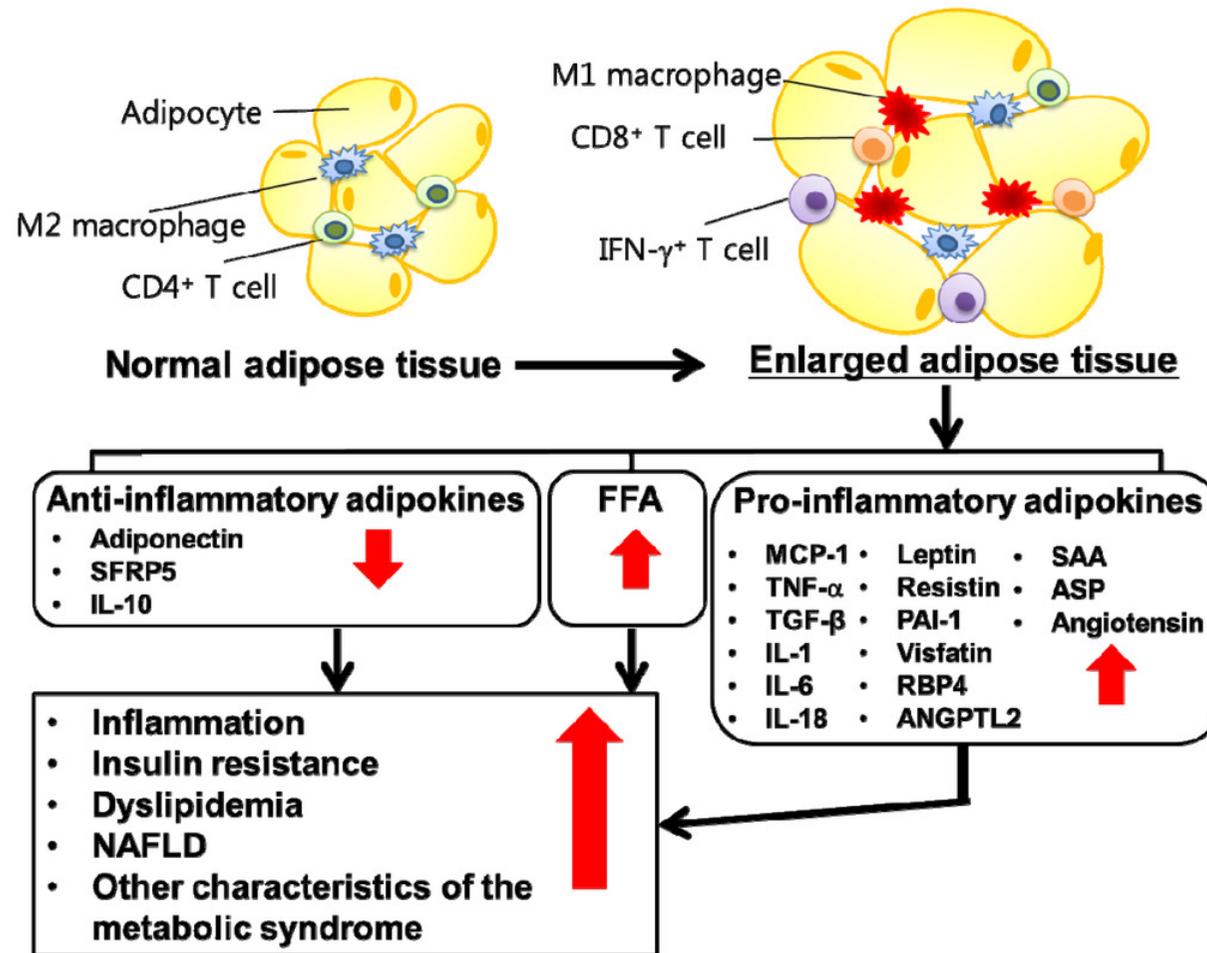
# ***Obesità e diabete di tipo 2***

L'obesità è una condizione caratterizzata da eccessivo peso corporeo per accumulo di tessuto adiposo, in misura tale da influire negativamente sullo stato di salute.

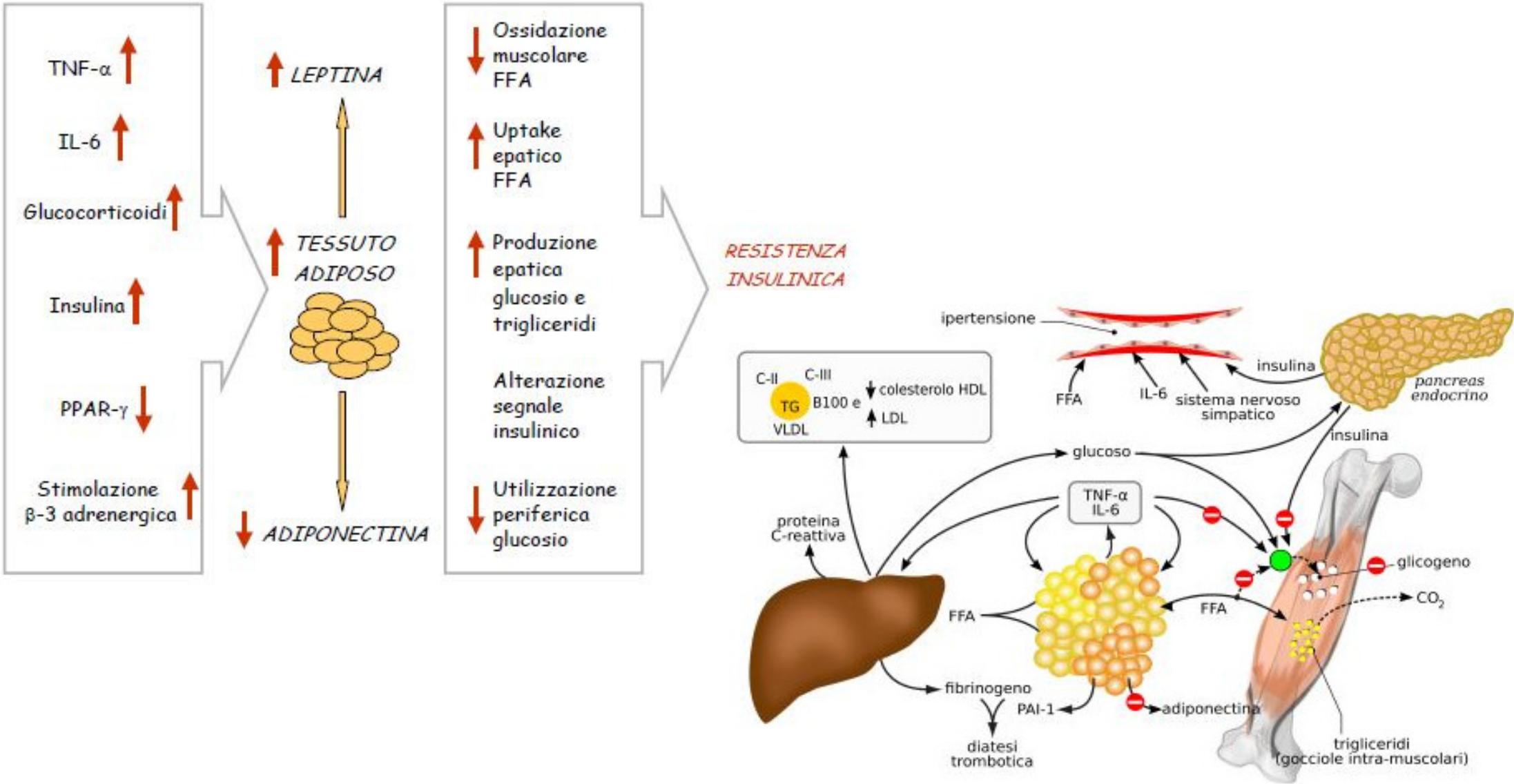
$$\text{BMI} = [\text{peso (kg)}] / [\text{altezza (m)}]^2$$

<16	grave sottopeso
16/18	sottopeso
18/25	normopeso
25/30	sovrappeso
30/35	obeso I° grado
35/40	obeso II° grado
>40	obeso III° grado

# L'obesità è caratterizzata da uno stato di infiammazione cronica di basso grado



# La resistenza all'insulina e la sindrome metabolica

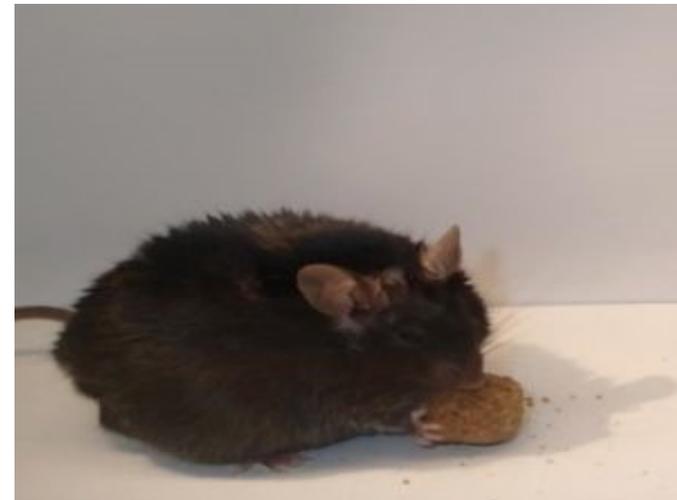


# ***Modelli sperimentali del T2DM e dell'obesità***

**Topo ob/ob  
Topo db/db**



**Topo DIO  
(*Diet-Induced Obesity Mouse*)**



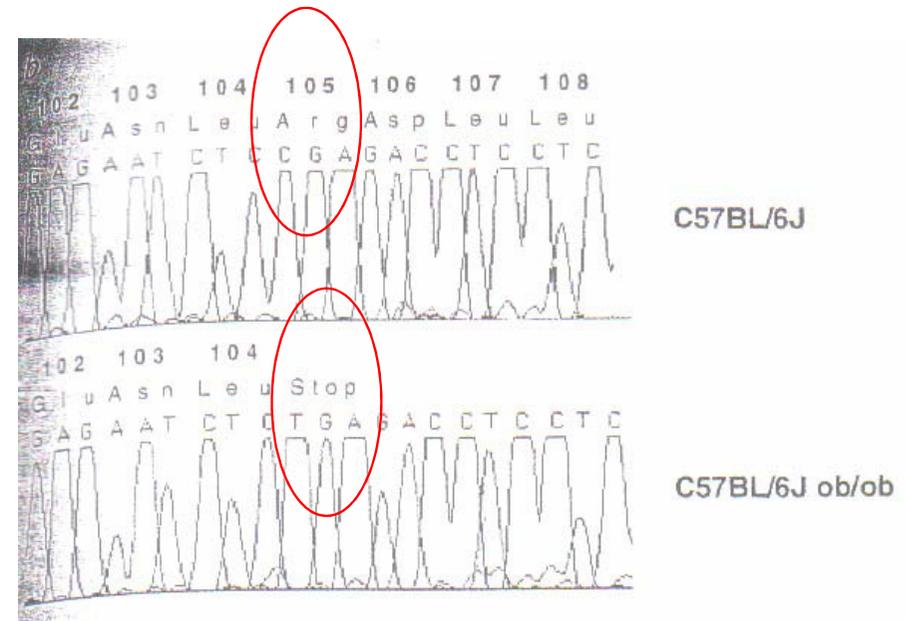
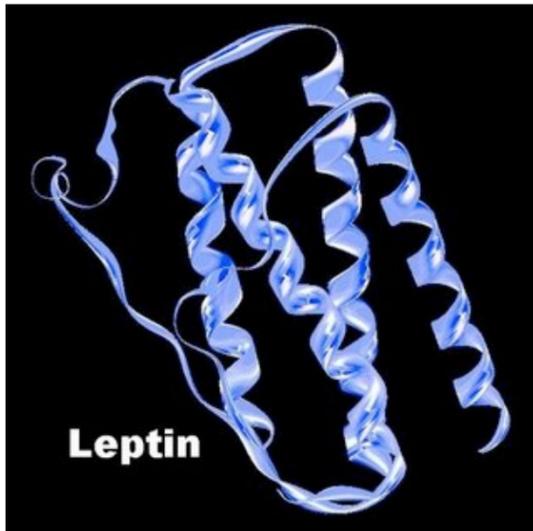
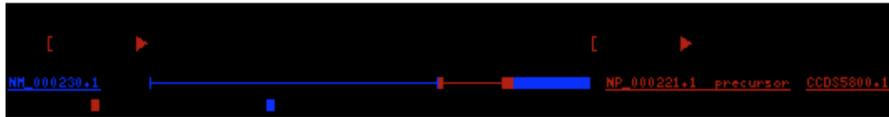
## ***Topo ob/ob e db/db***



- I topi **ob/ob** sono un ceppo di topi omozigoti per difetti nel **gene obese**.
- I topi obesi ob/ob sono privi della proteina **leptina**, il prodotto del gene *obese* e segnale ormonale regolatorio del bilancio energetico.
- I topi **db/db**, sono topi omozigoti per un difetto nel **recettore della leptina**.
- Entrambi i ceppi mostrano una sindrome di obesità caratterizzata da una grave adiposità, iperfagia, ipotermia, iperlipidemia, iperinsulinemia, resistenza all'insulina.

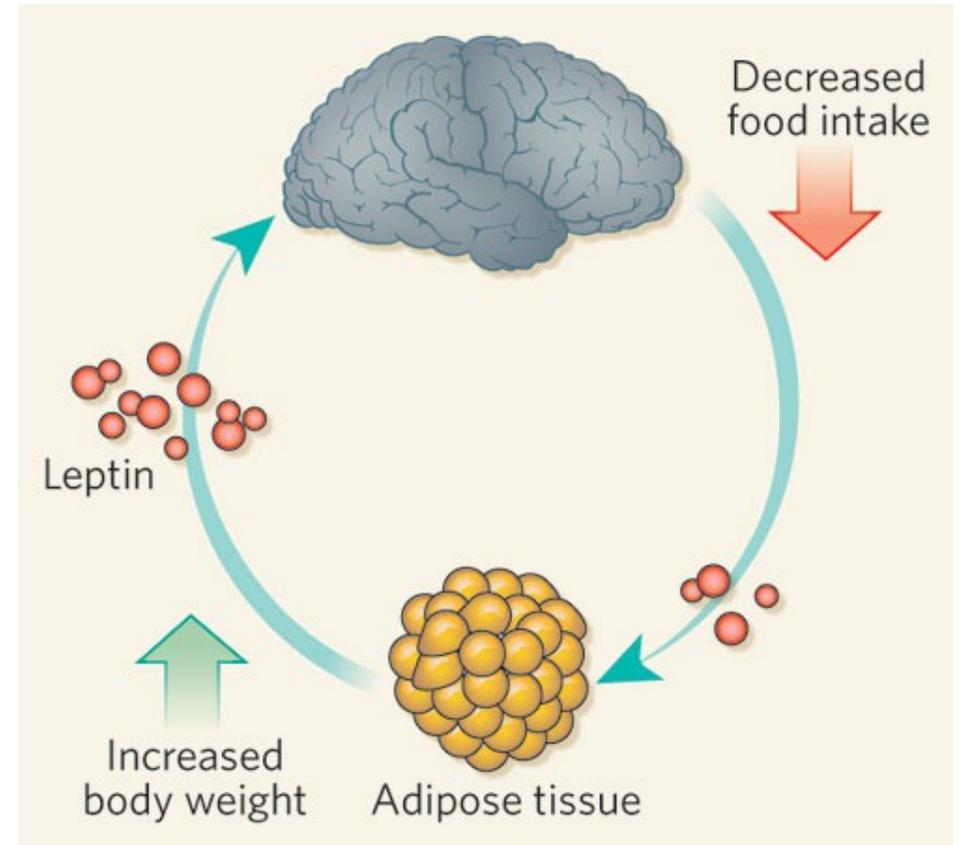
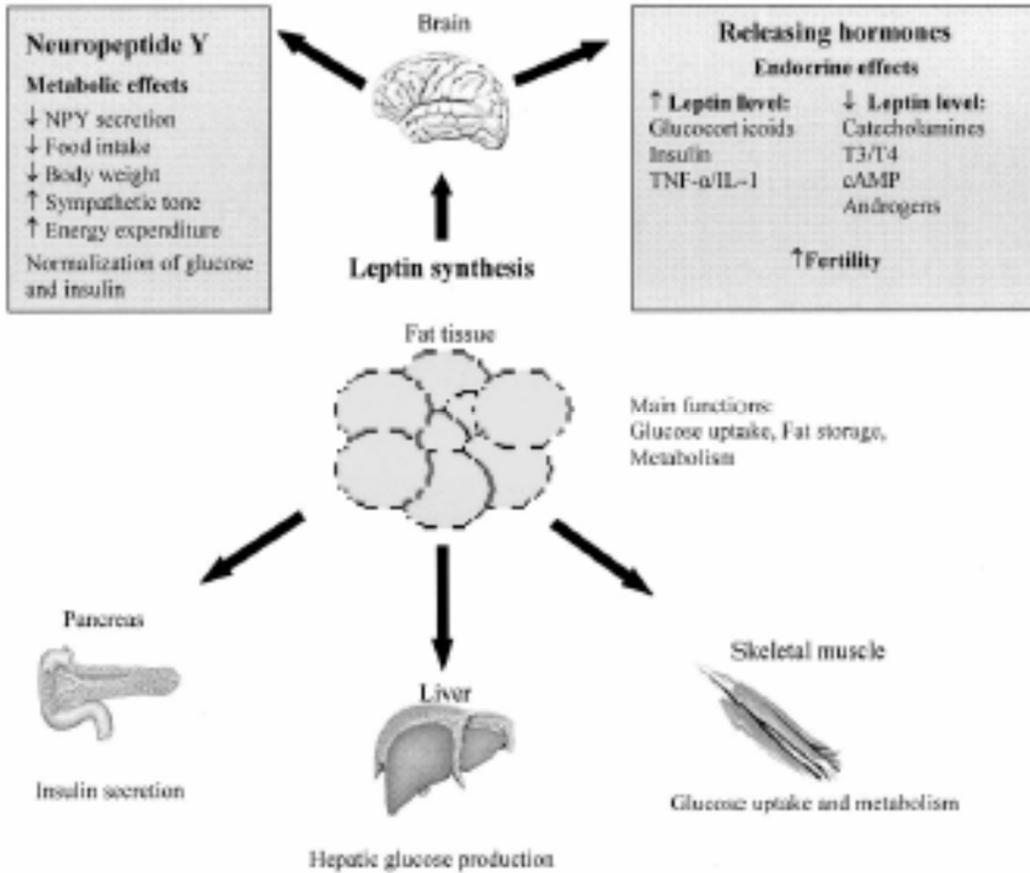
# La leptina

Il gene **ob** (NCBI)

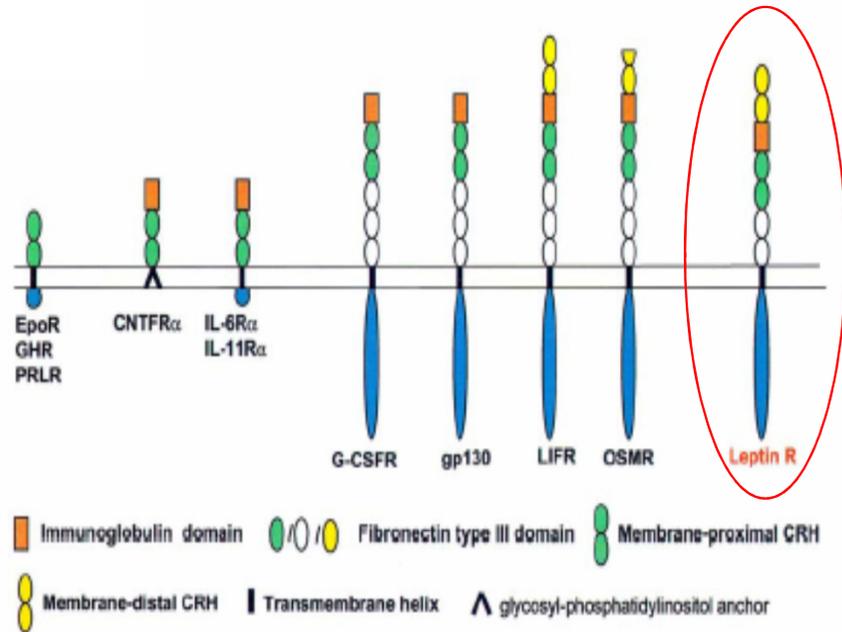


Zhang Y. et al. "*Positional cloning of the mouse obese gene and its human homologue*"  
*Nature* (1994) 372, 425-431

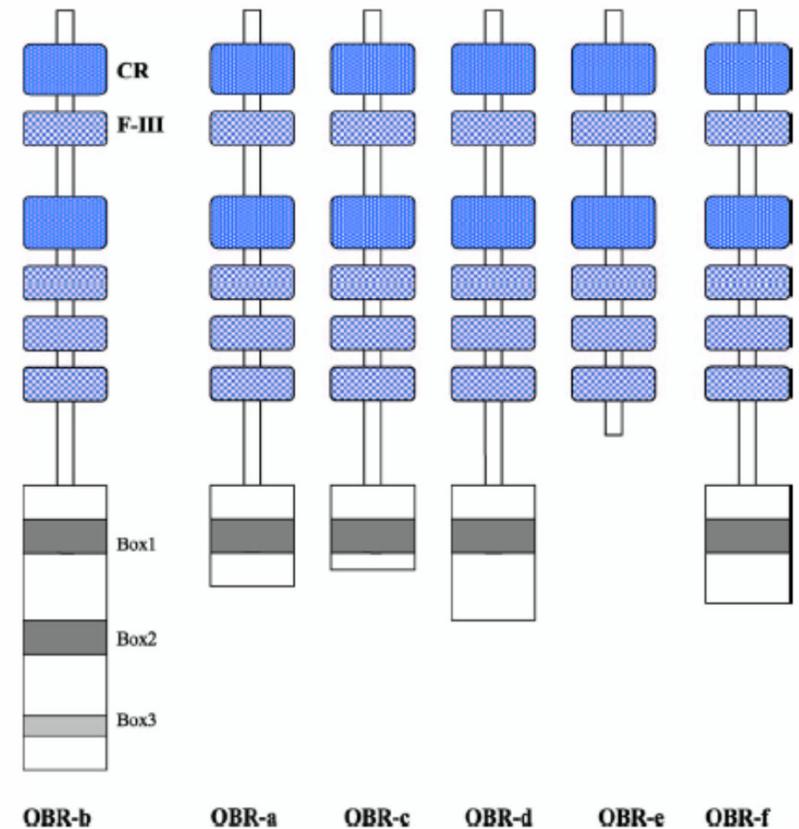
# La leptina regola il metabolismo energetico



## Il recettore per la leptina (OB-R)

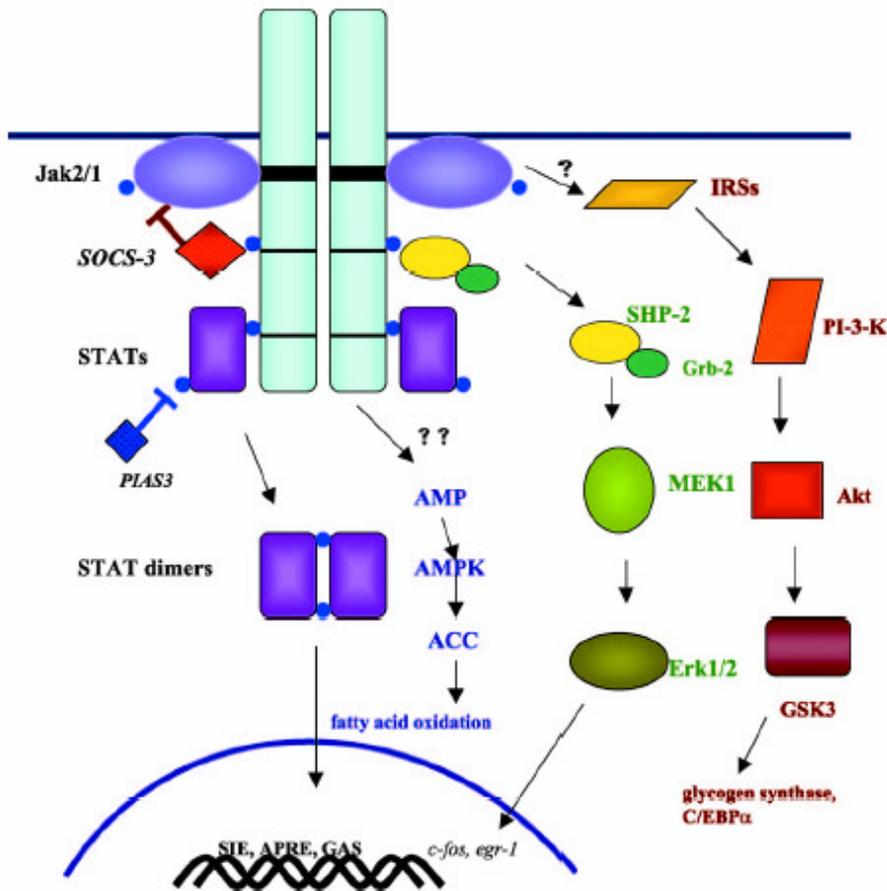


Esistono 6 isoforme del recettore per la leptina prodotte da splicing alternativo



- E' espresso nei i tessuti come i polmoni, il fegato, il muscolo scheletrico, rene e cervello
- Appartiene alla famiglia dei recettori per le citochine di classe I.
- Ha un dominio extracellulare di legame al ligando, un dominio transmembrana e un dominio intracellulare necessario per la traduzione del segnale.

## Il pathway della leptina

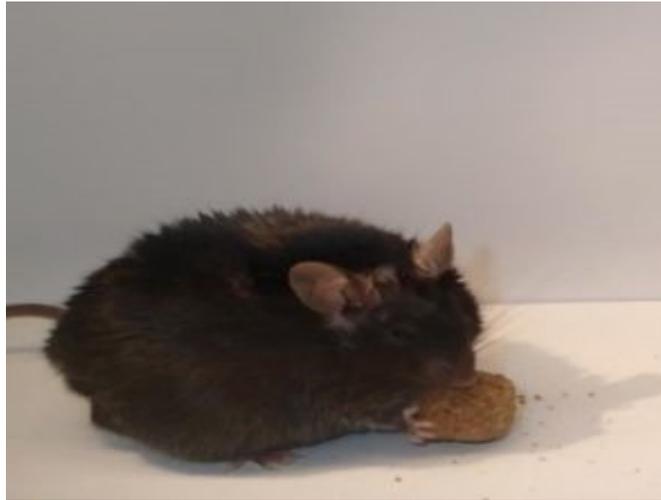


La leptina agisce sui OB-R dell'ipotalamo, facendo diminuire l'appetito. Determina:

- aumento del rilascio della noradrenalina
- aumento di UCP nei mitocondri degli adipociti
- termogenesi

La leptina rende le cellule del muscolo e del fegato più *sensibili* all'insulina.

# ***Topo DIO (Diet-Induced Obesity Mouse)***



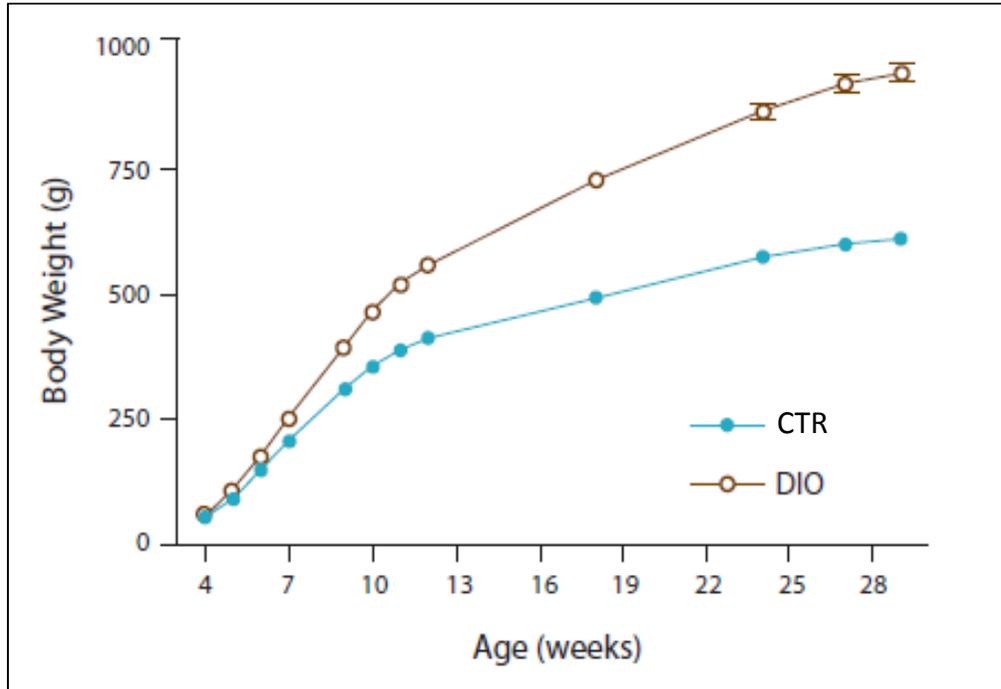
- Il topo DIO (obesità-indotta dalla dieta) è un modello utilizzato per lo studio dell'obesità e delle patologie associate come T2D, ipertensione, ipercolesterolemia e aterosclerosi.

## Obesità-indotta dalla dieta

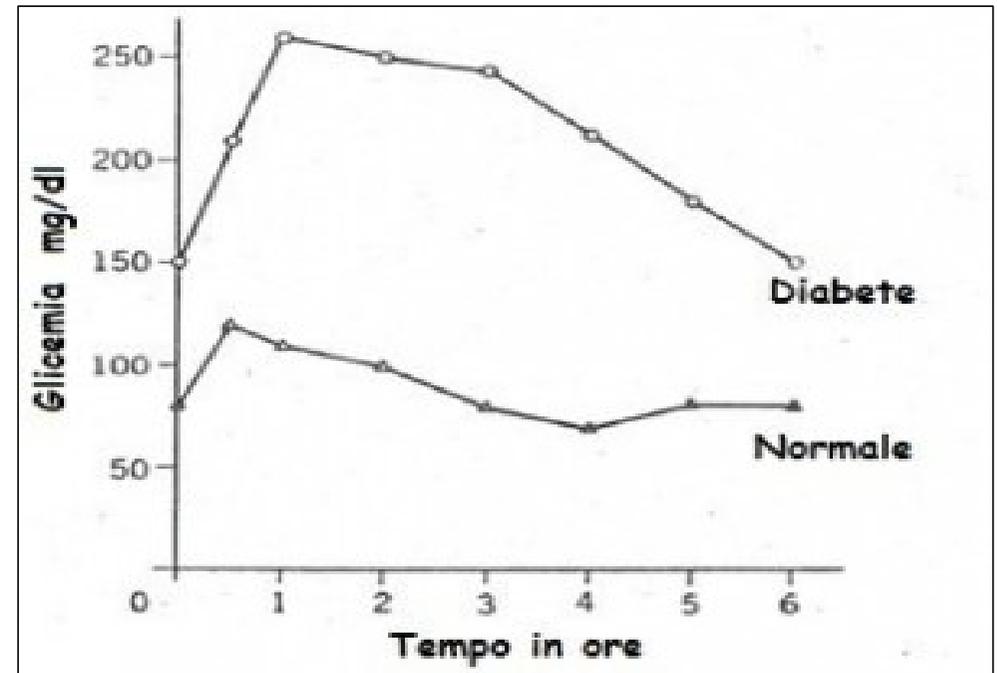
Il topo è nutrito con una dieta speciale ad alto contenuto di grassi/zuccheri .

	DIET	% protein kcal	% CHO kcal	% fat kcal	Additional information
	20189	24	58	18	Standard diet used as control
	17F78	22	61	17	Low glycemic control diet
	45F30	15	40	45	45% of kcal from milk fat – 30% kcal from sucrose
	60F15	15	25	60	60% of kcal from fat (milk fat and lard) – 15% kcal from sucrose
	60F10	18	22	60	«industry standard» diet

## Aumento del peso



## Resistenza all'insulina



# ***ANALISI ex-vivo*** ***DEI MODELLI SPERIMENTALI***

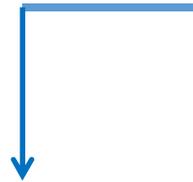


# ***Il Diabete mellito di tipo 1***

**TOPO NOD**  
*(Non-Obese Diabetic mouse)*



*in vitro*



**ANALISI DEL PANCREAS**

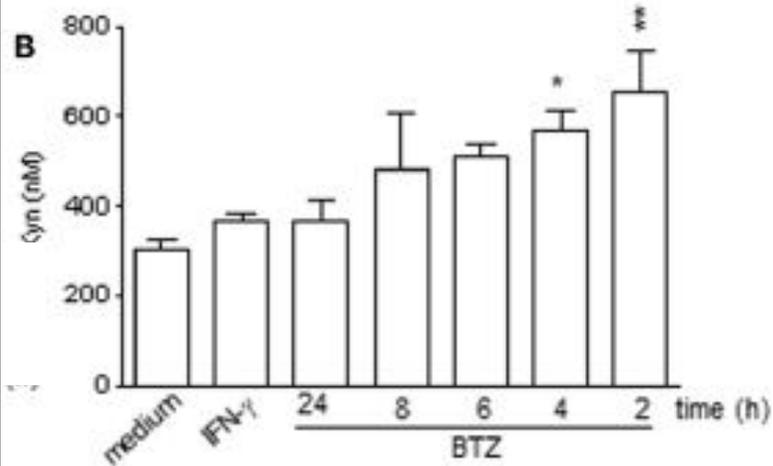
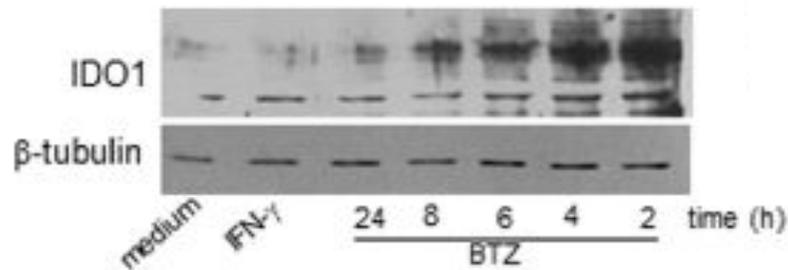
*in vivo*



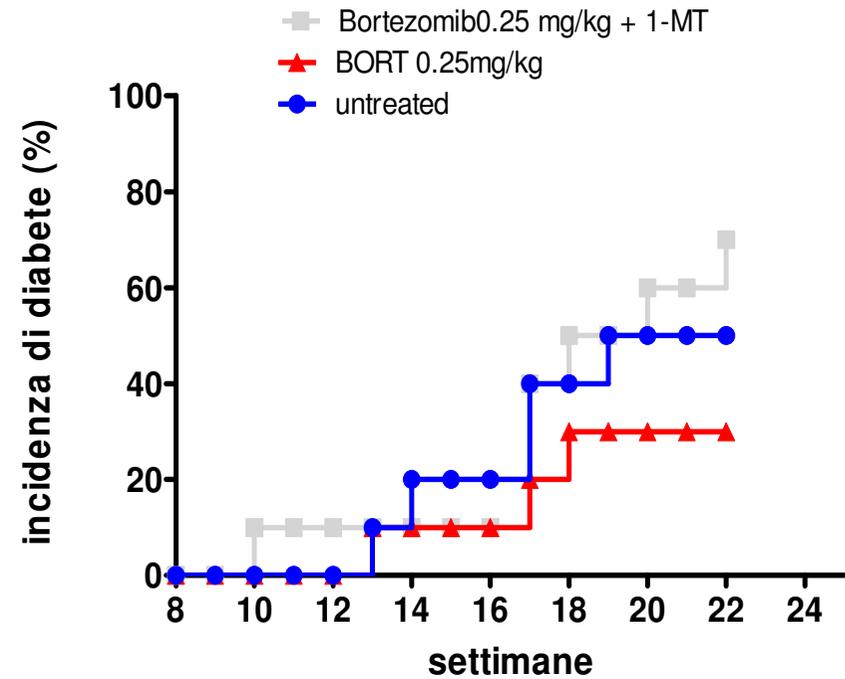
**MONITORAGGIO GLICEMIA**

## Analisi del pancreas

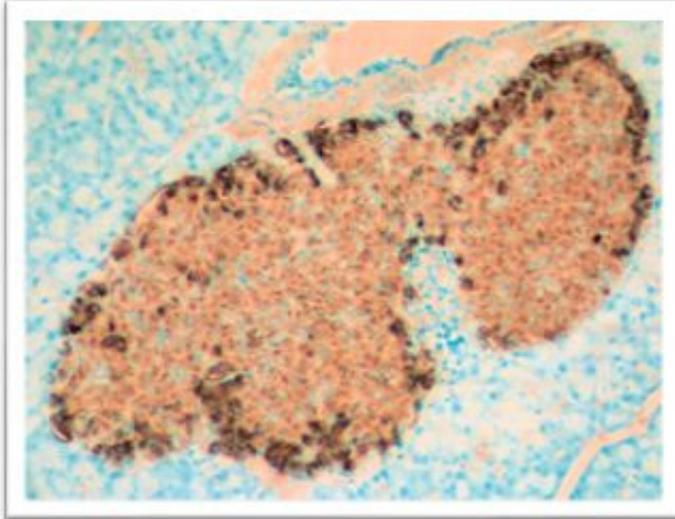
Espressione di IDO1 in pDC di topi NOD



## Monitoraggio della glicemia

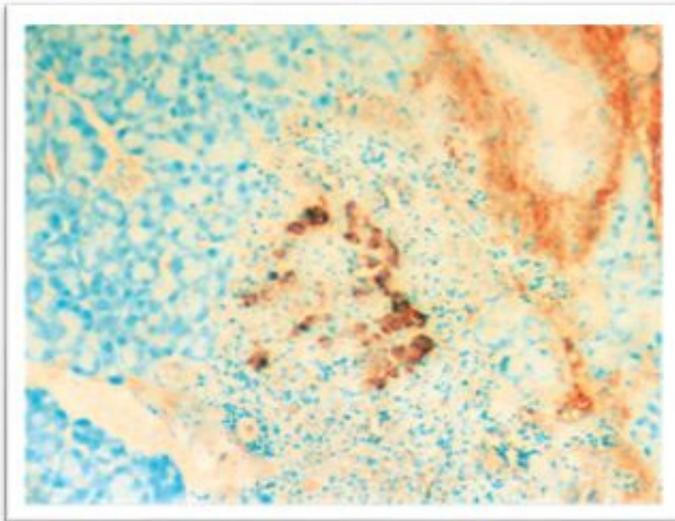


## **Distruzione selettiva delle cellule $\beta$ delle insule di Langerhans nel DM 1**



### **Pancreas normale**

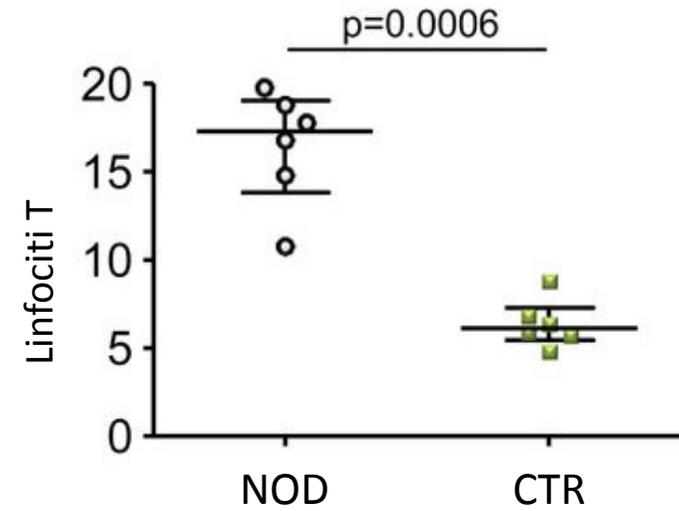
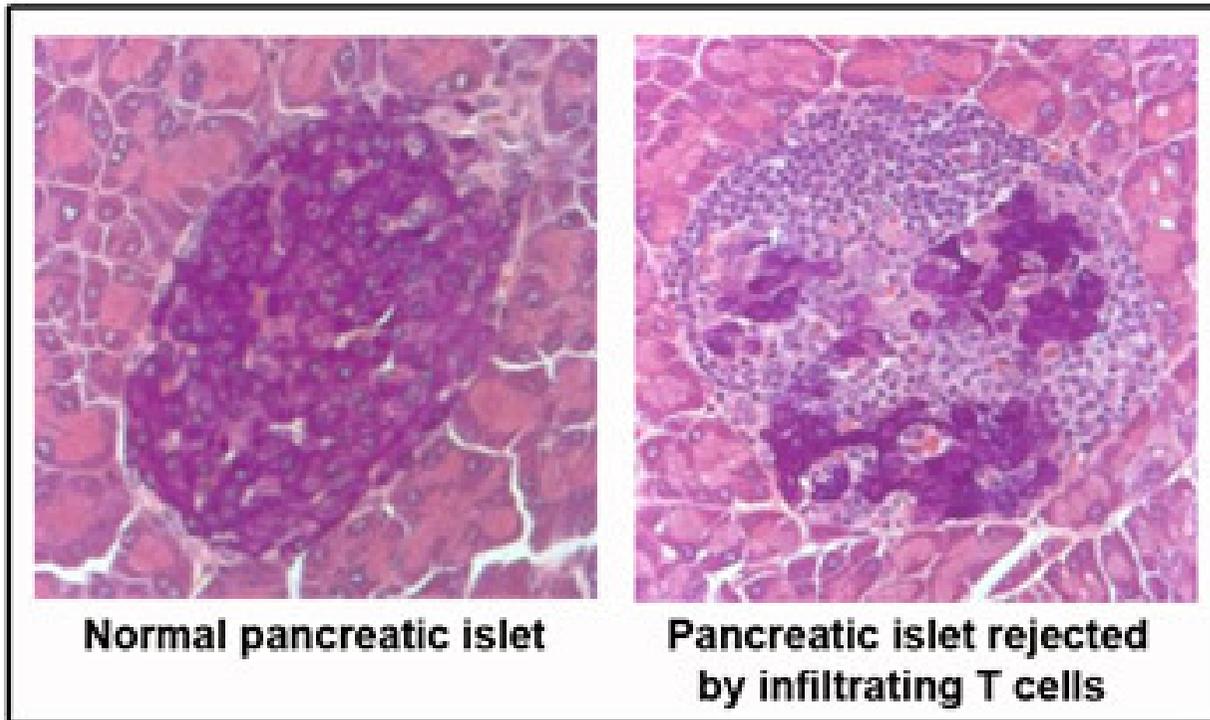
Colorazione immunohistochimica con anticorpi anti-insulina (in marrone) e anti-glucagone (in nero) delle cellule  $\beta$  e  $\alpha$ , rispettivamente, delle insule di Langerhans.



### **Pancreas in modello murino di DM 1**

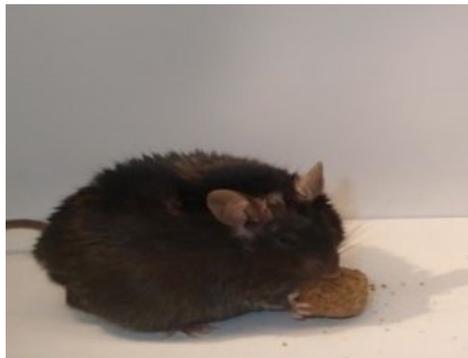
I linfociti infiltrano l'isola di Langerhans e si ha una distruzione selettiva delle cellule  $\beta$ , mentre le cellule  $\alpha$  sono risparmiate. Si osserva anche la perdita della caratteristica morfologia dell'isola.

## Progressiva infiltrazione di immunociti nel pancreas

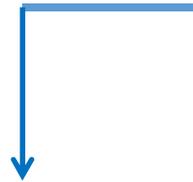


# ***Obesità e diabete di tipo 2***

**TOPO DIO**  
***(Diet-induced Obesity mouse)***



*in vitro*



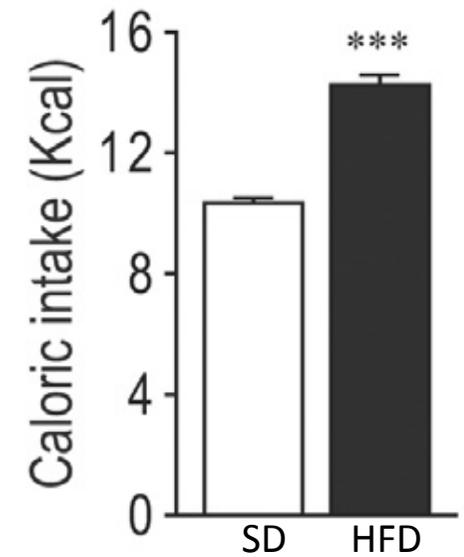
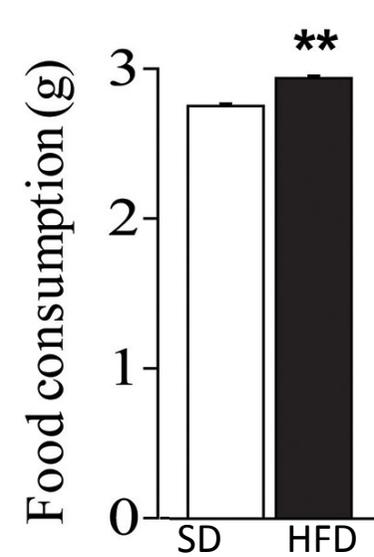
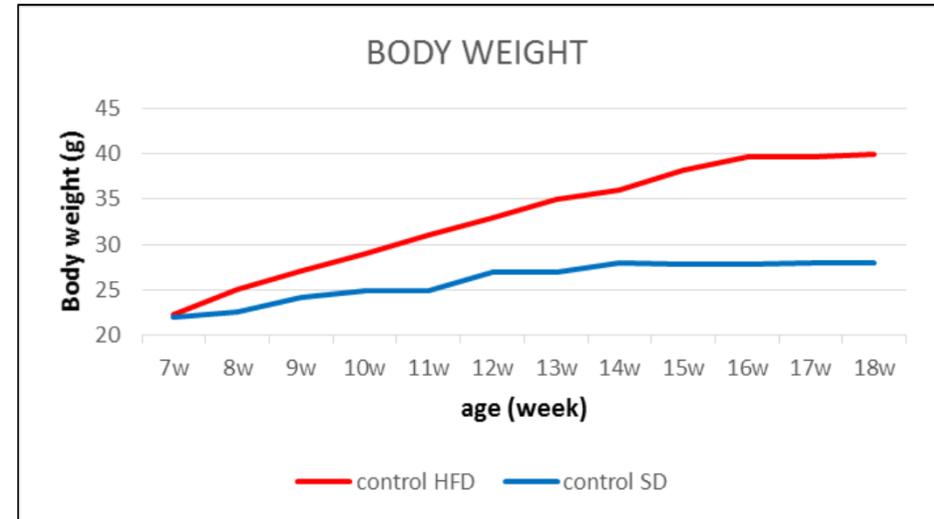
**ANALISI DELL'INFILTRATO  
DEL TESSUTO ADIPOSO**

*in vivo*

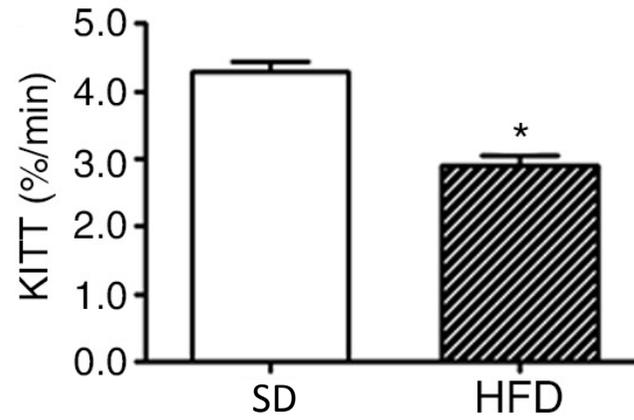
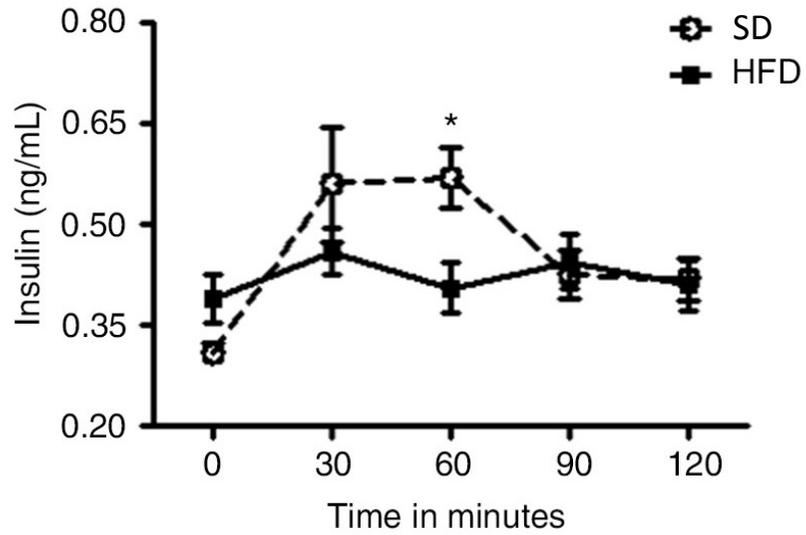
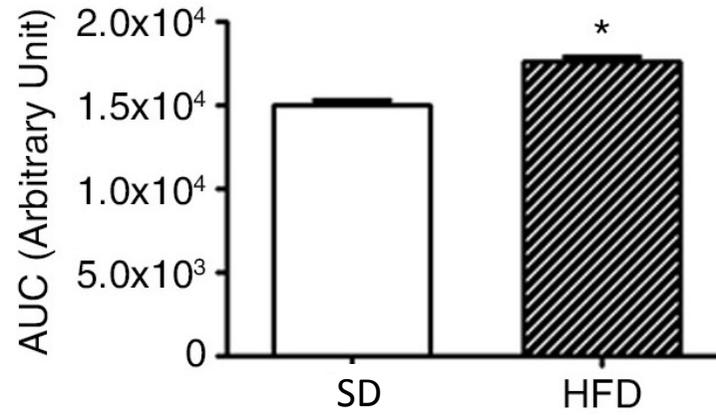
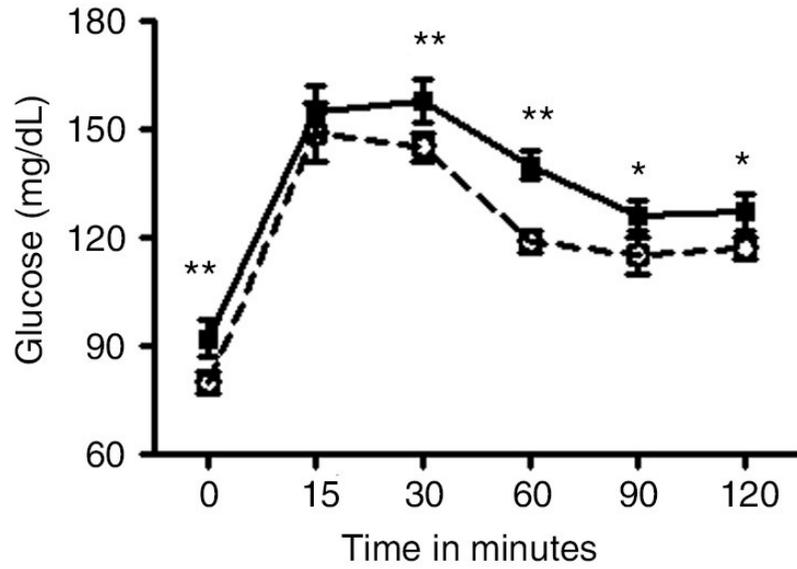


**MONITORAGGIO del PESO  
e della GLICEMIA**

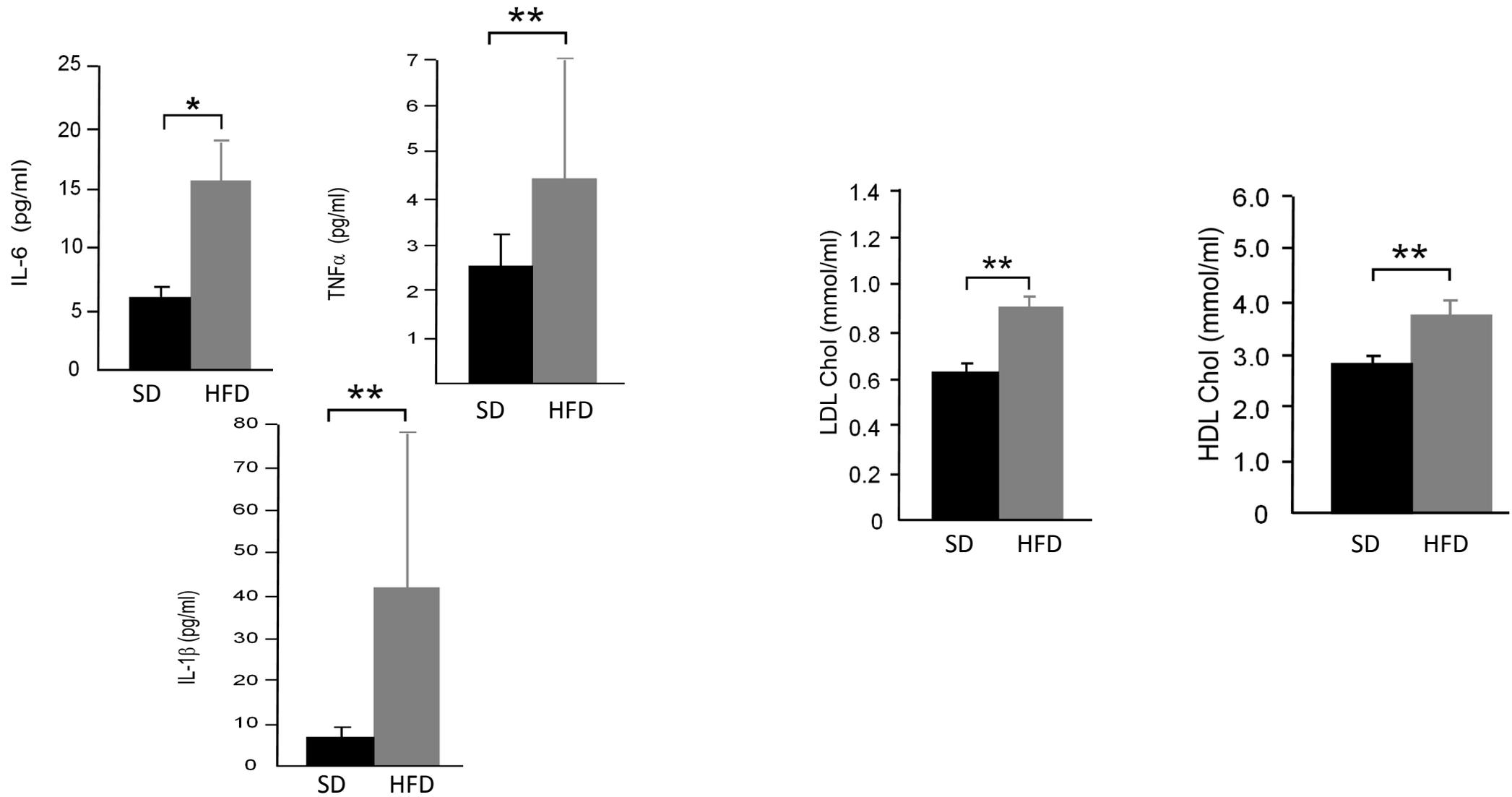
## La dieta ad alto contenuto di grassi induce l'obesità



## High-Fat Diet-Induced insulin resistance



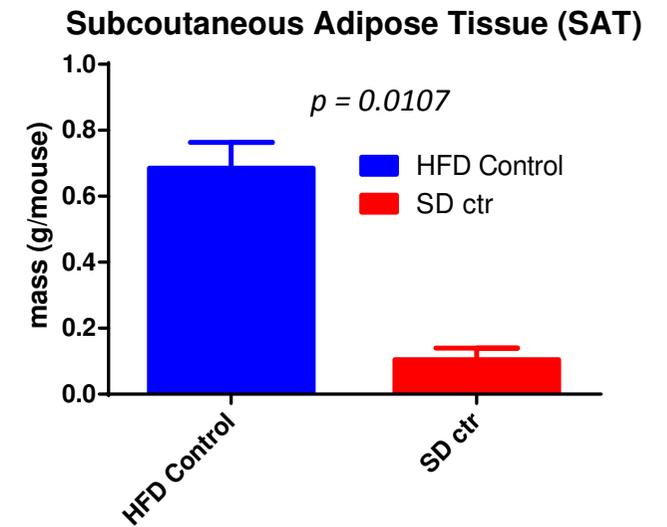
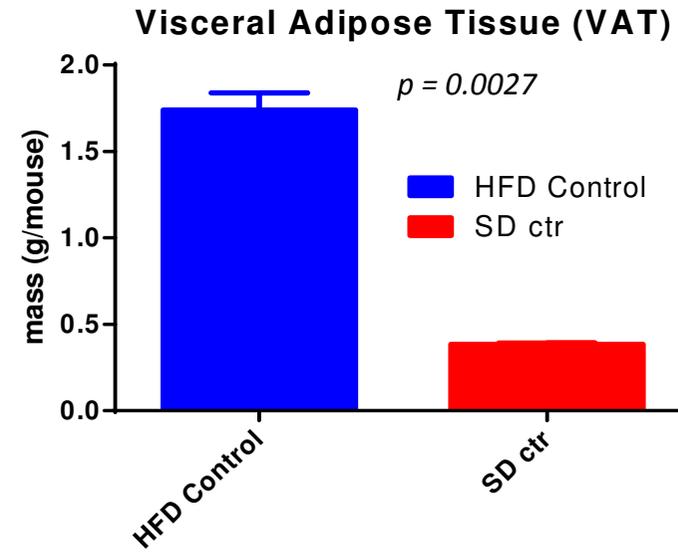
## Analisi delle proteine e dei lipidi plasmatici



# Analisi morfometrica del tessuto adiposo

OBESO

MAGRO

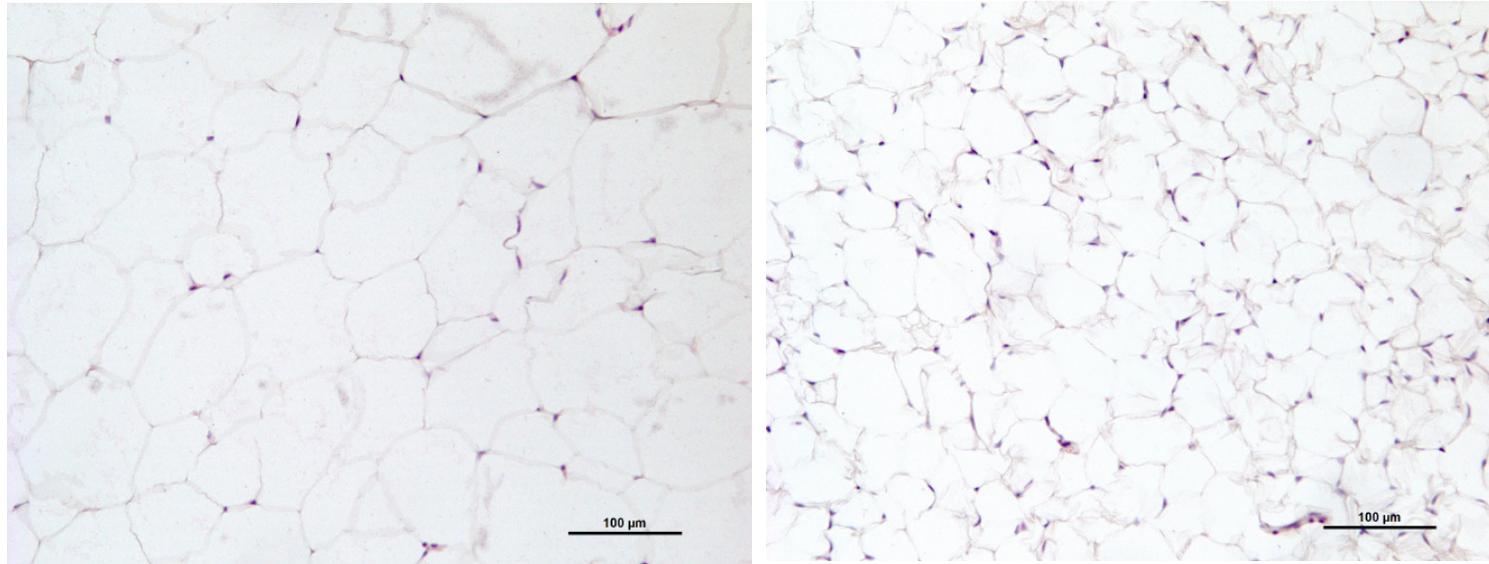


# Analisi morfometrica del tessuto adiposo

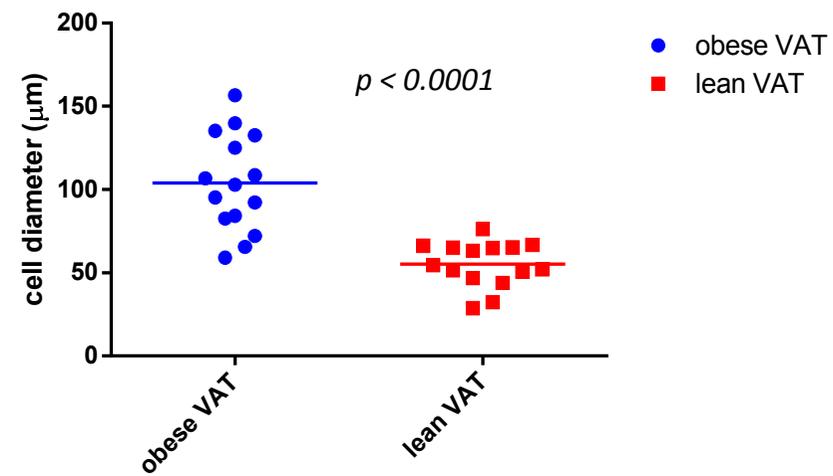
OBESO

H&E STAINING

MAGRO



VAT adipocytes

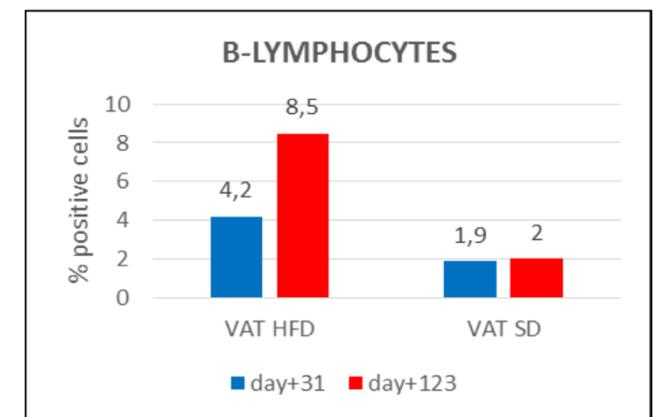
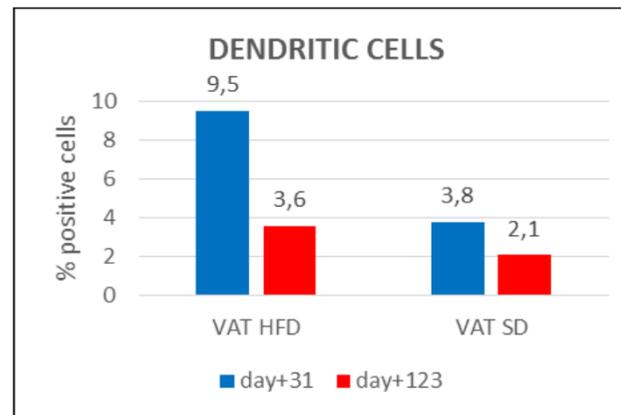
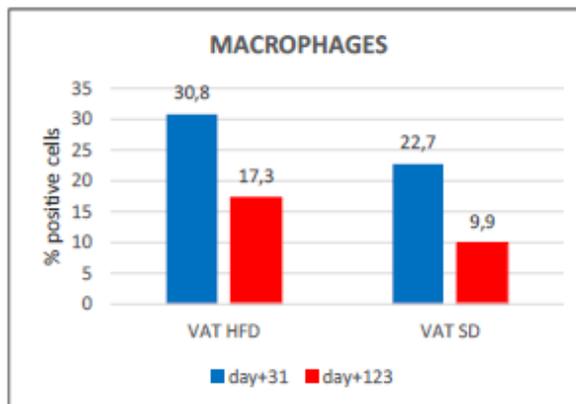
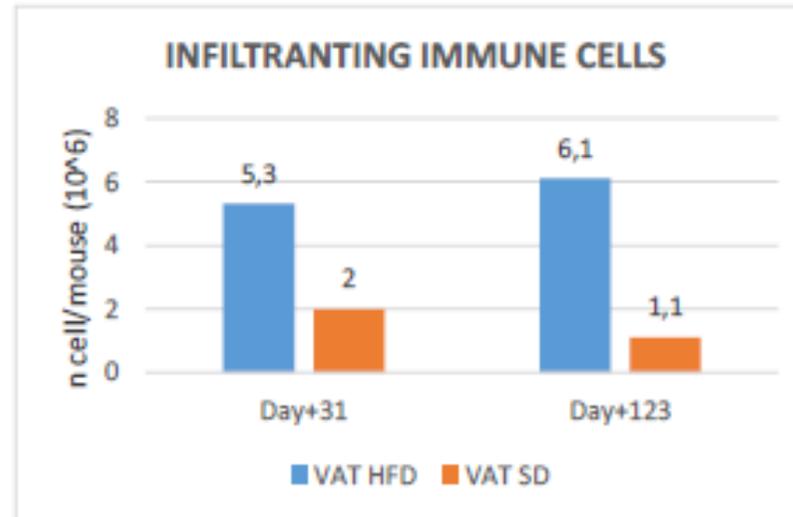


# Analisi dell'infiltrato immunitario nel tessuto adiposo viscerale

**OBESO**



**VAT**

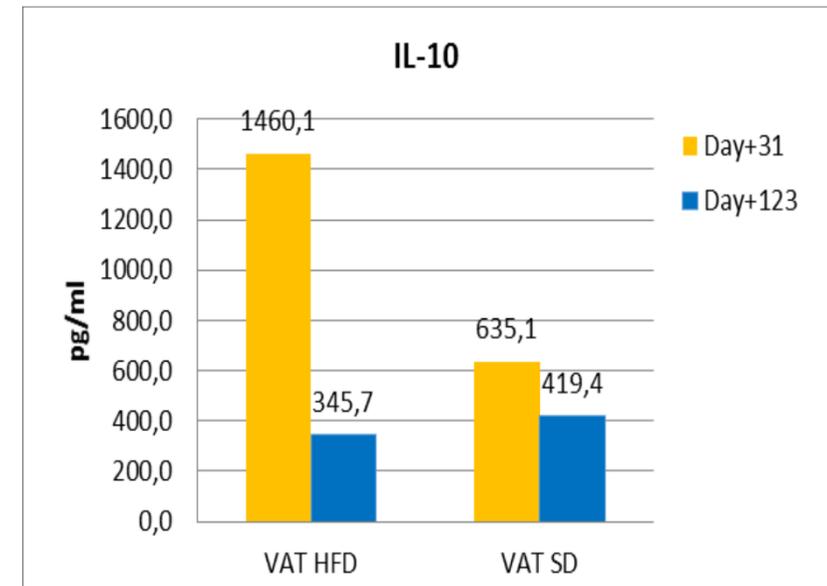
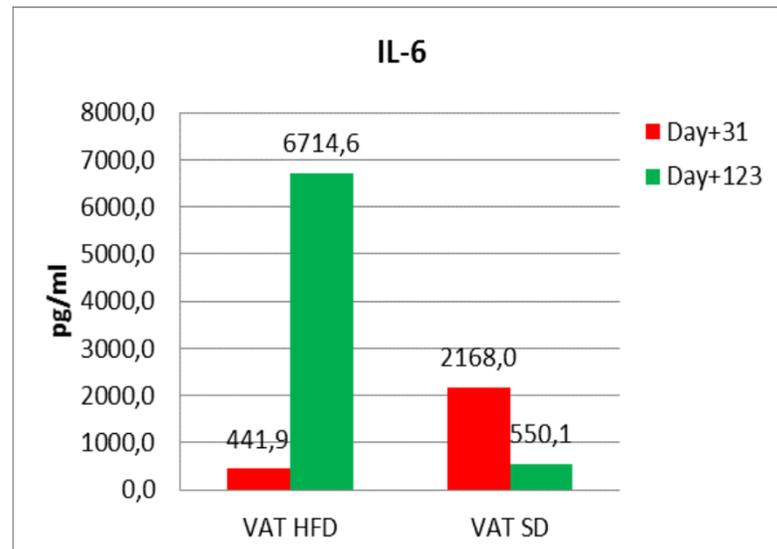


# Analisi della produzione citochinica dell'infiltrato immunitario del VAT

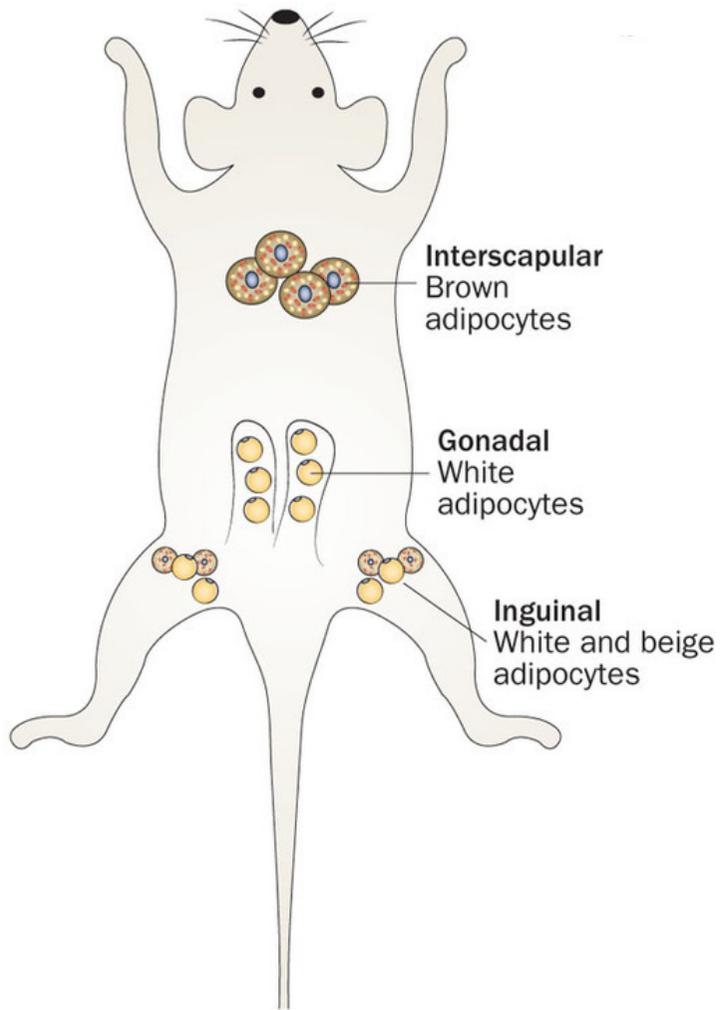
**OBESO**



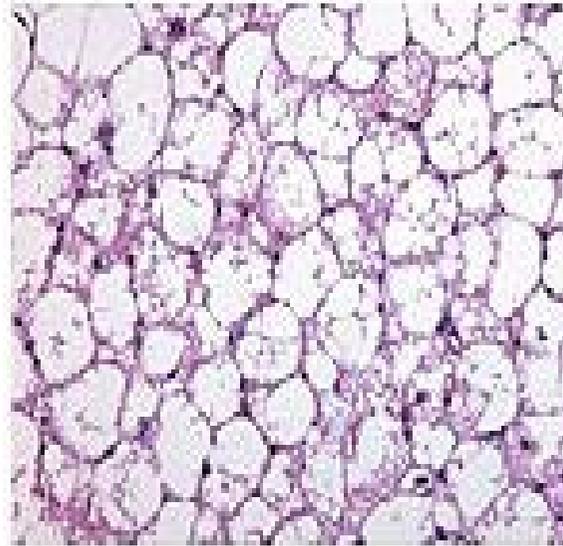
**VAT**



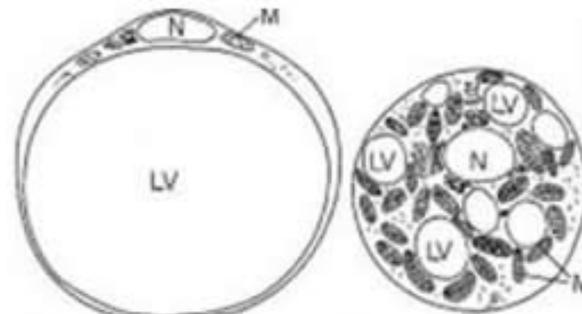
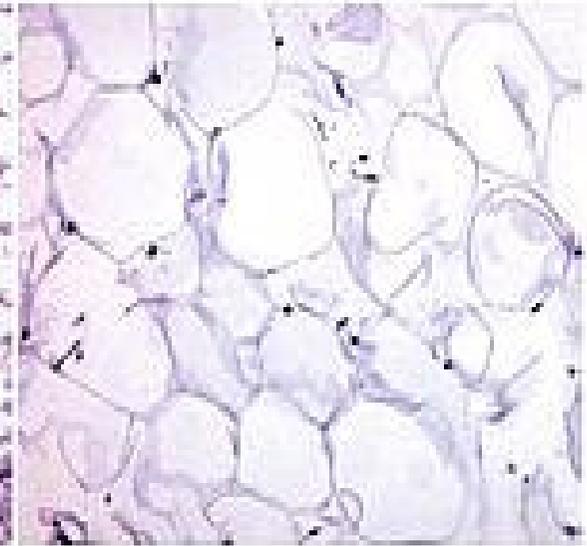
# *Le diverse tipologie di tessuto adiposo*



Brown Fat (or BAT)



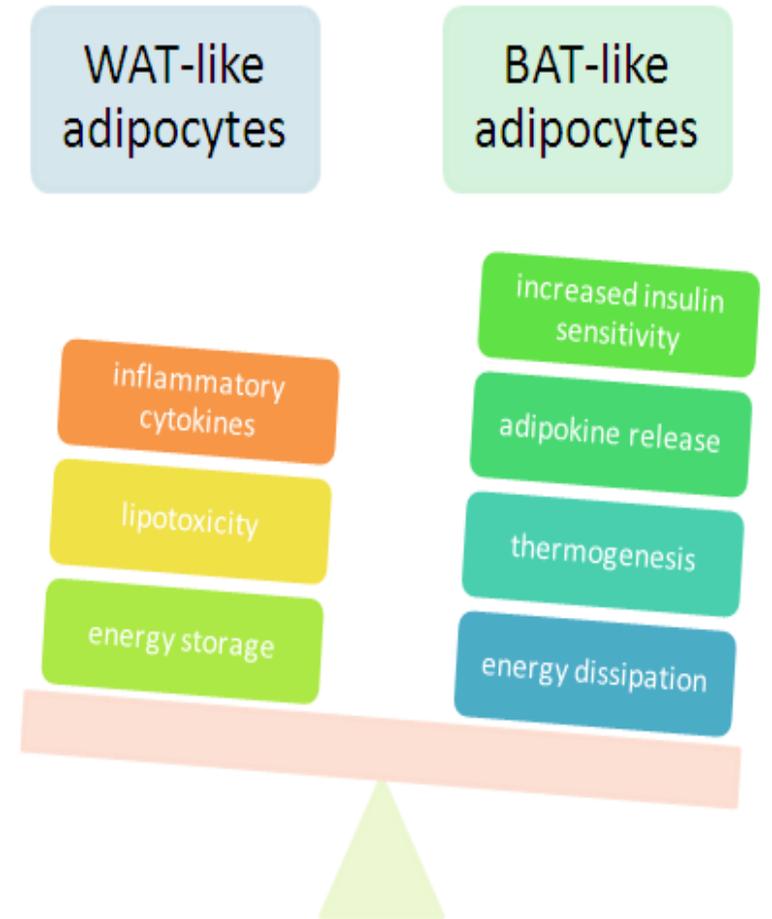
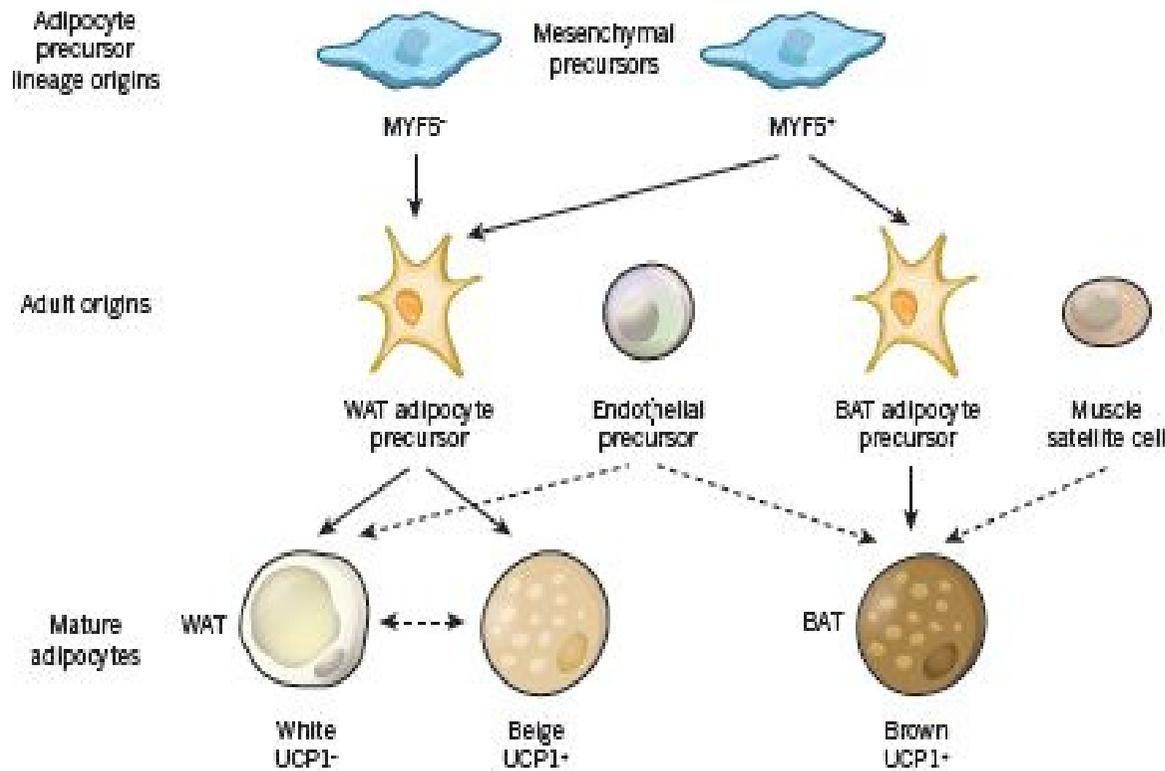
White Fat



Tessuto adiposo  
bianco

Tessuto adiposo  
bruno

# White adipose tissue vs Brown adipose tissue



# *Strategie nel trattamento del diabete*

## **Terapia Farmacologica:**

- Ipoglicemizzanti orali
- Insulina
- ACE-inibitori



## **Terapia non farmacologica:**

- Dieta
- Attività fisica



# Terapia Farmacologica

## Ipoglicemizzanti orali

- Aumentano la secrezione di insulina: Sulfaniluree o meglitinidi
- Aumentano la risposta all'insulina endogena: Biguanidi (metformina) o tiazolidinedioni
- Modificano l'assorbimento dei carboidrati: Inibitori dell'alfa-glucosidasi

## Insulina

- **Ultrarapida:** emivita 4-5 ore, da praticare 0-15 minuti prima del pasto. Simile all'insulina endogena.
- **Rapida:** emivita 6-8 ore, da praticare 20-30 minuti prima del pasto.
- **Intermedia:** emivita 12-16 ore, picco a 6-10 ore.
- **Ultralenta:** emivita 18-20 ore.
- **Long-acting:** glargina e levimir. Emivita 24 e 20 ore rispettivamente

# Nuovi *target* terapeutici per il diabete e l'obesità

