



**UNIVERSITA' DEGLI STUDI DI PISA**

Facoltà di Scienze Matematiche Fisiche e Naturali

Corso di Laurea Magistrale in Biologia Applicata alla

Biomedicina

TESI DI LAUREA

**“Nuove sperimentazioni in vitro sulla terapia  
dell'oftalmopatia basedowiana”**

**Relatore**

Dr. Marinò Michele

**Candidato**

Giovanna Rotondo Dottore

**Anno Accademico 2012-2013**

## **Riassunto**

L'oftalmopatia basedowiana è una sindrome autoimmune caratteristicamente associata alle malattie autoimmuni della tiroide, in particolare al morbo di Basedow. E' caratterizzata da una proliferazione incontrollata dei fibroblasti orbitari e da una aumentata produzione di glicosaminoglicani da parte degli stessi, in particolare di acido ialuronico. La terapia della oftalmopatia grave è basata sull'uso di glucocorticoidi ad alte dosi. Nell'oftalmopatia lieve, invece, non ci sono terapie disponibili standardizzate e l'uso dei glucocorticoidi ad alte dosi non è giustificato a causa del cattivo rapporto benefici/effetti collaterali. Per questo motivo sono in via di sperimentazione nuove terapie che prevedano l'impiego di farmaci possibilmente privi di effetti collaterali rilevanti. La presente tesi riporta i risultati di studi in *vitro* finalizzati a valutare l'effetto di alcuni farmaci potenzialmente candidati, condotti mediante l'utilizzo di colture primarie di fibroblasti orbitari provenienti da pazienti con oftalmopatia e da soggetti

senza oftalmopatia.

Il disegno sperimentale degli studi riportati prevedeva la valutazione degli effetti di tre diversi farmaci sulla vitalità cellulare, sulla proliferazione, sulla necrosi, sull'apoptosi, sul rilascio di acido ialuronico nel mezzo di coltura, e sul ciclo cellulare. I farmaci impiegati sono:

1) Selenio, una molecola con proprietà anti-ossidanti che è già stata dimostrata essere efficace nella terapia della oftalmopatia lieve. A questo proposito si segnala che lo stress ossidativo è uno dei meccanismi implicati nella patogenesi dell'oftalmopatia basedowiana.

2) Quercetina, un flavonoide con proprietà anti-ossidanti, del quale è stato precedentemente dimostrato un effetto anti-proliferativo su fibroblasti di altra origine.

3) Enalapril, un farmaco anti-ipertensivo che è stato dimostrato avere un effetto anti-proliferativo su fibroblasti di altra origine.

Il trattamento dei fibroblasti orbitari con selenio ha

determinato un aumento della vitalità cellulare, precedentemente ridotta da stress ossidativo, ed una riduzione del rilascio di acido ialuronico indotto dallo stress ossidativo.

Sia la quercetina che l'enalapril, con meccanismi diversi, hanno avuto una azione anti-proliferativa sui fibroblasti orbitari, con riduzione del rilascio di acido ialuronico.

Tali risultati, sia pur preliminari, pongono le basi per un possibile impiego della quercetina e dell'enalapril nella pratica clinica. Riguardo al selenio, come riportato sopra, l'uso nella pratica clinica è già stato stabilito, ma i nostri dati, chiarendone i meccanismi di azione a livello cellulare, potrebbero consentirne un impiego anche più ampio.

# Indice

<b>1</b>	<b>Introduzione</b>	Pag. 7
	<i>Presentazione dell' oftalmopatia basedowiana</i>	Pag. 7
	<i>Epidemiologia</i>	Pag. 9
	<i>Eziologia</i>	Pag. 10
	<i>Meccanismi patogenetici</i>	Pag. 13
	<i>Anatomia patologica</i>	Pag. 15
	<i>Manifestazioni cliniche</i>	Pag. 16
	<i>Diagnosi</i>	Pag. 19
	<i>Terapia</i>	Pag. 19
	<i>Nuovi farmaci per l' oftalmopatia basedowiana</i>	Pag. 22
	<i>Selenio</i>	Pag. 22
	<i>Quercetina</i>	Pag. 24
	<i>Enalapril</i>	Pag. 25
<b>2</b>	<b>Scopo della tesi</b>	Pag. 27
<b>3</b>	<b>Metodi</b>	Pag. 29
	<i>Colture primarie di fibroblasti orbitari</i>	Pag. 29
	<i>Preparazione degli estratti cellulari</i>	Pag. 30
	<i>Determinazione delle concentrazioni delle molecole usate</i>	Pag. 30
	<i>Saggio di proliferazione cellulare</i>	Pag. 31
	<i>Saggio per la determinazione della vitalità cellulare</i>	Pag. 31
	<i>Saggio per la determinazione della necrosi</i>	Pag. 33
	<i>Saggio per la determinazione dell'apoptosi</i>	Pag. 34

<i>Saggio per la determinazione del rilascio di acido ialuronico</i>	Pag. 35
<i>Analisi del ciclo cellulare</i>	Pag. 36
<i>Presentazione dei risultati e analisi statistica</i>	Pag. 37
<b>4 Risultati</b>	Pag. 38
<i>Selenio</i>	Pag.38
<i>Il selenio aumenta la vitalità cellulare</i>	Pag. 38
<i>Il selenio riduce la necrosi</i>	Pag. 38
<i>Il selenio riduce il rilascio di acido ialuronico</i>	Pag. 39
 <i>Quercetina</i>	Pag. 40
<i>La quercetina inibisce la proliferazione dei fibroblasti orbitari</i>	Pag. 40
<i>La quercetina induce necrosi nei fibroblasti orbitari</i>	Pag. 41
<i>La quercetina non induce apoptosi nei fibroblasti orbitari</i>	Pag. 42
<i>La quercetina arresta il ciclo cellulare</i>	Pag. 42
<i>La quercetina riduce il rilascio di acido ialuronico</i>	Pag. 43
 <i>Enalapril</i>	Pag. 45
<i>L'enalapril inibisce la proliferazione dei fibroblasti orbitari</i>	Pag. 45
<i>L'enalapril non influenza la necrosi nei fibroblasti orbitari</i>	Pag. 45
<i>L'enalapril non induce apoptosi nei fibroblasti orbitari</i>	Pag. 46
<i>L'enalapril riduce il rilascio di acido ialuronico nei         fibroblasti orbitari</i>	Pag. 46

<b>5</b>	<b>Discussione</b>	Pag. 48
<b>6</b>	<b>Bibliografia</b>	Pag. 59
<b>7</b>	<b>Legenda delle figure</b>	Pag. 68
<b>8</b>	<b>Figure</b>	Pag. 77

# 1 Introduzione

## Presentazione dell'oftalmopatia basedowiana

L'oftalmopatia basedowiana è il complesso di manifestazioni oculari che si osserva in circa il 50% dei pazienti con morbo di Basedow e più raramente in pazienti con tiroidite cronica autoimmune (~5%) (1). Ancora più raramente l'oftalmopatia basedowiana può essere osservata in assenza di tireopatie clinicamente evidenti (*Euthyroid Graves' Disease*), benchè alterazioni tiroidee subcliniche siano quasi sempre presenti [gozzo diffuso, auto-anticorpi anti-tiroide circolanti, ormone tireotropo (TSH) indosabile] (1). Circa il 15% dei pazienti con *Euthyroid Graves' Disease* può sviluppare col tempo un ipertiroidismo, andando così ad incrementare la percentuale di casi in cui l'oftalmopatia è associata al morbo di Basedow. Quest'ultimo, nella sua presentazione classica, è caratterizzato da gozzo diffuso, ipertiroidismo ed oftalmopatia, e meno frequentemente da mixedema pretibiale (ispessimento cutaneo di natura infiammatoria della regione pretibiale) ed acropachia

(ingrossamento dell'ultima falange delle dita delle mani, che assumono un aspetto “a bacchetta di tamburo”) (1).

La patogenesi del morbo di Basedow è autoimmune e la causa dell'ipertiroidismo è rappresentata dalla produzione da parte del sistema immunitario di autoanticorpi stimolanti il recettore del TSH. Tali autoanticorpi, mediante attivazione del recettore stesso, determinano una eccessiva crescita delle cellule follicolari tiroidee ed inducono un aumento della sintesi e del rilascio di ormoni tiroidei (2).

Benché le manifestazioni cliniche dell'oftalmopatia basedowiana possano variare da paziente a paziente, l'esoftalmo è di gran lunga la più comune ed è il segno clinico distintivo della malattia (1). Ad esso sono di solito associate manifestazioni infiammatorie a carico dei tessuti molli, alterazioni della motilità dei muscoli orbitari, con conseguenti strabismo e/o diplopia, e nei casi più gravi e fortunatamente rari, alterazioni del visus fino alla cecità, questi ultimi dovuti principalmente a compressione dei nervi ottici al livello

dell'apice orbitario (1). Occorre tenere presente che la modalità di presentazione dell'oftalmopatia basedowiana può variare notevolmente a seconda che la si osservi nella fase precoce o tardiva, e non ultimo in relazione alle terapie eventualmente effettuate. In ogni caso, le manifestazioni dell'oftalmopatia basedowiana riflettono le alterazioni anatomico-patologiche dei tessuti orbitari, che sono la conseguenza di eventi patogenetici fino ad ora solo in parte chiariti (1).

### Epidemiologia

L'oftalmopatia basedowiana ha un picco di incidenza tra la terza e la quinta decade di vita, ma la sindrome può esordire ad ogni età (1). Colpisce con maggior frequenza il sesso femminile con un rapporto femmine/maschi pari a 3:1. Manifestazioni clinicamente rilevabili riferibili ad oftalmopatia basedowiana sono presenti in circa il 50% dei pazienti con morbo di Basedow. Tuttavia, alterazioni riferibili ad oftalmopatia, anche in assenza di manifestazioni cliniche, sono dimostrabili mediante metodiche di *imaging* (TAC o RMN) nella quasi

totalità dei pazienti con morbo di Basedow (1).

Nella maggior parte dei casi, l'oftalmopatia basedowiana è di entità lieve. Solo in una minoranza dei pazienti (3-5%) l'oftalmopatia si presenta in forme gravi o comunque tali da mettere a rischio la vista (1).

L'ipertiroidismo e l'oftalmopatia, che verosimilmente sono strettamente legati dal punto di vista patogenetico, esordiscono spesso quasi contemporaneamente, o comunque si manifestano in circa l'85% dei casi entro 18 mesi l'uno dall'altro (3, 4).

L'interessamento oculare è nella maggior parte dei casi bilaterale, ma può essere asimmetrico e meno frequentemente unilaterale. In alcuni pazienti l'esordio della malattia nei due occhi può avvenire in tempi diversi (1).

### Eziologia

Benché l'esatta patogenesi dell'oftalmopatia basedowiana sia sconosciuta, in base ad evidenze cliniche, istopatologiche e sierologiche, la maggioranza degli autori concorda sul fatto che

verosimilmente si tratti di una sindrome autoimmune (1,5). Tuttavia permangono numerosi punti oscuri su quale sia il *primum movens*, su quale sia la natura del legame con la malattia tiroidea, e sul perché non tutti i pazienti con morbo di Basedow sviluppino una patologia oculare clinicamente evidente. Probabilmente, lo sviluppo dell'oftalmopatia basedowiana è il risultato di una complessa interazione tra fattori endogeni (in minima parte genetici) ed esogeni o ambientali (1,4). Tra questi, i più importanti sono il mancato controllo dell'ipertiroidismo, le frequenti recidive dell'ipertiroidismo in corso o dopo sospensione di terapia con farmaci anti-tiroidei, la presenza di elevati livelli sierici di autoanticorpi anti-recettore del TSH, ed il fumo di sigaretta (1,4). I fumatori basedowiani, oltre a presentare l'oftalmopatia con maggior frequenza, hanno inoltre una più elevata probabilità di sviluppare forme gravi della sindrome oculare e rispondono con minore efficacia alla terapia medica e/o radiante esterna (6). I meccanismi attraverso i quali il fumo può

provocare effetti negativi sull'occhio non sono ancora completamente chiariti, anche se l'ipotesi più accreditata prevede che l'effetto del fumo sia legato al rilascio di radicali liberi a livello dei tessuti orbitari (1, 5, 6).

L'ipotesi più accreditata per spiegare l'associazione dell'oftalmopatia basedowiana con le malattie tiroidee prevede che linfociti T autoreattivi riconoscano antigeni presenti sia nella tiroide che nei tessuti orbitari (1, 4). Tale ipotesi è in parte sostenuta dall'osservazione che la eliminazione completa del tessuto tiroideo (ablazione tiroidea completa), mediante tiroidectomia totale e terapia radiometabolica con  $^{131}\text{I}$ , si associ a breve termine ad una migliore risposta dell'oftalmopatia alla terapia medica con glucocorticoidi, rispetto a quanto osservato in soggetti sottoposti alla sola tiroidectomia (7,8). Nel corso del tempo sono state ipotizzate numerose proteine candidate a svolgere il ruolo di autoantigene, la principale delle quali è il recettore del TSH (1, 4). Un'altra ipotesi patogenetica prevede invece che antigeni tiroidei solubili, in particolare la

tireoglobulina, raggiungano i tessuti orbitari, divenendo in tale sede il bersaglio di una reazione autoimmune (9).

### Meccanismi patogenetici

Benché l'esatta patogenesi dell'oftalmopatia basedowiana non sia nota, o lo sia solo in parte, negli ultimi anni sono stati fatti notevoli progressi riguardo ai meccanismi patogenetici locali, ovvero agli eventi che a livello dei tessuti orbitari determinano le modificazioni anatomo-patologiche responsabili del quadro clinico.

La caratteristica istologica più evidente dell'oftalmopatia basedowiana è una proliferazione incontrollata dei fibroblasti orbitari ed il loro differenziazione in pre-adipociti (10). La differenziazione in pre-adipociti è dimostrata dall'aumento dell'mRNA che codifica per i cosiddetti *adipocyte-related immediate early genes*, inclusi i fattori inducenti l'angiogenesi, quali PPAR $\gamma$ , *preadipocyte factor 1*, adiponectina, leptina e stearilCoA desaturasi (25). I fibroblasti differenziati in adipociti rilasciano notevoli quantità di glicosaminoglicani idrofili, in

particolare acido ialuronico (16). In aggiunta, vi è un quadro infiammatorio locale, che probabilmente determina in qualche modo l'attivazione dei fibroblasti ed è sostenuto dall'infiltrazione linfocitaria (16). La flogosi locale è caratterizzata dalla presenza nei tessuti affetti di varie citochine pro-infiammatorie, tra cui interleuchina (IL)-1, IL-4, IL-6 ed interferon- $\gamma$ . In esperimenti *in vitro* sono stati dimostrati vari effetti stimolatori di tali citochine, in particolare: i) aumento dell'espressione della *heat shock protein 72* e della molecola di adesione ICAM-1; ii) aumento di produzione della prostaglandina E2, che agisce da modulatore della risposta immunitaria; e iii) aumento di produzione di molecole chemoattrattanti (26).

Come accennato precedentemente, un ruolo non marginale sembra essere svolto dallo stress ossidativo, dovuto principalmente al rilascio locale di radicali liberi (16). Sulla base di questa evidenza, come riportato più in dettaglio di seguito, è stato ipotizzato l'utilizzo di sostanze anti-ossidanti

come terapia per i pazienti con oftalmopatia basedowiana.

### Anatomia Patologica

Come riportato sopra, la reazione autoimmune alla base dell'oftalmopatia basedowiana ha come espressione clinica lo sviluppo di processi infiammatori e proliferativi di varia entità a carico dei tessuti dell'orbita, in particolare del grasso e dei muscoli (10). Questi ultimi vanno incontro ad aumento di dimensioni di natura ipertrofica, secondario alla loro difficoltà di movimento dovuta all'edema retro-orbitario ed alla conseguente riduzione di spazio. All'esame istologico dei tessuti orbitari si riscontra una modesta infiltrazione di cellule immunocompetenti che interessa sia il tessuto connettivo retro-orbitario che i muscoli extraoculari (10). Tuttavia, come riportato precedentemente, la caratteristica più evidente è la proliferazione dei fibroblasti, il loro differenziamento in pre-adipociti, ed il rilascio di grandi quantità di glicosaminoglicani, con conseguente aumento di volume dello spazio retro-orbitario, a cui contribuisce anche l'edema causato dai

glicosaminoglicani stessi e dall'ostacolo al ritorno venoso dovuto all'aumento del contenuto dell'orbita (1, 10).

### Manifestazioni cliniche

Le modificazioni oculari osservate nei pazienti con OB riflettono le alterazioni anatomico-patologiche dei tessuti orbitali (1). L'aumento del contenuto dell'orbita determina protrusione dei globi oculari, il cosiddetto esoftalmo, che può essere simmetrico o meno, e può associarsi a retrazione palpebrale di vario grado. Quando l'esoftalmo è di grado elevato, seppur raramente, si possono verificare episodi di sublussazione del globo oculare (1). Questa condizione, insieme alla neurite ottica e alla cherato-congiuntivite da esposizione, rappresenta una vera e propria emergenza oculistica che richiede un immediato intervento terapeutico (1). L'esoftalmo e la retrazione palpebrale possono causare una incompleta chiusura della rima palpebrale (lagoftalmo), ben evidente soprattutto durante il sonno, e che compromette la lubrificazione della cornea con conseguente disepitelizzazione fino alla comparsa di ulcere (1).

L'edema retro-orbitario si estende ai tessuti molli peri-orbitari ed al globo oculare ed è la causa principale delle manifestazioni infiammatorie dell'oftalmopatia basedowiana e dei sintomi "irritativi". Questi comprendono la sensazione di corpo estraneo e di "bruciore" agli occhi, che sono in genere accompagnati da iperemia congiuntivale, la marcata lacrimazione e la fotofobia (1). L'accumulo di glicosaminoglicani determina edema delle palpebre e della regione peri-orbitaria, così come chemosi, ovvero scollamento della congiuntiva del globo oculare (1, 11).

L'ipertrofia dei muscoli extraoculari e l'ostacolo al loro movimento possono determinare strabismo e diplopia (1,11). Nei casi più gravi, l'ispessimento dei muscoli extraoculari e l'accumulo di tessuto infiammatorio sono tali da determinare la compressione dei nervi ottici all'apice dell'orbita, con possibili danni a carico degli stessi (1, 11). Il danno al nervo ottico può determinare una riduzione dell'acuità visiva che in condizioni estreme può portare fino alla cecità.

Il decorso dell'oftalmopatia basedowiana è caratterizzato da una fase iniziale relativamente breve, in cui prevalgono le manifestazioni infiammatorie, da una successiva fase di stabilizzazione, più lenta e prolungata, caratterizzata da una parziale regressione delle manifestazioni oculari infiammatorie, ed infine da una tardiva fase stazionaria, nella quale l'esoftalmo ed il deficit motorio tendono a rimanere stabili, in quanto nelle fasi avanzate è presente principalmente fibrosi (12).

La storia naturale dell'oftalmopatia basedowiana può essere descritta anche in termini di attività infiammatoria della malattia, oltre per la sua gravità. L'attività della malattia viene in genere stabilita sulla base di semplici segni e sintomi oculari (edema palpebrale, eritema palpebrale, dolore oculare spontaneo, dolore nei movimenti oculari, chemosi, irritazione congiuntivale ed edema della caruncola) e quantificata mediante uno *score* clinico (*Clinical Activity Score, CAS*) (13). La gravità della malattia viene invece valutata in base al valore dell'esoftalmo, alle caratteristiche della diplopia, al

coinvolgimento corneale, ed alla presenza di neuropatia ottica.

### Diagnosi

La diagnosi di oftalmopatia basedowiana si basa principalmente su un attento esame clinico (11). Obiettivamente si valuta il grado di esoftalmo, con riferimento ai parametri costituzionali e delle rispettive razze (11). Si dovrà inoltre valutare l'edema palpebrale, i segni e i sintomi irritativi oculari (l'attività della malattia), l'eventuale presenza di lagofalmo e di alterazioni della motilità oculare con o senza diplopia (11). L'esame con TC o RMN è utile per confermare i dati clinici. Entrambe le metodiche consentono una valutazione accurata del grado di proptosi (esoftalmo), la visualizzazione dei muscoli estrinseci oculomotori, con la possibilità di misurarne lo spessore e di individuare eventuali segni di compressione del nervo ottico (11).

### Terapia

Il trattamento dell'oftalmopatia basedowiana va sempre

integrato con una strategia a lungo termine di terapia della disfunzione tiroidea (14-19). A questa regola fanno eccezione solo i pazienti con neuropatia ottica in cui non sempre è possibile pianificare in prima battuta una terapia tiroidea definitiva essendo la neuropatia ottica un'emergenza medica che necessita di trattamento immediato (14-19).

La definizione della gravità, dell'attività e della durata dell'oftalmopatia sono fondamentali per la scelta terapeutica. L'eventuale impiego di terapie "maggiori", ovvero dei glucocorticoidi ad alte dosi e della radioterapia esterna, viene in genere riservato ai pazienti con oftalmopatia di grado medio-grave, e tale trattamento è efficace nelle forme attive e molto meno nelle forme inattive, nelle quali in genere non viene praticato (14-19,24). Nei pazienti con oftalmopatia basedowiana non attiva possono essere impiegate a scopo riabilitativo/funzionale, o se richieste dal paziente a scopo estetico, le varie procedure chirurgiche disponibili, che comprendono l'orbitotomia decompressiva, la chirurgia

muscolare e la chirurgia palpebrale (14-19).

Nelle forme lievi di oftalmopatia basedowiana non vengono in genere praticati trattamenti “maggiori”, in quanto i benefici attesi non sono sufficienti a giustificare il rischio di effetti collaterali, in particolare riguardo alla terapia cortisonica (14). La risposta alla terapia medica con glucocorticoidi è infatti trascurabile nei pazienti con oftalmopatia lieve o non attiva ed in questi pazienti vengono in genere praticate solo terapie locali con lubrificanti oculari (14-19). Tuttavia, i pazienti con oftalmopatia lieve risentono ugualmente della malattia, sia perché presentano dei sintomi, sia perché le modificazioni del loro aspetto fisico condizionano gravemente la loro qualità della vita, soprattutto sul piano sociale. Per questa ragione è auspicabile l’identificazione di sostanze o farmaci in grado di migliorare l’oftalmopatia basedowiana lieve e la qualità della vita dei pazienti, possibilmente senza o con minimi effetti collaterali. Tra queste, tre possibili candidati sono il selenio, la quercetina e l’enalapril.

## Nuovi farmaci per l'oftalmopatia basedowiana

### *Selenio*

Il selenio è un micronutriente essenziale, che in natura si rinviene in numerosi alimenti, sia in forma inorganica come selenite, sia in forma organica come selenometionina e selenocisteina (28). Il selenio esercita i suoi effetti biologici soprattutto mediante accoppiamento con sostanze proteiche, con formazione delle cosiddette selenoproteine, le principali delle quali sono gli enzimi glutatione perossidasi, tioredoxina, tioredoxina reduttasi e iodotironina deiodinasi (29). Nella glutatione perossidasi il residuo di selenio si trova tipicamente sul sito catalitico dell'enzima, rappresentandone quindi un componente essenziale nell'azione anti-ossidante (29). La glutatione perossidasi è infatti uno dei principali enzimi coinvolti nella protezione dallo stress ossidativo. Grazie alla sua proprietà catalitica, è in grado di ridurre il perossido d'idrogeno e convertirlo in acqua, rendendolo quindi inerte ed incapace di danneggiare la cellula (29). La tioredoxina reduttasi

è un'altro enzima molto importante nella protezione dallo stress ossidativo, in quanto è l'unico in grado di rigenerare la tioredoxina ossidata. La iodotironina deiodinasi è infine l'enzima che catalizza la conversione della tiroxina in triiodotironina, ed anche in questo caso il selenio è incorporato nel sito catalitico della molecola.

Il trasporto del selenio nel sangue avviene mediante legame a proteine di trasporto di origine epatica, con formazione di selenoglicoproteine che possono contenere fino a 10 residui di selenio per molecola. In generale, le diverse concentrazioni di selenio nei vari tessuti sono regolate gerarchicamente da vie metaboliche coinvolte nella protezione dallo stress ossidativo, e dalla necessità di un sufficiente apporto del micronutriente nei principali organi in cui svolge la sua azione, ovvero cervello, testicoli e ghiandole endocrine.

L'assorbimento del selenio assunto per via alimentare avviene a livello del tratto gastro-intestinale e dipende dal tipo di seleno-composto introdotto con la dieta. A seconda della loro

natura, che sia questa organica o inorganica, i seleno-composti raggiungono il fegato dove vengono metabolizzati variabilmente dagli epatociti, con conseguente produzione di seleno-glicoproteine di diverso tipo.

Le proprietà anti-ossidanti del selenio ne hanno suggerito il possibile uso a scopo terapeutico nei pazienti con oftalmopatia basedowiana, nella quale, come riportato precedentemente, lo stress ossidativo svolge un ruolo prioritario nell'ambito dei meccanismi patogenetici (30). Pertanto è stato recentemente condotto uno studio multicentrico randomizzato in pazienti con oftalmopatia basedowiana lieve a cui venivano somministrati 100 µg di selenio due volte al giorno (23). I pazienti trattati con selenio presentavano un miglioramento dell'oftalmopatia basedowiana rispetto a quelli trattati con placebo ed inoltre riferivano una migliore qualità della vita (23).

### *Quercetina*

La quercetina appartiene alla famiglia dei flavonoidi, un

gruppo di sostanze comunemente presenti negli alimenti, in particolare frutta e vegetali. La quercetina è inoltre presente come principio attivo in piante medicinali tra cui il ginkgo biloba (31,32). La quercetina possiede varie funzioni biologiche, tra cui proprietà antivirali (33), antiossidanti (34) ed anti-infiammatorie, ed è inoltre in grado di indurre apoptosi in alcuni tipi di cellule tumorali (35). Inoltre, la quercetina possiede proprietà anti-proliferative ed è in grado di ridurre la crescita dei fibroblasti. Per questa ragione viene usata nella pratica clinica, in maniera topica per i cheloidi, ed in maniera sistemica come adiuvante principalmente per patologie neoplastiche (35). Le sue azioni, in particolare quella anti-proliferativa, si esplicano prevalentemente mediante l'inibizione della via TGF- $\beta$ /Smad (36-38), attiva nella trascrizione di geni che inducono la proliferazione cellulare.

### *Enalapril*

L'enalapril è un farmaco che appartiene alla famiglia degli ACE-inibitori ed è comunemente utilizzato per il trattamento

dell'ipertensione arteriosa (42). In aggiunta ai loro effetti anti-  
ipertensivi, gli ACE-inibitori sono noti per avere anche una  
azione di riduzione ed attenuazione del rimodellamento del  
collagene (42). Nel caso dell'enalapril, è stata dimostrata  
un'azione anti-fibrotica a livello polmonare (42), e  
recentemente sono stati riportati due casi di pazienti che  
assumevano l'enalapril per l'ipertensione arteriosa e nei quali  
veniva osservata la guarigione di cicatrici cheloidi, suggerendo  
un possibile effetto inibitorio del farmaco sui fibroblasti (39). A  
supporto di questa ipotesi è stato dimostrato che l'enalapril ha  
un'azione inibitoria sul TGF- $\beta$ , una delle citochine coinvolte  
nella sintesi di acido ialuronico (40,41).

## **2 Scopo della Tesi**

Lo scopo della presente tesi era quello di valutare gli effetti del selenio, della quercetina e dell'enalapril sui fibroblasti orbitalari di pazienti con oftalmopatia basedowiana. Il disegno dello studio prevedeva l'impiego di colture primarie di fibroblasti, che venivano prelevati dal tessuto fibroadiposo orbitario di pazienti con oftalmopatia o, come controllo, di pazienti senza oftalmopatia basedowiana, questi ultimi sottoposti a chirurgia orbitaria per malattie non infiammatorie e non correlate con l'autoimmunità. Come riportato in dettaglio in seguito, dopo l'esposizione dei fibroblasti in coltura alle suddette sostanze, venivano valutati: i) vitalità o proliferazione cellulare; ii) necrosi; iii) apoptosi; iv) secrezione di acido ialuronico; v) ciclo cellulare.

Il razionale per l'impiego delle suddette sostanze è legato ai loro possibili effetti anti-ossidanti nel caso del selenio, anti-proliferativi nel caso dell'enalapril, e di entrambi nel caso della quercetina. A lungo termine lo studio si inserisce nel quadro più

ampio di un progetto volto all'identificazione di sostanze e/o farmaci da impiegare nella oftalmopatia basedowiana lieve, nella quale, come riportato sopra, sostanzialmente non vi sono terapie disponibili ove si eccettui l'uso dei lubrificanti oculari (17).

### **3 Metodi**

#### Colture primarie di fibroblasti

Campioni di tessuto fibroadiposo orbitario sono stati prelevati da 20 pazienti con oftalmopatia basedowiana sottoposti ad orbitotomia decompressiva. Campioni di tessuto orbitario normale sono stati prelevati da 20 pazienti sottoposti a chirurgia oculare per ragioni non correlate (strabismo o ptosi palpebrale). Tutti i pazienti coinvolti nello studio hanno firmato il modulo di consenso per l'impiego dei loro campioni a scopo di ricerca.

Per la preparazione delle colture primarie di fibroblasti, i campioni di tessuto sono stati sminuzzati e dispersi in Medium 199 (Sigma, St. Louis, MO), contenente 20% di siero fetale bovino (Invitrogen Corporation, Carlsbad, CA), penicillina (Sigma) e gentamicina (Sigma). Le cellule sono state coltivate a 37°C per 2 settimane in piastre di Petri da 10 cm in incubatore cellulare. Successivamente le cellule sono state staccate

mediante tripsina-EDTA, seminate in nuove piastre, e tenute in coltura fino allo svolgimento degli esperimenti, per i quali sono state impiegate cellule al 2°-4° passaggio.

#### Preparazione degli estratti cellulari

Le cellule sono state lavate in PBS ed incubate in ghiaccio per un ora in tampone di lisi (1% Triton X-100, 1% deossicolato in H<sub>2</sub>O). Dopo centrifugazione per 10 minuti a 10,000 x g, è stato raccolto il supernatante e scartato il pellet. La concentrazione di proteine nell'estratto cellulare è stata misurata mediante il metodo di Bradford.

#### Determinazione delle concentrazioni delle molecole utilizzate

Per ogni molecola utilizzata sono stati svolti degli esperimenti preliminari volti all'identificazione della concentrazione ottimale da utilizzare con i fibroblasti. In questi esperimenti, anche in base ad altri dati acquisiti dalla letteratura, sono state analizzate concentrazioni crescenti delle sostanze ed è stata identificata la dose citotossica (dati non

mostrati). Pertanto, negli esperimenti descritti di seguito sono sempre state impiegate concentrazioni non citotossiche.

#### Saggio di proliferazione cellulare

La proliferazione cellulare è stata misurata utilizzando un saggio immuno-colorimetrico (Roche Diagnostic GmbH, Penzberg, Germany), secondo le istruzioni del produttore. Questo saggio è basato sulla determinazione della BrdU incorporata nel DNA durante la reazione di sintesi delle cellule in attiva proliferazione. Prima del saggio, le cellule sono state incubate per 3 o per 5 giorni in terreno di coltura standard senza sostanze aggiunte o contenente: i) quercetina (Sigma), ii) quercitrina (controllo della quercetina) (Sigma) o iii) rutina (Sigma) (controllo della quercetina), a concentrazioni comprese tra 1 e 150  $\mu$ M; iv) enalapril (Sigma) 2 o 5 mM e v) lisinopril (Sigma) 5 mM (controllo dell'enalapril);

#### Saggio per la determinazione della vitalità cellulare

La vitalità cellulare è stata misurata usando un kit

commerciale (AbD Serotec, Oxford, UK), secondo le istruzioni del produttore. Il saggio è basato su una misurazione colorimetrica che consente di visualizzare l'attività metabolica delle cellule. Nello specifico, il sistema incorpora un indicatore dello stato ossido-reduttivo (redox), l'AlamarBlue®, il quale viene assorbito dalle cellule e viene ridotto in seguito alla crescita cellulare ed alla attività metabolica che ne consegue. La crescita cellulare continua determina lo sviluppo di un ambiente ridotto, mentre l'inibizione della crescita determina la formazione di un ambiente ossidato. La riduzione associata alla crescita determina il passaggio dell'indicatore redox dalla forma ossidata alla forma ridotta che viene visualizzata attraverso un cambiamento di colore dal blu al rosso.

Prima del saggio, dopo trattamento con  $\text{H}_2\text{O}_2$  100  $\mu\text{M}$  per 90 minuti a  $37^\circ\text{C}$ , le cellule sono state incubate per 3 o 5 giorni in terreno di coltura standard senza sostanze aggiunte o contenente: i) selenio-metil-selenio-cisteina 5 o 10  $\mu\text{M}$ , o ii)

metil-cisteina 5 o 10  $\mu$ M.

### Saggio per la determinazione della necrosi

La necrosi è stata misurata utilizzando un kit commerciale (Promega Corporation, Madison, WI), secondo le istruzioni del produttore. Il saggio è basato sulla misurazione quantitativa colorimetrica dell'enzima lattato deidrogenasi (LDH), che viene rilasciato in seguito alla lisi cellulare. Il rilascio di LDH nel mezzo di coltura viene misurato in seguito alla conversione del sale di tetrazolio (INT) in un prodotto formazano rosso. La quantità di colore formato è direttamente proporzionale al numero di cellule necrotiche.

Prima del saggio, le cellule sono state incubate per 3 o 5 giorni in terreno di coltura standard senza sostanze aggiunte o contenente: i) selenio-metil-selenio-cisteina 5  $\mu$ M, o ii) metil-cisteina 5  $\mu$ M; iii) quercetina, iv) quercitrina, o v) rutina 1-150 mM; vi) enalapril 2 o 5 mM o vii) lisinopril 5 mM. Negli esperimenti con selenio le cellule sono state pre-trattate con

H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 100 µM per 90 minuti a 37°C per indurre lo stress ossidativo.

### Saggio per la determinazione dell'apoptosi

L'apoptosi è stata misurata usando un kit commerciale (Biocolor Ltd., Newtownabbey, Northern Ireland), secondo le istruzioni del produttore. Il kit prevede l'assorbimento di un colorante, l'APOPercentage Dye, da parte delle cellule apoptotiche. Le fasi iniziali del processo apoptotico prevedono la traslocazione della fosfatidiliserina dall'interno all'esterno della membrana cellulare. Questo movimento favorisce l'assorbimento del Dye fino a che non si ha la formazione delle blebs, ossia delle protrusioni ed invaginazioni della membrana cellulare da cui origineranno poi i corpi apoptotici.

Prima del saggio, le cellule sono state incubate per 3 o per 5 giorni in terreno di coltura standard senza sostanze aggiunte o contenente: i) quercetina, ii) quercitrina, o iii) rutina 1-150 mM; iv) enalapril 2 o 5 mM o v) lisinopril 5 mM.

### Saggio per la determinazione del rilascio di Acido ialuronico

L'acido ialuronico è stato misurato nel mezzo di coltura utilizzando un kit ELISA (Echelon Sciences, Salt Lake City, UT), secondo le istruzioni del produttore. I campioni da analizzare, rappresentati dal mezzo di coltura in cui sono state immerse le cellule, sono stati mescolati con un reagente presente nel kit, necessario per rilevare la presenza di acido ialuronico. Successivamente sono stati aggiunti in piastre ELISA in cui si trova l'anticorpo anti-HA coniugato con l'enzima fosfatasi alcalina. Il legame anticorpo-acido ialuronico determina la conversione del substrato dell'enzima in un composto rilevabile colorimetricamente. Il segnale colorimetrico ottenuto è inversamente proporzionale alla concentrazione di acido ialuronico rilevata nel campione.

Prima del saggio, le cellule sono state incubate per 3 o per 5 giorni in terreno di coltura standard senza sostanze aggiunte o contenente: i) selenio-metil-selenio-cisteina 5  $\mu$ M o ii) metil-

cisteina 5  $\mu$ M; iii) quercetina, iv) quercitrina, o v) rutina 1-150 mM; vi) enalapril 2 o 5 mM o vii) lisinopril 5 mM. Negli esperimenti con selenio le cellule sono state pre-trattate con  $H_2O_2$  100  $\mu$ M per 90 minuti a 37C per indurre lo stress ossidativo.

#### Analisi del ciclo cellulare

Le cellule sono state seminate in piastre di Petri da 6 cm ( $0.5 \times 10^6$  cellule per pozzetto) in mezzo di coltura completo, e poi incubate per circa 48 ore per raggiungere la confluenza. In seguito a trattamento con la quercetina o rutina, effettuato come riportato sopra, le cellule sono state staccate con tripsina-EDTA ed incubate con una soluzione di ioduro di propidio (Tris 0.01 Mol/L, NaCl 10 mMol/L, RNase 700 U/L, propidium iodine  $7.5 \times 10^{-5}$  Mol/L, Nonidet P-40 0.1%) per 30 minuti a temperatura ambiente. Il DNA contenuto nelle cellule è stato determinato con la citometria a flusso usando il a FACSCalibur flow cytometer di Beckton Dickinson.

### Presentazione dei risultati e analisi statistica

Per superare possibili differenze riscontrabili in seguito al diverso numero di cellule per pozzetto, i risultati di tutti gli esperimenti sono stati normalizzati per la concentrazione proteica dell'estratto cellulare, che non veniva in alcun modo alterata dall'azione delle sostanze utilizzate (dati non mostrati).

I risultati sono presentati come  $\text{media} \pm \text{SD}$  e sono stati ottenuti in almeno tre esperimenti separati per ogni tipo di saggio. Sono stati utilizzati i seguenti test statistici: differenza cumulativa tra gruppi a vari intervalli di tempo e/o a varie concentrazioni delle molecole utilizzate: ANOVA per misurazioni ripetute; differenze cumulative entro gli stessi gruppi a vari intervalli di tempo e/o a varie concentrazioni delle molecole utilizzate: test di Friedman; differenza tra gruppi alla stessa concentrazione delle sostanze: t-test; differenza entro i gruppi alla stessa concentrazione delle sostanze: test di Kendall.

## 4 Risultati

### Selenio

#### *Il selenio aumenta la vitalità cellulare*

Dopo induzione dello stress ossidativo mediante incubazione dei fibroblasti con H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, è stata osservata una netta riduzione della vitalità cellulare, sia nei fibroblasti provenienti da pazienti con oftalmopatia basedowiana (p=0.003) che nei fibroblasti di controllo (p=0.003) (Fig. 1). Il trattamento con selenio, ma non con metil-cisteina, usata come controllo, ha ridotto l'effetto citotossico dell'H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (Fig.1). Non vi è stata differenza tra fibroblasti provenienti da pazienti con oftalmopatia basedowiana e fibroblasti di controllo.

#### *Il selenio riduce la necrosi cellulare*

Allo scopo di comprendere i meccanismi responsabili dell'effetto del selenio sulla vitalità cellulare, è stata valutata la necrosi mediante misurazione dell'LDH. Come mostrato in Fig.

2, dopo incubazione con  $H_2O_2$  è stato osservato un netto aumento dell'LDH, ad indicare l'induzione della necrosi, verosimilmente un meccanismo fondamentale nel determinare l'effetto sulla vitalità riportato sopra. L'effetto dell'  $H_2O_2$  era più marcato nei fibroblasti provenienti da pazienti con oftalmopatia basedowiana rispetto ai fibroblasti di controllo, ad indicare una maggiore sensibilità allo stress ossidativo nei fibroblasti patologici. L'incubazione con selenio, ma non con metil-cisteina, ha determinato una riduzione della necrosi quasi esclusivamente nei fibroblasti dei pazienti oftalmopatici ( $p=0.0031$ ).

#### *Il selenio riduce il rilascio di acido ialuronico*

Per valutare l'effetto del selenio sul rilascio di acido ialuronico, quest'ultimo è stato misurato nel mezzo di coltura dopo trattamento dei fibroblasti orbitari con  $H_2O_2$  e successivamente selenio o metil-cisteina  $5\mu M$  per 3 giorni.

Come mostrato nella Fig. 3, dopo trattamento con  $H_2O_2$  è

stato osservato un aumento della concentrazione di HA nel mezzo di coltura, verosimilmente dovuta al rilascio da parte delle cellule in seguito alla lisi. Dopo trattamento con selenio, ma non con metil-cisteina, è stata osservata una ulteriore riduzione della concentrazione di acido ialuronico ( $p=0.001$ ;  $p=0.0085$ ).

Lo studio sul selenio è tuttora in corso. In particolare sono in corso di esecuzione gli esperimenti volti a valutare l'effetto sulla proliferazione cellulare, sull'apoptosi e sul ciclo cellulare.

### Quercetina

#### *La quercetina inibisce la proliferazione dei fibroblasti orbitari*

In seguito al trattamento con quercetina, è stata osservata una riduzione della proliferazione dei fibroblasti orbitari che riguardava sia le cellule provenienti da pazienti oftalmopatici che quelle provenienti dai pazienti di controllo (Fig.4a). Dopo 3 giorni dal trattamento tale effetto è stato osservato a partire da una concentrazione di quercetina di 75  $\mu\text{M}$ , mentre dopo 5

giorni era già possibile osservarlo ad una concentrazione di 30  $\mu$ M. La riduzione della proliferazione è stata statisticamente significativa ( $P=0.0001$ ) in entrambi i tipi cellulari, ma non sono state osservate differenze tra i due gruppi ( $P =0.0845$ ).

La rutina e la quercitrina, le due forme glicosilate della quercetina che sono state impiegate come controllo, non hanno avuto alcun effetto, suggerendo che la glicosilazione della quercetina può in qualche modo prevenirne gli effetti (Fig.4b).

#### *La quercetina induce la necrosi nei fibroblasti orbitari*

Come mostrato in Fig. 5a, dopo 3 o 5 giorni dal trattamento con quercetina è stato osservato un aumento dell'LDH, ad indicare l'induzione della necrosi. Tale effetto è stato osservato sia nei fibroblasti dei pazienti con oftalmopatia basedowiana ( $p=0.0024$ ) che nei fibroblasti di controllo ( $p=0.0001$ ), a suggerire che la necrosi è verosimilmente uno dei meccanismi responsabili dell'effetto anti-proliferativo della quercetina. La rutina e la quercitrina hanno avuto invece effetti trascurabili

(Fig 5b).

*La quercetina non induce apoptosi nei fibroblasti orbitari*

Per determinare quale altro processo potrebbe contribuire all'effetto della quercetina sulla proliferazione cellulare, sono stati valutati gli effetti della quercetina sull'apoptosi. Dopo 5 giorni di trattamento dei fibroblasti con quercetina, rutina o quercitrina, come mostrato in Fig.6a, non sono state osservate cellule apoptotiche. I risultati erano simili nei fibroblasti provenienti da pazienti oftalmopatici o da pazienti di controllo. Le cellule apoptotiche sono state osservate solo nel controllo positivo, ovvero in cellule trattate con H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (Fig.6a).

Per confermare questi risultati, l'apoptosi è stata misurata anche mediante ELISA. Come mostrato in Fig. 6b, l'apoptosi non è stata influenzata dalla quercetina, né nelle cellule di pazienti oftalmopatici né in quelle di controllo.

*La quercetina arresta il ciclo cellulare*

Per determinare se gli effetti anti-proliferativi della

quercetina potessero in qualche modo essere dovuti ad alterazioni del ciclo cellulare, sono stati svolti esperimenti in cui, in seguito al trattamento dei fibroblasti con la quercetina per 5 giorni, è stata determinata la fase del ciclo cellulare. Come mostrato in Fig. 7, il trattamento con quercetina, ma non con rutina (non mostrato), si è associato ad una significativa riduzione della proporzione di cellule in fase G2 ed in fase S, ( $p < 0,01$ ) suggerendo un effetto della quercetina sul ciclo cellulare che potrebbe contribuire alla riduzione della proliferazione dei fibroblasti.

#### *La quercetina riduce il rilascio di acido ialuronico*

La concentrazione di acido ialuronico nel mezzo di coltura è stata misurata dopo trattamento delle cellule con quercetina per 5 giorni. Come mostrato in Fig. 8a, il rilascio basale di acido ialuronico era molto più alto nelle cellule provenienti da pazienti oftalmopatici rispetto a quelle provenienti dai pazienti di controllo ( $p = 0.0295$ ). In seguito al trattamento con quercetina è stata osservata una marcata riduzione della

concentrazione di acido ialuronico, sia nei fibroblasti provenienti da pazienti con oftalmopatia ( $p=0.0143$ ) che nei fibroblasti di controllo ( $p=0.050$ ), senza differenze nei due gruppi cellulari. La rutina e la quercitrina hanno avuto invece effetti trascurabili (Fig. 8b).

Per determinare se l'effetto della quercetina fosse persistente nel tempo, la concentrazione di acido ialuronico è stata misurata nel mezzo di cellule trattate con quercetina fino a 5 giorni dopo che la quercetina stessa era stata eliminata dal terreno di coltura. Come mostrato in Fig. 8c, l'aumento di HA nei fibroblasti non trattati raggiungeva un picco al 9° giorno, seguito poi da una fase di plateau. Una tendenza simile è stata osservata anche nei fibroblasti trattati con la quercetina, nei quali, tuttavia, le concentrazioni di acido ialuronico erano sempre più basse rispetto a quelle delle cellule non trattate, il che risultava essere più evidente dopo 4 e 5 giorni dell'eliminazione della quercetina dal terreno di coltura, a suggerire che l'effetto della quercetina è persistente.

## Enalapril

### *L'enalapril inibisce la proliferazione dei fibroblasti orbitari*

Per valutare l'effetto dell'enalapril sulla proliferazione, i fibroblasti sono stati trattati con questa sostanza a concentrazioni 2 o 5 mM per 3 o 5 giorni.

Il trattamento con enalapril ha determinato una riduzione della proliferazione dei fibroblasti orbitari nelle cellule provenienti da pazienti oftalmopatici e nelle cellule di controllo (Fig. 9a). L'effetto è stato osservato sia a 3 che a 5 giorni dal trattamento. La riduzione della proliferazione era statisticamente significativa in entrambi i gruppi ( $P = 0.0008$  in fibroblasti di pazienti oftalmopatici e  $P = 0.0010$  in fibroblasti di controllo). L'effetto dell'enalapril era specifico, come mostrato dall'effetto trascurabile ottenuto utilizzando il lisinopril, un altro ACE-inibitore (Fig. 9b).

### *L'enalapril non influenza la necrosi nei fibroblasti orbitari*

Per meglio comprendere il meccanismo responsabile

dell'inibizione della proliferazione cellulare, è stato misurato il rilascio di LDH. I fibroblasti sono stati trattati per 3 o 5 giorni con enalapril 5mM. Come mostrato nella Fig. 10a e b, né l'enalapril né il lisinopril hanno determinato modificazioni della necrosi nei due gruppi di cellule, ad indicare che questo fenomeno non è responsabile dell'effetto anti-proliferativo dell'enalapril.

*L'enalapril non induce apoptosi nei fibroblasti orbitari*

Come mostrato nelle figure Fig. 11a e b, né l'enalapril né il lisinopril hanno determinato apoptosi in nessuno dei due gruppi cellulari, ad indicare che l'apoptosi non è coinvolta nell'effetto anti-proliferativo dell'enalapril.

*L'enalapril riduce il rilascio di HA*

Per valutare l'effetto dell'enalapril sul rilascio di acido ialuronico, quest'ultimo è stato misurato nel mezzo di coltura dopo trattamento dei fibroblasti orbitari con enalapril 5 mM per 5 giorni. Come mostrato nella Fig. 12a, la concentrazione di

acido ialuronico è stata ridotta in seguito al trattamento con enalapril in entrambi i gruppi di cellule, in maniera statisticamente significativa ( $p=0.0431$  in entrambi i gruppi cellulari). Il trattamento con lisinopril non ha avuto effetti rilevanti (Fig. 12b).

## **5      Discussione**

L'oftalmopatia basedowiana è la più comune manifestazione extratiroidea del morbo di Basedow, manifestandosi, con vari gradi di gravità, in circa il 50% dei pazienti (1). Nonostante gli eventi iniziali che portano allo sviluppo della sindrome non siano ancora noti con certezza, gli eventi fisiopatologici responsabili delle manifestazioni cliniche dell'oftalmopatia basedowiana sono stati ben caratterizzati (2,9). La proliferazione dei fibroblasti orbitari e l'aumento della secrezione di glicosaminoglicani, specialmente dell'acido ialuronico, determinano un aumento del contenuto orbitario, con conseguente protrusione del globo oculare, espansione compensativa del tessuto muscolare, e, in casi estremi, compressione del nervo ottico (3).

La definizione della gravità e dell'attività e la durata dell'oftalmopatia sono fondamentali per la scelta terapeutica (11,14). L'eventuale impiego di terapie "maggiori", ovvero dei

glucocorticoidi ad alte dosi e della radioterapia esterna, viene infatti riservato ai soli pazienti con oftalmopatia di grado medio-grave/attiva (17). Al contrario, nei pazienti con oftalmopatia lieve o non attiva, fino a poco tempo fa non vi erano terapie disponibili al di fuori dell'uso dei lubrificanti oculari, che tuttavia non modificano la storia naturale della malattia ed il cui beneficio è minimo (17). Tuttavia, i pazienti con oftalmopatia lieve presentano alcuni dei sintomi della malattia e le modificazioni del loro aspetto fisico condizionano gravemente la loro qualità di vita, soprattutto sul piano sociale (17). L'assenza di terapie specifiche per l'oftalmopatia lieve ha pertanto sollecitato studi volti all'identificazione di farmaci che possano avere un effetto sulle manifestazioni cliniche della sindrome e che possano apportare dei benefici sostanziali sulla qualità della vita dei pazienti, possibilmente con effetti collaterali trascurabili. In quest'ottica, è stato recentemente condotto uno studio clinico randomizzato multicentrico che ha dimostrato che il selenio è efficace nei pazienti con

oftalmopatia basedowiana lieve (23).

Lo scopo degli studi riportati in questa tesi era di caratterizzare i meccanismi cellulari coinvolti nell'effetto del selenio, e di valutare gli effetti di altri due molecole candidate all'impiego nei pazienti con oftalmopatia lieve, ovvero la quercetina e l'enalapril.

Il selenio è un micronutriente che è parte integrante di enzimi attivi nelle reazioni di ossido-riduzione che proteggono la cellula dallo stress ossidativo (28-30). Questo processo è uno dei meccanismi coinvolti nella patogenesi dell'oftalmopatia basedowiana (26). Per riprodurre *in vitro* un simile ambiente ossidativo, fibroblasti orbitari provenienti da pazienti con oftalmopatia basedowiana o da soggetti di controllo sono stati trattati con H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. In seguito a questo trattamento è stata osservata una riduzione della vitalità cellulare, che è stata in parte recuperata dal trattamento con selenio, che evidentemente svolgeva un effetto protettivo dallo stress ossidativo. L'effetto

dell' H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> sulla vitalità cellulare era principalmente dovuto ad un aumento della necrosi, come mostrato da esperimenti in cui è stato misurato il rilascio di LDH da parte delle cellule. Il selenio preveniva l'effetto pro-necrotico dell' H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, ed il conseguente aumento di rilascio di acido ialuronico indotto dalla stessa. In sintesi, è stato osservato un effetto complessivo del selenio di protezione dallo stress ossidativo, che è risultato in una riduzione della necrosi, in un aumento della vitalità dei fibroblasti ed in una riduzione del rilascio di acido ialuronico. Tali effetti, soprattutto la riduzione del rilascio di acido ialuronico, possono in parte spiegare il giovamento riscontrato dai pazienti oftalmopatici *in vivo*, in seguito al trattamento con il selenio (23).

Il rilievo di un aumento della vitalità cellulare indotto dal selenio è in apparente contrasto con i suoi effetti benefici. Infatti, la proliferazione incontrollata dei fibroblasti ed il loro differenziamento in adipociti, è uno dei meccanismi responsabili delle modificazioni patologiche dei tessuti orbitali

nei pazienti con oftalmopatia basedowiana (25). Tuttavia, tale contrasto è probabilmente solo apparente. La protezione dalla necrosi, principale responsabile della ridotta vitalità indotta dallo stress ossidativo, potrebbe infatti determinare una ridotta liberazione di antigeni orbitari, e di conseguenza una ridotta esposizione del sistema immunitario agli stessi, con riduzione della reazione autoimmune contro i tessuti orbitari.

Gli effetti del selenio sono sostanzialmente stati osservati indipendentemente nei fibroblasti provenienti da pazienti con oftalmopatia basedowiana e nei fibroblasti di controllo. Tuttavia, queste osservazioni non devono precludere l'impiego del selenio nella clinica, considerata la virtuale assenza di effetti collaterali di questo micronutriente (23), ed il fatto che, comunque, i suoi effetti in vitro sono relativi a fenomeni patologici legati allo stress ossidativo e che nei soggetti senza oftalmopatia basedowiana non sono presenti. In ogni caso, a completamento del presente studio, sono in corso ulteriori esperimenti volti a valutare gli effetti del selenio sul ciclo

cellulare e sull'apoptosi.

La quercetina è un flavonoide con proprietà anti-infiammatorie ed anti-proliferative ed è utilizzata nella pratica clinica in maniera topica per il trattamento di cicatrici cheloidi, ed in maniera sistemica come adiuvante in alcune patologie neoplastiche (35). Nel presente studio abbiamo osservato che il trattamento dei fibroblasti orbitari con quercetina riduceva la proliferazione cellulare. Questo risultato rifletteva una azione del flavonoide nell'indurre la necrosi e nell'arrestare il ciclo cellulare. La necrosi era infatti inversamente proporzionale all'azione della quercetina sulla proliferazione, ed inoltre, l'analisi del ciclo cellulare rivelava una riduzione della percentuale delle cellule nelle fasi G2 ed S in seguito al trattamento.

Il fatto che la quercetina induca la necrosi potrebbe in qualche modo essere controproducente, in quanto questo potrebbe determinare il rilascio di auto-antigeni con

conseguente peggioramento della risposta autoimmunitaria contro i tessuti orbitari. Tuttavia, questo appare improbabile, alla luce del comune uso della quercetina nella pratica clinica ed al fatto che non è mai stata associata alla comparsa o esacerbazione di malattie autoimmuni.

L'apoptosi non è stata influenzata dalla quercetina, il che era relativamente inatteso, alla luce di precedenti osservazioni in cui è stato evidenziato un ruolo pro-apoptotico del flavonoide in cellule neoplastiche (34).

La quercetina ha ridotto marcatamente e significativamente il rilascio di acido ialuronico da parte dei fibroblasti orbitari. Come atteso, il rilascio di acido ialuronico era maggiore nei fibroblasti di pazienti con oftalmopatia basedowiana rispetto ai fibroblasti di controllo. In seguito al trattamento con la quercetina, il rilascio di acido ialuronico è stato ridotto in entrambi i tipi cellulari. Inoltre, a seguito del trattamento con la quercetina, il rilascio di acido ialuronico nei fibroblasti di

pazienti oftalmopatici era simile a quello osservato nei fibroblasti di controllo prima del trattamento, come se, una volta trattati con quercetina, i livelli di acido ialuronico fossero tornati a livelli “normali”. È stato inoltre osservato che gli effetti della quercetina sul rilascio di acido ialuronico sono duraturi nel tempo. Infatti le concentrazioni di acido ialuronico erano marcatamente più basse nei fibroblasti trattati con quercetina rispetto a quelli non trattati anche 5 giorni dopo che la quercetina era stata eliminata dal mezzo di coltura. Le due forme glicosilate della quercetina, la rutina e la quercitrina, non hanno avuto alcun effetto sui fibroblasti, ad indicare che la glicosilazione potrebbe prevenire gli effetti della quercetina.

Ad eccezione degli esperimenti sull'apoptosi, gli studi sulla quercetina non sono stati condotti dopo induzione di stress ossidativo mediante  $H_2O_2$ . Pertanto è verosimile che i dati riflettano esclusivamente una azione anti-proliferativa diretta di questa sostanza. Tuttavia, è possibile che la quercetina possa agire sui fibroblasti anche grazie alla sua azione anti-ossidante.

Pertanto, sono in corso ulteriori studi nei quali verrà valutato l'effetto della quercetina dopo esposizione ad H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> su vitalità cellulare, necrosi e rilascio di acido ialuronico.

L'enalapril è un ACE-inibitore comunemente usato nella pratica clinica per l'ipertensione arteriosa (40). Gli ACE-inibitori hanno un'azione inibitoria sulla produzione e sul rimodellamento del collagene (40), che nel caso dell'enalapril è già stata sfruttata per il trattamento dei cheloidi (40). Uno dei tipi cellulari maggiormente coinvolti nella biosintesi del collagene sono i fibroblasti ed è stato dimostrato che l'azione dell'enalapril sui fibroblasti si esplica principalmente inibendo il TGF- $\beta$ , una delle citochine coinvolte nella sintesi di acido ialuronico (39).

Nei nostri esperimenti l'enalapril riduceva marcatamente la proliferazione cellulare sia nei fibroblasti provenienti da pazienti oftalmopatici che nei fibroblasti di controllo, tuttavia senza determinare necrosi né apoptosi. E' pertanto presumibile

che i suoi effetti anti-proliferativi riflettano una inibizione della crescita cellulare e/o un ritardo nel ciclo cellulare, aspetti che sono tuttora in corso di studio. Così come il selenio e la quercetina, l'enalapril riduceva marcatamente il rilascio di acido ialuronico da parte dei fibroblasti.

Se il selenio si è già dimostrato essere efficace nei pazienti con oftalmopatia basedowiana lieve (23), rimane da stabilire se i nostri risultati possono costituire una base per un uso clinico della quercetina e/o dell'enalapril. Entrambe le sostanze hanno effetti sia nei fibroblasti provenienti da pazienti oftalmopatici che in quelli provenienti dai pazienti di controllo. Di conseguenza, se somministrati *in vivo*, le loro azioni potrebbero coinvolgere non solo i fibroblasti "affetti", e potrebbero determinare una riduzione della proliferazione anche in fibroblasti "sani", cosa che in teoria potrebbe causare qualche tipo di danno. A questo riguardo c'è da considerare che i fibroblasti utilizzati per il presente studio provenivano da pazienti trattati con glucocorticoidi ed in cui l'oftalmopatia era

inattiva o scarsamente attiva. È quindi possibile che fibroblasti di pazienti non trattati, con oftalmopatia attiva, possano rispondere alla quercetina e/o all'enalapril in misura maggiore. Se così fosse, ci si potrebbe aspettare che la quercetina e/o l'enalapril esplicino la loro azione anti-proliferativa *in vivo* in fibroblasti orbitari di pazienti con oftalmopatia attiva, ma non in fibroblasti "sani".

Ovviamente, per fornire delle risposte a queste ipotesi saranno necessari ulteriori studi.

## **6 Bibliografia**

1. Bahn RS 2010 Graves' orbitopathy. *N Engl J Med* 362: 726-738.
2. Marinò M., Chiovato L., Pinchera A. Graves' disease 2008 In: *Endocrinology*. L.J. De Groot and J.L. Jameson, Editors. 5th Ed. Elsevier Saunders, Philadelphia, USA, pp. 1995-2028.
3. Marcocci C, Bartalena L, Bogazzi F, Panicucci M, Pinchera A 1989 Studies on the occurrence of ophthalmopathy in Graves' disease. *Acta Endocrinol (Copenh)* 120: 473-478.
4. Wiersinga WM, Smith T, van der Gaag R, Koornneef L 1988 Temporal relationship between onset of Graves' ophthalmopathy and onset of thyroïdal Graves' disease. *J Endocrinol Invest* 11: 615-619.
5. Prabhakar BS, Bahn RS, Smith TJ 2003 Current perspective on the pathogenesis of Graves'disease and ophthalmopathy. *Endocr Rev* 24:802-835.
6. Bartalena L 2012 Prevention of Graves' ophthalmopathy.

Best Pract Res Clin Endocrinol Metab. 26:371-379.

7. Menconi F, Marinò M, Pinchera A, Rocchi R, Mazzi B, Nardi M, Bartalena L, Marcocci C 2007 Effects of thyroid ablation versus near-total thyroidectomy alone on mild to moderate Graves' orbitopathy treated with intravenous glucocorticoids. *J Clin Endocrinol Metab* 92: 1653-1658.

8. Leo M, Marcocci C, Pinchera A, Nardi M, Megna L, Rocchi R, Latrofa F, Altea MA, Mazzi B, Sisti E, Profilo MA, Marinò M 2012 Outcome of Graves' orbitopathy after total thyroid ablation and glucocorticoid treatment: follow-up of a randomized clinical trial. *J Clin Endocrinol Metab* 97:E44-48.

9. Marinò M, Chiovato L, Lisi S, Altea MA, Marcocci C, Pinchera A 2004 Role of thyroglobulin in the pathogenesis of Graves' ophthalmopathy: the hypothesis of Kriss revisited. *J Endocrinol Invest* 27: 230-236.

10. Campbell RJ 1984 Pathology of Graves' ophthalmopathy. In: Gorman CA Campbell RJ, Dyer JA Editors. *The eye and orbit in thyroid disease*. Raven Press, San Diego, USA, pp.23-32.

11. Wiersinga WM, Perros P, Kahaly GJ, Mourits MP,

Baldeschi L, Boboridis K, Boschi A, Dickinson AJ, Kendall-Taylor P, Krassas GE, Lane CM, Lazarus JH, Marcocci C, Marino M, Nardi M, Neoh C, Orgiazzi J, Pinchera A, Pitz S, Prummel MF, Sartini MS, Stahl M, von Arx G 2006 Clinical assessment of patients with Graves' orbitopathy: the European Group on Graves' Orbitopathy recommendations to generalists, specialists and clinical researchers. European Group on Graves' Orbitopathy (EUGOGO). *Eur J Endocrinol* 155:387-389.

12. Bartley GB 2011 Rundle and his curve. *Arch Ophthalmol* 129:356-358

13. Mourits M, Koornneef L, Wiersinga WM, Prummel MF, Berghout A, van der Gaag R 1989 Clinical criteria for the assessment of disease activity in Graves' ophthalmopathy: a novel approach. *Br J Ophthalmol* 73: 639-44.

14. Bartalena L, Tanda ML 2009 Clinical practice. Graves' orbitopathy. *N Engl J Med* 360: 994-1001.

15. Bartalena L, Pinchera A, Marcocci C 2000 Management of Graves' ophthalmopathy: reality and perspectives. *Endocr Rev* 21:168-199.

16. Bartalena L, Wiersinga WM, Pinchera A 2004 Graves'

orbitopathy: state of the art and perspectives. *J Endocrinol Invest* 27: 295-301.

17. Marcocci C, Marinò M 2012 Treatment of mild, moderate-to-severe and very severe Graves' orbitopathy. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab* 26:325-337.

18. Marcocci C, Pinchera A, Marinò M. A treatment strategy for Graves' orbitopathy. *Nat Clin Pract Endocrinol Metab* 2007; 3: 430-436.

19. Bartalena L, Baldeschi L, Dickinson AJ, Eckstein A, Kendall-Taylor P, Marcocci CM, Mourits MP, Perros P, Boboridis K, Boschi A, Currò N, Daumerie C, Kahaly GJ, Krassas GE, Lane CM, Lazarus J H, Marinò M, Nardi M, Neoh C, Orgiazzi J, Pearce S, Pinchera A, Pitz S, Salvi M, Sivelli P, Stahl M, von Arx, Wiersinga WM 2008 Consensus statement of the European Group on Graves' Orbitopathy (EUGOGO) on management of Graves' Orbitopathy. *Thyroid* 18: 333-346.

20. Bartalena L, Marcocci C, Bogazzi F, Panicucci M, Lepri A, Pinchera A 1989 Use of corticosteroids to prevent progression of Graves' ophthalmopathy after radioiodine therapy for hyperthyroidism. *N Engl J Med* 321:1349–1352.

21. Bartalena L, Marcocci C, Bogazzi F, Manetti L, Tanda ML, Dell'Unto E, Bruno-Bossio G, Nardi M, Bartolomei MP, Lepri A, Rossi G, Martino E, Pinchera A 1998 Relation between therapy for hyperthyroidism and the course of Graves' ophthalmopathy. *N Engl J Med* 338:73–78.
22. Miccoli P, Vitti P, Rago T, Iacconi P, Bartalena L, Bogazzi F, Fiore E, Valeriano R, Chiovato L, Rocchi R, Pinchera A 1996 Surgical treatment of Graves' disease: Subtotal or total thyroidectomy? *Surgery* 120:1020–1025.
23. Marcocci C, Kahaly GJ, Krassas GE, Bartalena L, Prummel M, Stahl M, Altea MA, Nardi M, Pitz S, Boboridis K, Sivelli P, von Arx G, Mourits MP, Baldeschi L, Bencivelli W, Wiersinga W 2011 Selenium and the course of mild Graves' orbitopathy. *N Engl J Med* 364:1920-1931.
24. Tanda ML, Bartalena L 2012 Efficacy and safety of orbital radiotherapy for graves' orbitopathy. *J Clin Endocrinol Metab* 97: 3857-3865.
25. Valyasevi RW, Hartenek DA, Dutton CM, Bhan RS: Stimulation of adipogenesis, peroxisome proliferator-activated receptor-gamma (PPARgamma), and thyrotropin receptor by PPARgamma agonist in human orbital preadipocyte fibroblast.

J Clin Endocrinol Metab 2002; 87:2352-2358.

26. Kazim M, Goldberg RA, Smith TJ: Insights into the pathogenesis of thyroid-associated orbitopathy: evolving rationale for therapy. Arch Ophthalmol 2002; 120:380-386

27. Eckstein A, Schittkowski M, Esser J. 2012 Surgical treatment of Graves' ophthalmopathy. Best Pract Res Clin Endocrinol Metab 26: 339-358.

28. Carolin S. Hoefiga, Kostja Renkoa, Josef Köhrlea, Marc Birringerb, Lutz Schomburg: Comparison of different selenocompounds with respect to nutritional value vs. toxicity using liver cells in culture. Journal of Nutritional Biochemistry 22 (2011) 945–955.

29. Wenfeng Fang, Marci L.Goldberg, Nicole M.Pohl1, Xiuli Bi, Chang Tong, Bin Xiong, Timothy J.Koh, Alan M.Diamond and Wancai Yang. Functional and physical interaction between the selenium-binding protein 1 (SBP1) and the glutathione peroxidase 1 selenoprotein. Carcinogenesis vol.31 no.8 pp.1360–1366, 2010.

30. Hondur A, Konuk O, Dincel AS, Bilgihan A, Unal M, Hasanreisoglu B. Oxidative stress and antioxidant activity in

orbital fibroadipose tissue in Graves' ophthalmopathy. *Curr Eye Res.* 2008 May;33(5):421-7

31. Williamson G, Manach C. Bioavailability and bioefficacy of polyphenols in humans. II. Review of 93 intervention studies. *Am J Clin Nutr* 2005, 81(1 Suppl): 243S-55S.

32. Mennen LI, Walker R, Bennetau-Pelissero C, Scalbert A. Risks and safety of polyphenol consumption. *Am J Clin Nutr* 2005, 81(1 Suppl): 326S-9S.

33. Cushnie TP, Lamb AJ. Antimicrobial activity of flavonoids. *Int J Antimicrob Agents* 2005, 26(5): 343-56.

34. Woodman OL, Chan E. Vascular and anti-oxidant actions of flavonols and flavones. *Clin Exp Pharmacol Physiol* 2004, 31(11): 786-90.

35. Ramos S. Effects of dietary flavonoids on apoptotic pathways related to cancer chemoprevention. *J Nutr Biochem* 2007, 18(7): 427-429.

36. Phan TT, Sun L, Bay BH, Chan SY, Lee ST. Dietary compounds inhibit proliferation and contraction of keloid and hypertrophic scar-derived fibroblasts in vitro: therapeutic

implication for excessive scarring. *J Trauma* 2003, 54(6): 1212-24.

37. Phan TT, See P, Tran E, et al. Suppression of insulin-like growth factor signalling pathway and collagen expression in keloid-derived fibroblasts by quercetin: its therapeutic potential use in the treatment and/or prevention of keloids. *Br J Dermatol* 2003, 148(3): 544-52.

38. Phan TT, Lim IJ, Chan SY, et al. Suppression of transforming growth factor beta/sm $\alpha$ d signaling in keloid-derived fibroblasts by quercetin: implications for the treatment of excessive scars. *J Trauma* 2004, 57(5): 1032-7.

39. Iannello S, Milazzo P, Bordonaro F, Belfiore F 2006 Low-dose enalapril in the treatment of surgical cutaneous hypertrophic scar and cheloid--two case reports and literature review. *MedGenMed*. 8:60.

40. Kim S, Ohta K, Hamaguchi A, Omura T, Yukimura T, Miura K, Inada Y, Ishimura Y, Chatani F, Iwao H.J 1995 Angiotensin II type I receptor antagonist inhibits the gene expression of transforming growth factor-beta 1 and extracellular matrix in cardiac and vascular tissues of hypertensive rats. *J Pharmacol Exp Ther* 273:509-515.

41. Heldin P, Laurent TC, Heldin CH 1989 Effect of growth factors on hyaluronan synthesis in cultured human fibroblasts. *Biochem J.* 258:919-922.
  
42. Davies RO, Irvin JD, Kramsch DK, Walker JF, Moncloa F 1984 Enalapril worldwide experience. *Am J Med* 77:23-35.

## 7      **Legenda delle Figure**

**Figura 1:** Valutazione della vitalità cellulare in fibroblasti di pazienti oftalmopatici (OB) e di pazienti non oftalmopatici (di controllo), dopo trattamento con H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, con H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> e selenio-metil-selenio-cisteina 5 µM, o con H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> e metil-cisteina 5 µM.

\* p=0.003 mediante test di Kendall; \*\* p=0.003 mediante test di Kendall

**Figura 2:** Valutazione della necrosi in fibroblasti di pazienti oftalmopatici e di pazienti non oftalmopatici (di controllo), non trattati o dopo trattamento con H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, con H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> e selenio-metil-selenio-cisteina 5 µM, o con H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> e metil-cisteina 5 µM.

\* p=0.0031 mediante test di Kendall.

**Figura 3:** Valutazione del rilascio di acido ialuronico da parte di fibroblasti di pazienti oftalmopatici e di pazienti non oftalmopatici, non trattati o dopo trattamento con H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, con

H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> e selenio-metil-selenio-cisteina 5 µM, o con H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> e metil-cisteina 5 µM.

\* p=0.001 mediante test di Kendall; \*\* p=0.0085 mediante test di Kendall

**Figura 4:** **a)** Effetti della quercetina sulla proliferazione dei fibroblasti orbitari. \*p=0.0001 entro i gruppi (mediante test di Friedmann); **b)** mancanza di effetti di rutina (80 µM) e quercitrina (110 µM) nei fibroblasti orbitari. Simili risultati sono stati ottenuti con concentrazioni di rutina e quercitrina di 150 µM (non mostrati).

**Figura 5:** **a)** Effetti della quercetina sul rilascio di LDH da parte dei fibroblasti orbitari. \*p=0.0024 nei fibroblasti OB, (test di Friedmann); \*\*p=0.0001 nei fibroblasti non-OB, (test di Friedmann); **b)** Effetti di rutina o quercitrina dopo 5 giorni dal trattamento.

LDH è espresso come indice ottenuto dividendo il rilascio osservato di LDH per il rilascio Massimo di LDH.

**Figura 6:** Assenza di effetto della quercetina sull'apoptosi. **a)** Dopo trattamento con quercetina 150  $\mu\text{M}$ , rutina 80  $\mu\text{M}$ , o quercitrina 110  $\mu\text{M}$  o con  $\text{H}_2\text{O}_2$ , i fibroblasti sono stati incubati con un colorante che viene assorbito dalle cellule che vanno incontro ad apoptosi. Il colorante viene osservato solo nelle cellule trattate con  $\text{H}_2\text{O}_2$ . Risultati simili sono ottenuti con rutina e quercitrina a concentrazioni superiori a 150  $\mu\text{M}$  (dati non mostrati); **b)** misurazione dell'apoptosi mediante ELISA. Risultati simili sono stati ottenuti con rutina e quercitrina a concentrazioni superiori a 150  $\mu\text{M}$  (dati non mostrati).

**Figura 7:** Effetti della quercetina sul ciclo cellulare. Non sono osservati effetti a concentrazioni  $<30 \mu\text{M}$ ; a concentrazioni  $>75 \mu\text{M}$  il ciclo cellulare non viene alterato (dati non mostrati).

\* $p < 0,01$  entro i gruppi mediante test di Friedmann.

**Figura 8:** Effetti della quercetina sul rilascio di acido ialuronico nel terreno di coltura dei fibroblasti orbitari. **a)** Rilascio di acido ialuronico dopo trattamento con quercetina 75  $\mu\text{M}$ . Fibroblasti OB vs fibroblasti di controllo:  $*p=0.0295$  con quercetina 0  $\mu\text{M}$ , mediante t-test; solo fibroblasti OB:  $**p=0.0143$ , mediante test di Kendall. Solo fibroblasti non-OB:  $***p=0.050$ , mediante test di Kendall. **b)** rilascio di acido ialuronico nel mezzo di coltura dopo trattamento dei fibroblasti con rutina (80  $\mu\text{M}$ ) o quercitrina (110  $\mu\text{M}$ ). Risultati simili sono stati ottenuti con la quercetina a concentrazioni superiori a 150  $\mu\text{M}$  (dati non mostrati). **c)** rilascio di acido ialuronico nel mezzo cellulare 5 giorni dopo il trattamento dei fibroblasti orbitari con quercetina 75  $\mu\text{M}$ .

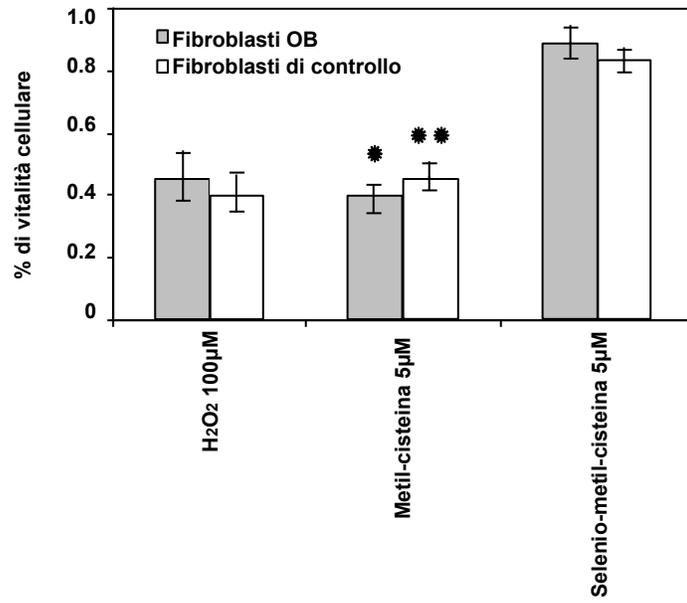
**Figura 9:** **a)** proliferazione cellulare dopo 3 o 5 giorni dal trattamento con enalapril.  $*p=0.0008$  in fibroblasti OB, mediante test di Kendall;  $**p=0.0010$  nei fibroblasti di controllo, mediante il test di Kendall. **b)** proliferazione cellulare dopo 3 o 5 giorni dal trattamento con lisinopril 5 mM.

**Figura 10:** **a)** rilascio di LDH dopo 3 o 5 giorni dal trattamento con enalapril. **b)** rilascio di LDH dopo 3 o 5 giorni dal trattamento con lisinopril. LDH è espresso come indice ottenuto dividendo il rilascio osservato di LDH per il rilascio Massimo di LDH.

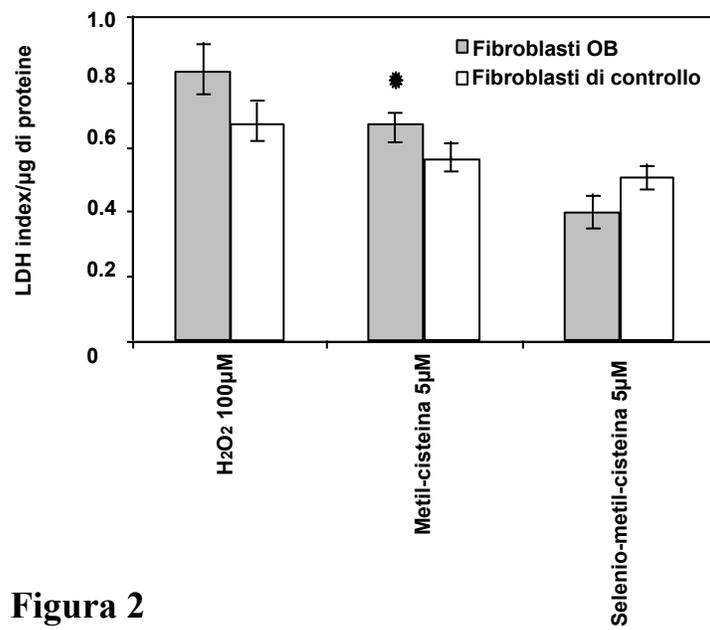
**Figura 11:** **a)** misurazione dell'apoptosi dopo 3 o 5 giorni dal trattamento con enalapril; **b)** misura dell'apoptosi dopo 5 giorni dal trattamento con lisinopril.

**Figure 12:** **a)** rilascio di acido ialuronico nel mezzo di coltura cellulare in seguito al trattamento con enalapril. \* $p=0.0431$  in entrambi i gruppi, mediante test; **b)** rilascio di acido ialuronico nel mezzo di coltura cellulare in seguito al trattamento con lisinopril.

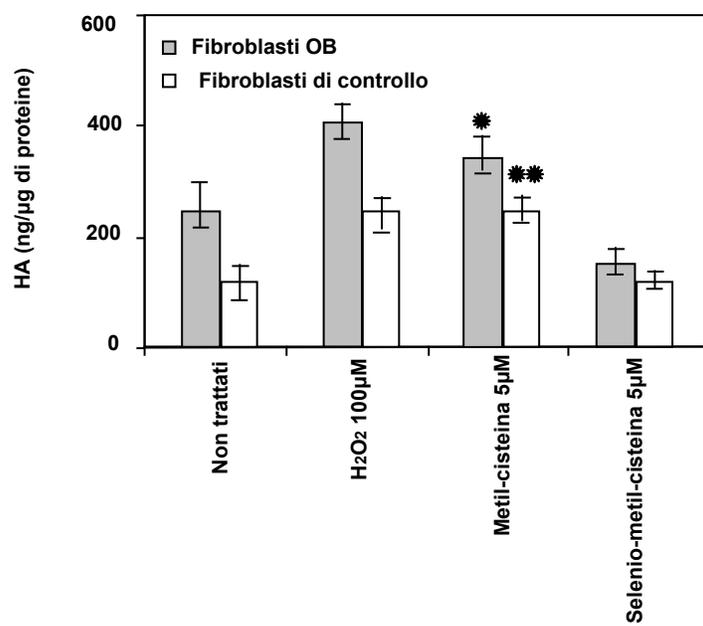
## 8 Figure



**Figura 1**

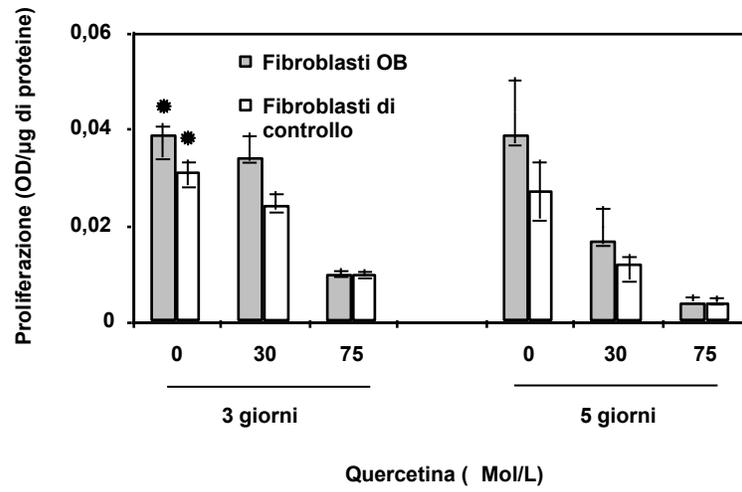


**Figura 2**

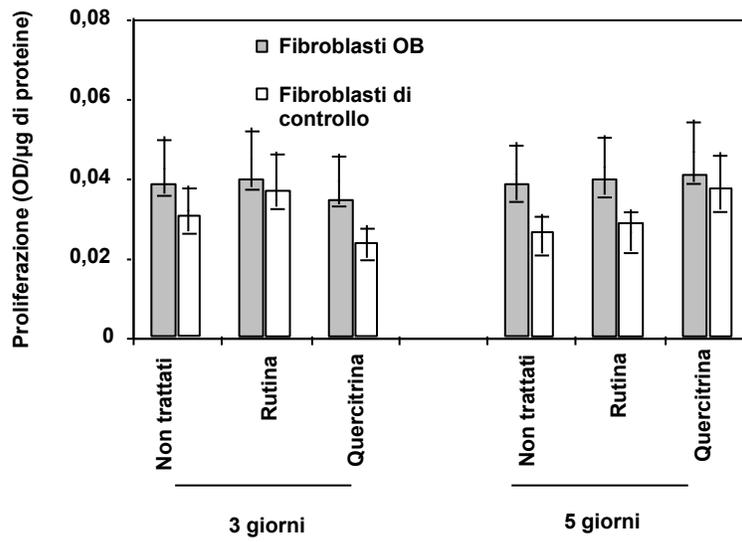


**Figura 3**

**a**

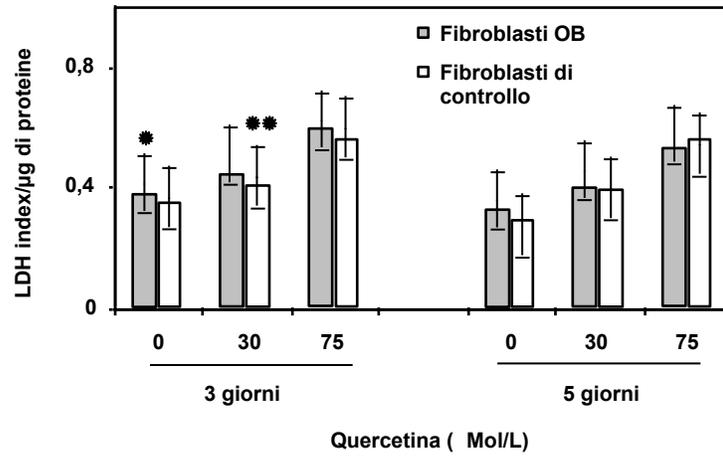


**b**

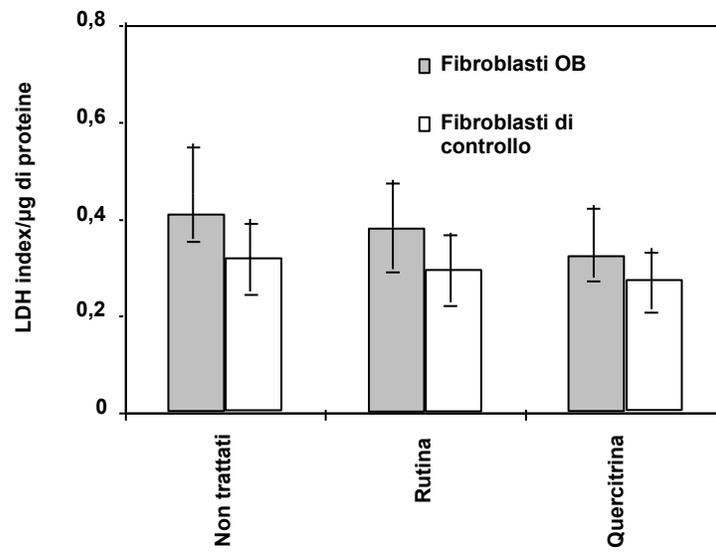


**Figura 4**

**a**

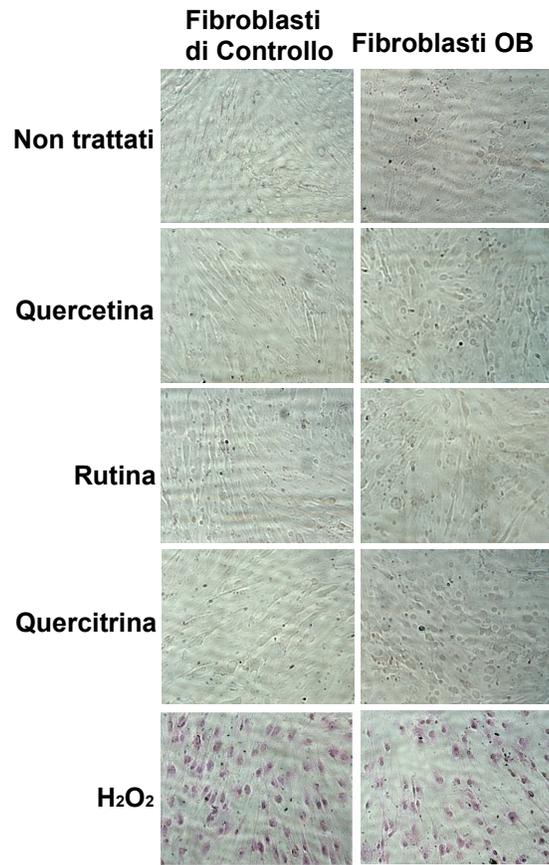


**b**

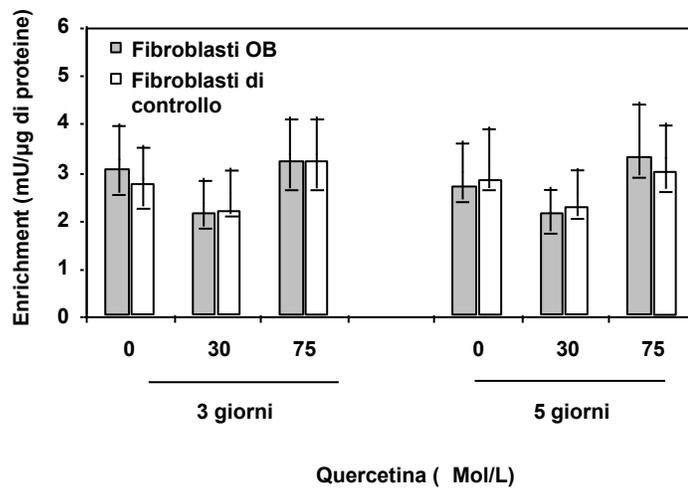


**Figura 5**

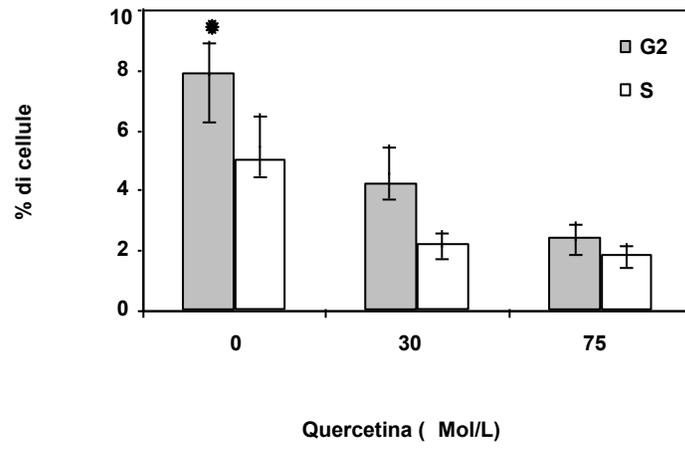
**a**



**b**

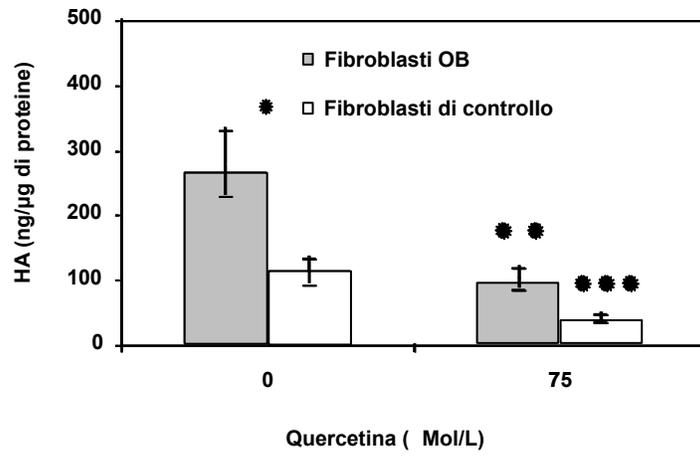


**Figura 6**

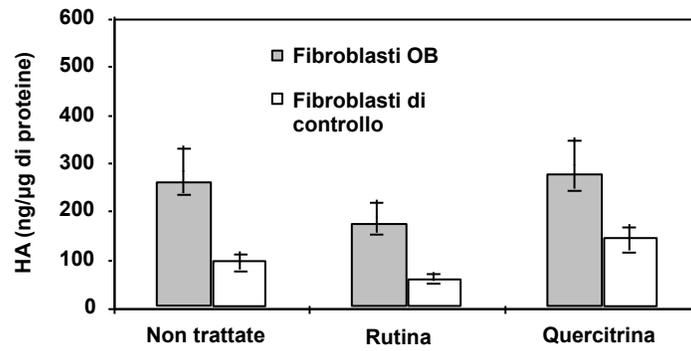


**Figura 7**

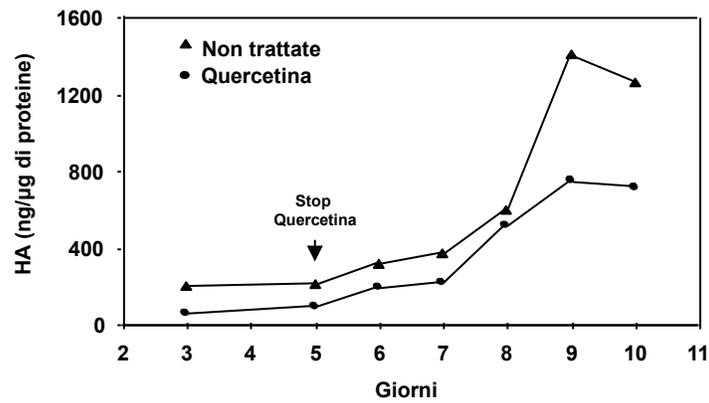
**a**



**b**

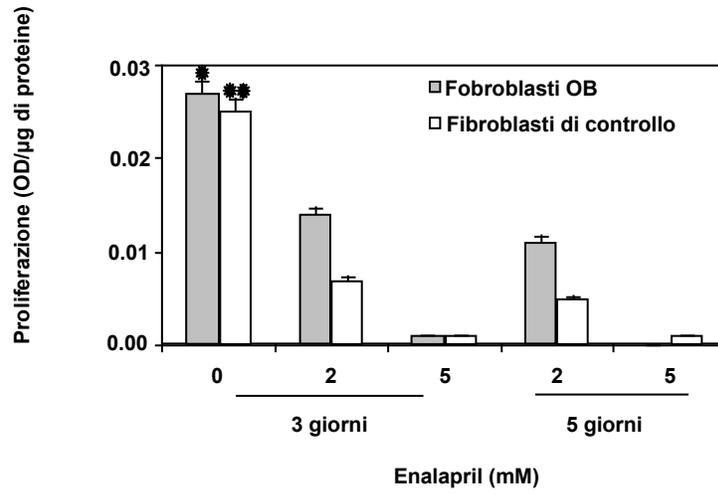


**c**

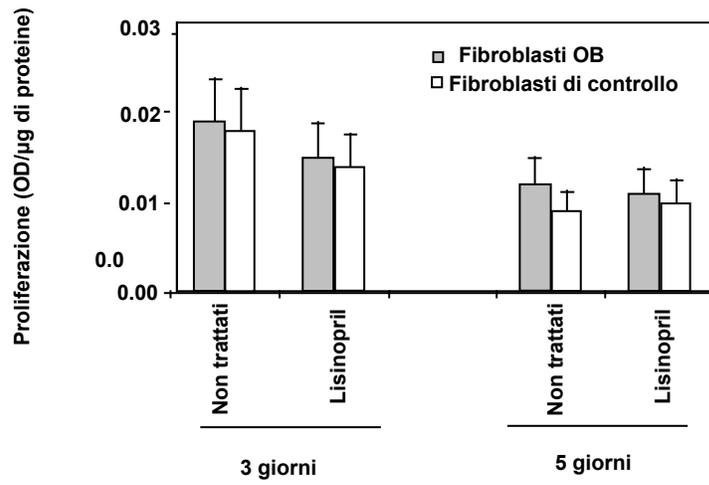


**Figura 8**

**a**

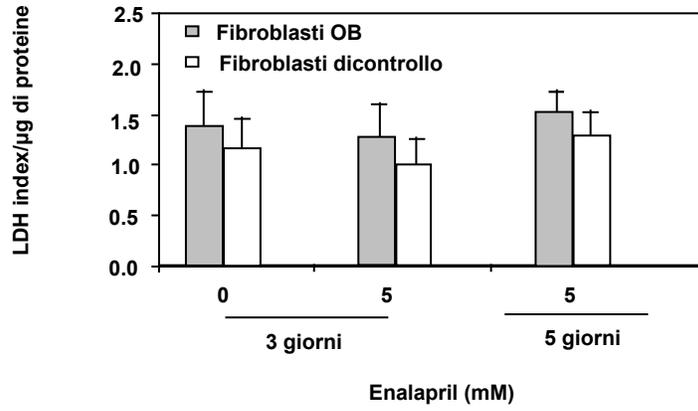


**b**

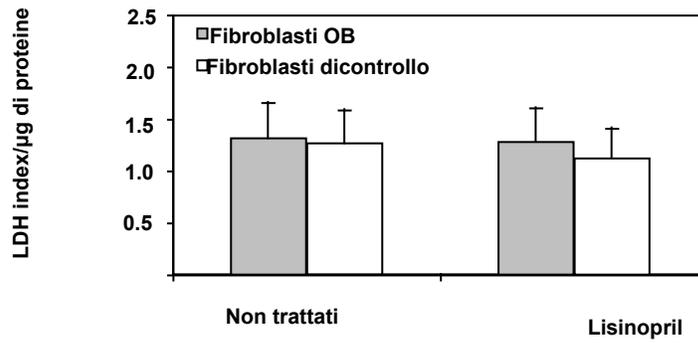


**Figura 9**

**a**

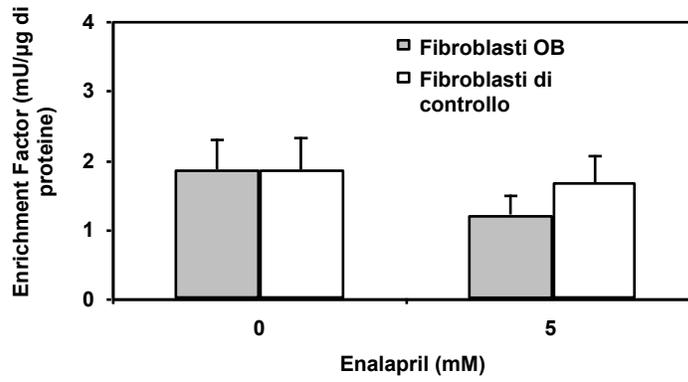


**b**

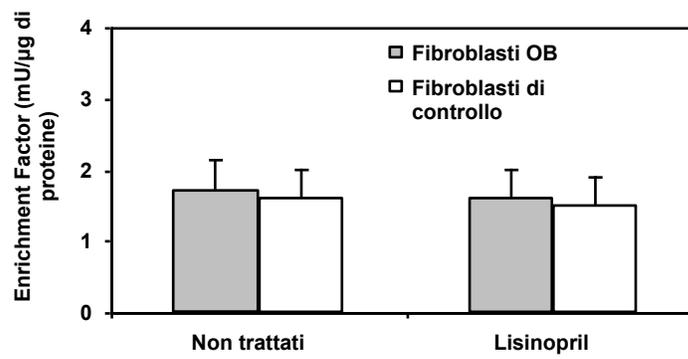


**Figura 10**

**a**

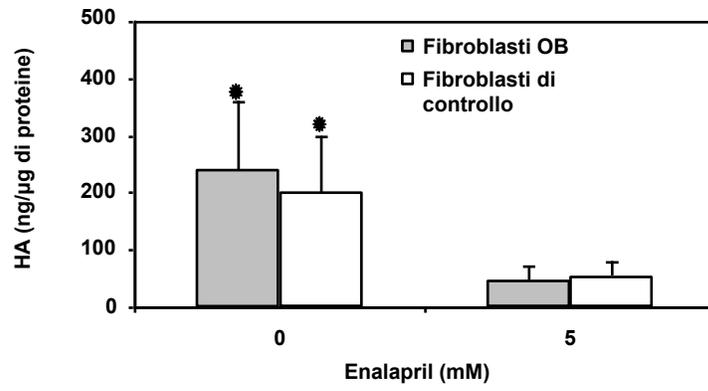


**b**

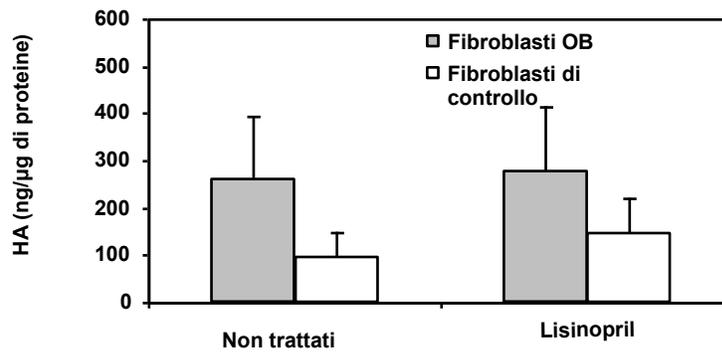


**Figura 11**

**a**



**b**



**Figura 12**

Ringrazio il Dott. Michele Marinò per avermi dato l'occasione di partecipare attivamente ad un progetto di ricerca, per avermi dato fiducia e per la disponibilità e la pazienza dimostratami.

Ringrazio il Prof. Paolo Vitti ed il Prof. Claudio Marcocci per avermi consentito di frequentare il laboratorio di Endocrinologia.

Ringrazio il Dott. Riccardo Chiarini che ha iniziato questo progetto insieme a me, la Dott.ssa Marenza Leo per il prezioso aiuto e tutto il laboratorio di Biologia Molecolare dell'obesità.