



UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI PISA

Dipartimento di Farmacia

CORSO DI LAUREA SPECIALISTICA IN FARMACIA

TESI DI LAUREA

**L'inflammatione indotta dall'obesità: valutazione
del ruolo di IL-1 in insulino-resistenza e diabete
mellito di tipo 2**

Candidata:

Eleonora Vitarelli

Relatore:

Prof. Antonio Lucacchini

Correlatore:

Prof. Gino Giannaccini

Anno Accademico 2013-2014

*A mio padre Marco e mia madre Giovanna,
che mi hanno dato tutto.
Grazie per avermi guidata fino a qui.*

INTRODUZIONE	7
<hr/>	
CAPITOLO 1 – INFIAMMAZIONE: MECCANISMI GENERALI	11
1.1 INFIAMMAZIONE ACUTA	11
1.2 INFIAMMAZIONE CRONICA	14
1.3 MEDIATORI CHIMICI DELL'INFIAMMAZIONE	16
1.4 IMMUNITÀ INNATA	18
1.4.1 MECCANISMO D'AZIONE	20
1.4.2 RECETTORI	21
1.4.3 TRASDUZIONE DEL SEGNALE	25
1.5 IMMUNITÀ ACQUISITA	27
1.5.1 LINFOCITI T	28
1.5.2 LINFOCITI B	30
1.5.3 CELLULE NATURAL KILLER	31
1.5.4 MACROFAGI	32
1.5.5 CITOCHINE	33
CAPITOLO 2 – IMMUNOMETABOLISMO	37
<hr/>	
2.1 MALATTIE METABOLICHE	38
2.2 INFIAMMAZIONE DEI TESSUTI INSULINO-SENSIBILI	41
2.2.1 TESSUTO ADIPOSO	42
2.2.2 FEGATO	46
2.2.3 MUSCOLO	48
2.2.4 PANCREAS	48
2.3 MARKER INFIAMMATORI IN OBESITÀ E T2DM	49
2.3.1 IL-1	49
2.3.1.1 IL-1 β E INFLAMMASOMA NLRP3	50
2.3.1.2 CASPASI-1	55
2.3.2 TNF- α	57
2.3.3 IL-18	58
2.3.4 IL-33	60
2.3.5 IL-6	61
2.3.6 ALTRE: IL-10, IL-13, IL-15	63
2.4 TRIGGER DELL'INFIAMMAZIONE	66
2.4.1 ACIDI GRASSI	66
2.4.2 CERAMIDI	67
2.4.3 GLUCOSIO	68
2.4.4 SPECIE REATTIVE DELL'OSSIGENO	70

2.4.5 IPERTROFIA DEGLI ADIPOCITI, IPOSSIA E MORTE CELLULARE	71
2.4.6 STRESS DEL RETICOLO ENDOPLASMATICO	72
CAPITOLO 3 – STRATEGIE TERAPEUTICHE	73
3.1 ANTI IL-1 β	73
3.1.1 ANTAGONISTI RECETTORIALI	73
3.1.2 ANTICORPI MONOCLONALI	75
3.1.3 INIBITORI DI CASPASI-1	76
3.2 SALICILATO E SALSALATO	77
3.3 ANTI TNF- α	78
CAPITOLO 4 – ALIMENTAZIONE	79
4.1 CARBOIDRATI	79
4.2 ACIDI GRASSI	80
4.2.1 PUFAS	80
4.2.2 FA SATURI E TRANS	81
4.3 FRUTTA E VERDURA	82
4.4 VITAMINE	82
4.4.1 VITAMINA A	83
4.4.2 VITAMINA C	84
4.5 FLAVONOIDI	84
4.6 FITOESTROGENI	86
4.7 PROBIOTICI	87
4.8 PREBIOTICI	88
CONCLUSIONI	89
BIBLIOGRAFIA	92

INTRODUZIONE

L'obesità è una condizione caratterizzata da un eccessivo accumulo di grasso corporeo, condizione che determina gravi danni alla salute e caratterizzata da un'eziologia multifattoriale, infatti sono spesso coinvolti simultaneamente, genetica, ormoni, dieta ed ambiente.

L'obesità rappresenta uno dei principali problemi di salute pubblica a livello mondiale, sia perché la sua prevalenza è in costante aumento non solo nei Paesi occidentali, ma anche in quelli a basso-medio reddito, sia perché è un importante fattore di rischio per varie malattie croniche, in particolare diabete mellito di tipo 2, malattie cardiovascolari, ictus, tumori e forme di demenza come il morbo di Alzheimer.

L'Organizzazione Mondiale della Sanità ha riferito che l'obesità a livello globale è cresciuta in ritmo allarmante dal 1980 ad oggi ed è pressoché raddoppiata: dati relativi al 2008 contavano oltre 1,4 miliardi di adulti in sovrappeso, il 35% della popolazione mondiale, con un costo di 147 miliardi di dollari l'anno. In particolare, gli Stati Uniti d'America durante gli ultimi quaranta anni hanno assistito a un raddoppio del numero degli adulti in sovrappeso; ad oggi, si conta che un terzo degli americani adulti sono obesi e i 2/3 sono in sovrappeso. In Italia la situazione non è certo migliore: secondo i dati raccolti nel 2010 dal Sistema di Sorveglianza "Passi d'Argento", il 32% degli adulti è in sovrappeso, mentre l'11% è obeso.

Ma l'obesità oggi non può essere più collegata esclusivamente ai paesi industrializzati, infatti è un problema che sta coinvolgendo anche paesi in via di sviluppo. Ne è un esempio la Corea, dove il servizio sanitario Coreano riferisce che la prevalenza dell'obesità in Corea nel 2011, era negli uomini il 35% e nelle donne il 27,1%, dati paragonabili ai Paesi occidentali. Questo fenomeno è accompagnato dalla rapida crescita economica, dalla concomitante adozione di uno stile di vita occidentalizzato e bruschi cambiamenti nella dieta (il consumo di alimenti di origine animale è passato da 7,7% nel 1970 a 20,3% nel 2010).

Dati ancora più preoccupanti suggeriscono che il problema ha ormai iniziato a interessare le fasce più giovani della popolazione: si stima che nel 2011 ci fossero al mondo oltre 40 milioni di bambini al di sotto dei 5 anni in sovrappeso.

Come su detto, l'obesità è un disturbo metabolico che aumenta il rischio d'insorgenza di numerose malattie. L'adiposità viscerale in eccesso è associata con resistenza all'insulina, iperglicemia, dislipidemia e ipertensione; condizioni che insieme delineano quella che viene chiamata "sindrome metabolica", la quale aumenta il rischio di diabete mellito di tipo 2 e malattie cardiovascolari.

Gli esatti meccanismi attraverso i quali l'obesità promuova queste malattie, non sono ancora ben definiti, ma prove sostanziali hanno indicato che l'obesità induce dei cambiamenti nelle funzioni

immunitarie e può così contribuire all'insorgenza e sviluppo di numerose malattie.

Il concetto che l'infiammazione e le malattie metaboliche fossero collegate, fu introdotto durante la metà del XX secolo ma il definitivo collegamento è avvenuto 20 anni fa, quando Hotamisligil e colleghi osservarono la sovraespressione di RNA messaggero del fattore di necrosi tumorale, una citochina proinfiammatoria, nel tessuto adiposo di roditori obesi; inoltre osservarono che neutralizzando TNF- α , l'azione dell'insulina era maggiore. Questo studio iniziale cambiò la comprensione della natura delle malattie metaboliche e introdusse l'ormai accettato paradigma secondo il quale, un sovraccarico di nutrienti promuove l'infiammazione e collega i sistemi metabolici e immunitari, dove l'infiammazione può essere patologica. Inoltre questo studio fu l'innescò per aprire un nuovo campo di ricerca, oggi conosciuto come "immunometabolismo", volto a individuare tutte quelle alterazioni a livello immunitario, in condizioni di eccesso di grassi di deposito.

Il tessuto adiposo, se fino a un paio di decenni fa, era considerato un tessuto inerte, principalmente dedicato allo stoccaggio dell'energia, adesso è riconosciuto come un tessuto attivo nella regolazione dei processi fisiologici e patologici, comprese l'immunità e l'infiammazione. Il concetto attuale è che la massa grassa in espansione accende i meccanismi che portano all'infiammazione e in questo processo, sembrano essere coinvolti diversi componenti

cellulari. Il tessuto adiposo, infatti, produce e rilascia una varietà di citochine, sia pro- che anti- infiammatorie le quali sono attivi partecipanti alla sviluppo di malattie cardiovascolari e metaboliche.

Nel lavoro che segue, in primo luogo, sarà approfondito il meccanismo dell'infiammazione, con un focus sul tipo di coinvolgimento e mediazione delle citochine pro- e anti- infiammatorie. In secondo luogo sarà discussa l'infiammazione in ambito metabolico: le connessioni che esistono fra obesità, infiammazione, insulino-resistenza e diabete di tipo 2. In terzo luogo, saranno affrontati i possibili approcci terapeutici, intesi come farmacologici ma anche relativi a una corretta alimentazione.

CAPITOLO 1 – CARATTERISTICHE GENERALI DELL'INFIAMMAZIONE

L'infiammazione è una complessa reazione ad agenti lesivi come microbi e cellule danneggiate, in genere necrotiche, che consiste nella risposta vascolare, nella migrazione e attivazione dei leucociti e in una reazione sistemica. La risposta infiammatoria è strettamente legata al processo di riparazione e il suo scopo ultimo è liberare l'organismo dalla causa iniziale della lesione cellulare.

L'infiammazione si differenzia in acuta e cronica. L'infiammazione acuta ha un esordio rapido (secondi o minuti) e una durata relativamente breve che va da pochi minuti a diverse ore, fino ad alcuni giorni. L'infiammazione cronica ha una maggiore durata ed è associata istologicamente alla presenza di linfociti e macrofagi, alla proliferazione di vasi sanguigni, a fibrosi e necrosi tissutale.

Le risposte vascolari e cellulari dell'infiammazione, acuta e cronica, sono mediate da fattori chimici che derivano dalle proteine plasmatiche o dalle cellule e sono attivati o prodotti in risposta allo stimolo infiammatorio.

1.1 Infiammazione acuta

Nell'infiammazione acuta si individuano tre eventi principali: (1) alterazioni del calibro vascolare che determinano un aumento del flusso ematico, (2) modifiche strutturali nella microvascolarizzazione

che consentono alle proteine plasmatiche e ai leucociti di lasciare il circolo, (3) fuoriuscita dei leucociti dal microcircolo, accumulo nella sede di lesione e attivazione per l'eliminazione dell'agente lesivo.

La vasodilatazione è una delle prime manifestazioni dell'infiammazione, indotta dall'azione di diversi mediatori, in particolare istamina e ossido nitrico della muscolatura liscia dei vasi. La vasodilatazione è rapidamente seguita da un aumento della permeabilità vascolare che dà luogo a un accumulo di liquido extravascolare ricco di proteine, le quali lasciano i vasi attraverso le giunzioni tra le cellule endoteliali delle venule, che risultano allargate. I leucociti circolanti aderiscono all'endotelio vascolare grazie al legame di molecole complementari presenti sui leucociti e sulle superfici endoteliali. Dapprima si hanno interazioni a bassa affinità fra le glicoproteine sialil-Lewis X del leucocita e le selectine espresse sull'endotelio; poi l'IL-1 e TNF- α inducono l'espressione endoteliale delle immunoglobuline VCAM-1 e ICAM-1, molecole di adesione per le integrine presenti sul leucociti. Il passo successivo è la diapedesi, le chemochine agiscono sui leucociti aderenti e stimolano tali cellule a migrare attraverso gli spazi intercellulari dell'endotelio, in direzione del gradiente di concentrazione chimica, cioè verso la sede di lesione (chemiotassi). I chemioattrattori coinvolti sono i componenti del sistema del complemento, in particolare il fattore C5a, i prodotti della via della lipossigenasi, soprattutto il leucotriene B₄, le citochine, in particolare quelle della famiglia delle chemochine (ad es., IL-8).

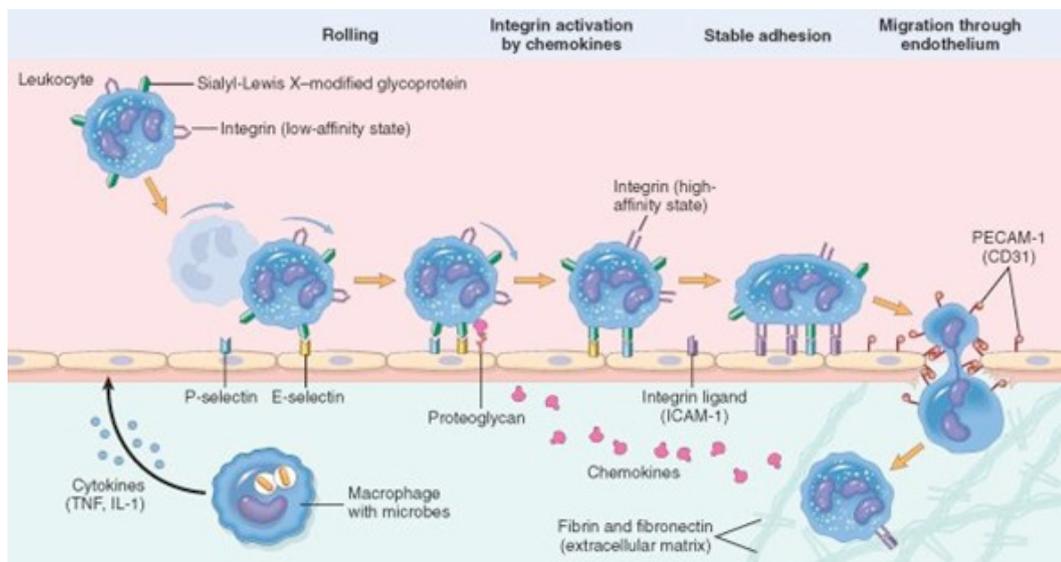


Fig. 1.1 – Marginazione, rolling e adesione.

Microbi, complessi antigene-anticorpo e citochine inducono nei leucociti diverse risposte che fanno parte delle funzioni difensive di tali cellule:

- secrezione di enzimi lisosomiali
- produzione di citochine
- fagocitosi
- produzione di metaboliti dell'acido arachidonico che portano poi al rilascio di prostaglandine.

I leucociti esprimono diversi recettori di superficie che sono coinvolti nella loro attivazione:

- recettori Toll-like, che funzionano grazie all'associazione con chinasi e portano alla produzione di sostanze microbicide e citochine
- recettori accoppiati a proteina G, che attivati, inducono la migrazione delle cellule del sangue attraverso l'endotelio e la produzione di sostanze microbicide
- i macrofagi espongono recettori per le citochine prodotte durante la risposta immunitaria
- recettori per le opsonine, proteine che rivestono i microbi facilitando la fagocitosi

A seguito dell'attivazione, i leucociti accumulati nella sede di infiammazione svolgono fagocitosi: riconoscono e aderiscono alla particella da fagocitare, si verifica ingestione e quindi uccisione e degradazione del materiale ingerito.

Non appena l'agente lesivo è eliminato, il processo si spegne e l'ospite ritorna a uno stato normale di salute. Se l'agente lesivo non può essere eliminato rapidamente, l'infiammazione da acuta può trasformarsi in cronica.

1.2 Infiammazione cronica

L'infiammazione cronica è considerata un'infiammazione di durata prolungata (settimane o mesi) in cui procedono contemporaneamente l'infiammazione attiva, la distruzione di tessuto

e i tentativi di riparazione. Sebbene possa seguire un'inflammatione acuta, spesso può avere un esordio asintomatico.

A differenza dell'inflammatione acuta, che si manifesta principalmente con alterazioni vascolari, edema e infiltrato prevalentemente neutrofilo, l'inflammatione cronica è caratterizzata da:

- infiltrazione di cellule mononucleate che comprendono macrofagi, linfociti e plasmacellule
- danno tissutale, indotto dalla persistenza dell'agente lesivo o delle cellule infiammatorie
- tentativi di guarigione del tessuto che si realizzano con la proliferazione di piccoli vasi sanguigni (angiogenesi) e fibrosi.

Il macrofago è il protagonista dell'inflammatione cronica e compare nel sito del danno dopo circa 48 ore dall'evento scatenante. Nell'inflammatione cronica, l'accumulo di macrofagi diventa persistente perché essi sono reclutati continuamente nel focolaio infiammatorio. I fagociti mononucleati derivano tutti da un precursore comune nel midollo osseo, che dà origine ai monociti circolanti. Dal sangue, i monociti migrano in vari tessuti e si differenziano in macrofagi. L'emivita dei monociti circolanti è di circa 1 giorno, mentre quella dei macrofagi è di diversi mesi o anni. I monociti, una volta che sono migrati nel tessuto extravascolare, vanno incontro a

una trasformazione in cellule fagocitarie più grandi, i macrofagi. I macrofagi possono essere attivati da vari stimoli: citochine secrete dai linfociti T e dalle cellule Natural Killer, da endotossine batteriche e altri mediatori chimici. Il macrofago attivato, oltre ad essere un eccellente fagocita, secerne mediatori infiammatori, radicali liberi dell'ossigeno, enzimi litici, citochine, fattori di crescita (TGF, Transforming Growth Factor) e angiogenici. Inoltre, coopera con i linfociti T e B. Tuttavia, alcune delle molecole secrete possono arrecare danni al tessuto sano. Contemporaneamente è attivato un tentativo di riparazione tissutale che porta alla deposizione di collagene (fibrosi) e alla formazione di nuovi vasi dalla rete vascolare preesistente (angiogenesi) che favoriscono l'apporto di cellule e materiali utili alla riparazione tissutale e facilitano la rimozione dei dendriti cellulari derivanti dalla necrosi.

Tutto ciò spiega perché il tentativo di riparazione procede contemporaneamente alla distruzione tissutale.

1.3 Mediatori chimici dell'infiammazione

Dopo aver descritto gli eventi d'infiammazione, possiamo ora passare a considerare i mediatori chimici coinvolti. Si ricorda che i mediatori dell'infiammazione tendono a essere inattivati rapidamente, fatto che consente un'autolimitazione del processo infiammatorio. Per semplicità i mediatori chimici sono distinti in mediatori plasmatici e di origine cellulare (preformati o neosintetizzati).

- *Mediatori plasmatici*

Sistema del complemento: svolge, oltre all'attività batteriolitica nell'immunità innata, una funzione pro-infiammatoria in tutti i processi. Provoca aumento della permeabilità vascolare, chemiotassi e opsonizzazione. Le proteine del complemento sono presenti in forma inattiva nel plasma e sono numerate da C1 a C9.

Sistema delle chinine: genera peptidi vasoattivi a partire da proteine plasmatiche, dette chininogeni. L'attivazione del sistema delle chinine dà luogo al rilascio di bradichinina, la quale provoca aumento della permeabilità vascolare.

Sistema della coagulazione: l'infiammazione e il sistema della coagulazione sono processi strettamente correlati. Provoca aumento della permeabilità vascolare, adesione dei leucociti e chemiotassi.

- *Mediatori cellulari*

Preformati

Istamina: ampiamente distribuita nei tessuti. La fonte più ricca è rappresentata nei mastociti che sono normalmente presenti nel tessuto connettivo adiacente ai vasi sanguigni. Provoca aumento della permeabilità vascolare e vasodilatazione.

Enzimi lisosomiali: operano una degradazione diretta di macromolecole, amplificazione e rinforzo di altri mediatori.

Neosintetizzati:

Metaboliti dell'acido arachidonico, prostaglandine e leucotrieni: i fosfolipidi di membrana sono scissi ad opera della fosfolipasi A2 a formare acido arachidonico, il quale sarà processato dalla lipossigenasi o cicliossigenasi a formare rispettivamente leucotrieni e prostaglandine. Entrambi provocano vasodilatazione e aumento della permeabilità vascolare.

PAF: fattore di attivazione piastrinica di derivazione fosfolipidica. Oltre alla stimolazione piastrinica, causa vasodilatazione, aumento della permeabilità vascolare e promozione dell'adesione dei leucociti.

Ossido nitrico: gas solubile prodotto dalle cellule endoteliali, ma anche dai macrofagi e da alcuni neuroni del cervello. È un potente vasodilatatore grazie alla sua azione sulla muscolatura liscia.

Citochine: sono proteine prodotte soprattutto da macrofagi e linfociti attivati che svolgono numerose funzioni nella risposta immunitaria. Quelle più studiate e maggiormente coinvolte nell'infiammazione sono l'interleuchina 1 (IL-1), il fattore di necrosi tumorale (TNF- α) e l'interleuchina 6 (IL-6). Un gruppo particolare di citochine sono le chemochine, che

stimolano la chemiotassi. Questa classe sarà approfondita nel paragrafo successivo.

1.4 Immunità innata

L'immunità innata, insieme con l'immunità acquisita o adattiva, rappresenta uno dei due meccanismi del sistema immunitario, volti a proteggere gli individui da patogeni infettivi.

L'immunità innata è la prima risposta immunitaria che il corpo umano attua in caso di infezione da parte di microbi ed è più rapida dell'immunità acquisita, dal momento che si scatena nel giro di poche ore dall'infezione a differenza dei giorni che impiega la seconda. Possiede una specificità limitata alla possibilità di riconoscere molecole o parti di molecole espresse da una classe di agenti infettivi, ma spesso non riesce a discriminare un singolo agente patogeno a differenza della grande specificità dell'immunità acquisita. Va specificato che l'immunità innata non riconosce esclusivamente agenti infettivi, ma agisce anche su cellule self che, a causa di un'infezione o per stress esprimono molecole che normalmente non sono espresse dalle cellule sane, e che per questo sono riconosciute come non self. Non possiede nessun meccanismo di memoria cellulare atto a fornire una risposta più efficace e rapida in seguito all'infezione da parte di uno stesso agente infettivo, ma possiede metodi di discriminazione del self dal non-self che per molti versi la rendono una risposta immunitaria meno dannosa rispetto all'immunità acquisita poiché si ha un rischio praticamente nullo di errori che portino allo sviluppo di

patologie autoimmuni. L'immunità innata non è un meccanismo dissociato dall'immunità acquisita, ma contribuisce a stimolarla e a influenzarla tramite alcuni mediatori e segnali molecolari.

Strutturalmente l'immunità innata è costituita da diversi componenti in cui non figurano esclusivamente cellule, ma interi tessuti che fungono da barriera alla penetrazione di microbi sia per la loro conformazione che per alcune sostanze battericide che secernono (ad esempio, il naso che produce muco, lo stomaco che produce sostanze acide). Oltre alle barriere anatomiche dell'organismo, all'immunità innata partecipano anche le proteine del Sistema del Complemento, il sistema delle cellule fagocitarie (neutrofili e macrofagi), le cellule NK (natural killer) e le citochine.

1.4.1 Meccanismo d'azione

L'immunità innata riconosce i patogeni perché i recettori delle sue cellule si legano a delle molecole o porzioni di molecole che non sono espresse dalle cellule dell'organismo in cui viene attuata, sono perciò identificate come non self. La gamma di molecole riconosciuta dall'immunità innata, nota come profili molecolari associati ai patogeni (PAMP, Pathogen Associated Molecular Patterns) è tuttavia limitata, ridotta a circa un migliaio di strutture differenti, dal momento che i recettori per il riconoscimento dei profili (Pattern Recognition Receptors, PRR) hanno una variabilità molto inferiore rispetto a quelli dell'immunità adattativa, che può riconoscere diversi milioni di molecole differenti. Alcuni dei PAMPs più comuni sono il

lipopolisaccaride (LPS) espresso da molti batteri, gli RNA a doppio filamento virali, i peptidi contenenti formilmetionina esclusivi dei batteri (e delle proteine mitocondriali), le sequenze CpG (sequenza di DNA dove una citosina è seguita da una guanina) non metilate, alcuni oligosaccaridi ricchi di mannosio e fucosio o acido teicoico delle membrane batteriche. L'efficacia di questo tipo di risposta immunitaria risiede nel fatto che colpisce quasi sempre strutture essenziali per la sopravvivenza del patogeno, per esempio il lipopolisaccaride della parete cellulare batterica, per cui difficilmente il non self non viene riconosciuto. Anche alcune molecole rilasciate da cellule danneggiate chiamate "profili molecolari associati al danno" (Damage Associated Molecular Patterns, DAMPs) sono riconosciute dall'immunità innata che viene quindi stimolata ad eliminare queste cellule.

1.4.2 Recettori

I recettori dell'immunità innata sono proteine che possono trovarsi sia sulla membrana plasmatica di alcune cellule immunitarie sia all'interno del loro citoplasma o sulla membrana degli endosomi, ma possono anche essere proteine disciolte nel sangue oppure in liquidi extracellulari. Sono espressi da linfociti, macrofagi, granulociti neutrofili, cellule dendritiche, cellule epiteliali e cellule endoteliali. Il loro compito è quello di legarsi a strutture molecolari specifiche presenti su di un microbo e successivamente di attivare una trasduzione del segnale intracellulare che scatena una risposta

effettrice che può provenire dalla cellula stessa oppure da altre cellule (fagociti e linfociti NK) reclutate da mediatori chimici come le citochine. Le principali classi di PRR sono i recettori Toll-like (TLR, Toll-Like Receptors), le lectine di tipo C, i recettori del peptide Met-Leu-Phe formilato, i recettori scavenger, gli NLR e le proteine della famiglia CARD.

I *Toll-like receptors* (TLR) sono una famiglia di PRR che devono il loro nome al recettore Toll, identificato per la prima volta in *Drosophila* e sono la classe principale di recettori dell'immunità innata. Nell'uomo esistono undici recettori Toll-like, numerati da TLR1 a TLR11, caratterizzati da motivi ripetuti di leucina e sequenze ricche di cisteina sulla porzione extracellulare e da un dominio conservato Toll/IL-1R (dominio conservato omologo a Toll) nella porzione intracellulare, che svolge un ruolo di primo piano nella trasduzione del segnale. Alcuni TLR (TLR 1, 2, 4, 5, 6) sono recettori transmembrana collocati nella membrana plasmatica, altri (TLR 3, 7, 8, 9, 10, 11) si trovano nella membrana degli endosomi, del reticolo endoplasmatico rugoso o comunque sulla membrana di organelli intracellulari. I TLR riconoscono molecole espresse comunemente dai batteri o dai virus come lipopolisaccaride, acido teicoico, flagellina, CpG non metilate, RNA a singola e doppia elica (questi ultimi sono riconosciuti in particolare dai TLR intracellulari). Dopo il legame con la rispettiva molecola del microbo, scatenano la trasduzione del segnale che mediante una cascata di proteine attiva infine dei fattori trascrizionali come NF- κ B (Nuclear Factor κ B) o IRF (Interferon

Response Factor), i quali trascrivono geni coinvolti nell'immunità innata, come quelli che codificano per citochine infiammatorie, alcune chemochine e molecole di adesione all'endotelio. I TLR sono espressi da macrofagi, granulociti neutrofili, cellule dendritiche, cellule dell'epitelio delle mucose e cellule endoteliali.

Le *lectine di tipo C* sono proteine transmembrana calcio-dipendenti che legano alcuni polisaccaridi batterici come i glucani legati in posizioni insolite per i mammiferi ma molto comuni nei patogeni (come β -1,3 o β -1,6) espresse principalmente da macrofagi e cellule dendritiche. Una delle lectine di tipo C più comuni ed espresse è il recettore per il mannosio, di cui le pareti cellulari batteriche sono ricche. Le vie di trasduzione scatenate dalle lectine di tipo C confluiscono spesso con quelle attivate dai recettori di altri TLR.

I *recettori del peptide Met-Leu-Phe formilato* riconoscono peptidi batterici contenenti N-formilmethionina, un amminoacido non utilizzato dalle cellule dei mammiferi se non in ambito mitocondriale ma presente come amminoacido iniziale in tutte le proteine batteriche. Sono proteine transmembrana a sette passaggi associate a proteine G (GPCR, G Protein Coupled Receptors), per cui allo stato inattivo sono legati a proteine G eterotrimeriche alla cui subunità α è legato GDP, mentre allo stato attivo, quando il ligando si lega al dominio per il ligando del recettore, il GDP è scambiato con GTP. La trasduzione del segnale di questa tipologia di recettori tende a determinare come risposta un aumento del Ca^{2+} nel citoplasma, con conseguente

aumento della motilità del citoscheletro (fondamentale per le cellule fagocitarie) e l'attivazione della proteina chinasi C (PKC). Due dei recettori più noti di questa categoria sono FPR, espresso nei granulociti neutrofili e FPRL1, espresso nei macrofagi.

I *recettori scavenger* sono una classe di PRR espressi dai fagociti. Sono strutturalmente eterogenei ma tutti permettono l'ingresso di lipoproteine a bassa densità (LDL) ossidate o acetilate nelle cellule immunitarie. Alcuni dei più noti recettori di questa famiglia sono CD36 (SCARB3), CD68, SRB1, LOX1, i recettori scavenger di classe A (SCARA1, 2, 3, 4, 5) o quelli di classe B (SCARB1, 2).

Gli *NLR* (Nod-Like Receptors) sono proteine citoplasmatiche che riescono a riconoscere specifiche molecole batteriche qualora si trovino all'interno di una cellula. In risposta al riconoscimento di una molecola batterica come il peptidoglicano, scatenano la trasduzione del segnale che attiva NF- κ B, il quale trascrive geni coinvolti nelle risposte infiammatorie. I membri più noti di questa categoria sono i recettori Nod (Nucleotide binding Oligomerization Domain) come Nod1, Nod2, Nod3, e i recettori NALP (NACHT-LRR and pyrin domain containing Proteins) come NALP1, NALP2, NALP3.

Le *proteine CARD* (Caspase Activation and Recruitment Domain-containing proteins) sono recettori citoplasmatici contenenti il dominio CARD che riconosce l'RNA virale. Attivano vie di segnalazione che portano all'attivazione di IRF o NF- κ B e dunque alla produzione di interferoni. Le più note sono RIG-I e MDA5.

1.4.3 Trasduzione del segnale

Quando un recettore TLR si lega alla struttura che riconosce mediante il suo dominio di legame, dimerizza con un altro TLR che può essere identico (omodimerizzazione) o differente (eterodimerizzazione). I TLR della membrana plasmatica tendono a dimerizzare tra loro e così quelli presenti sulla membrana degli endosomi. La dimerizzazione sembra seguire schemi specifici per ciascun PAMP, per esempio nel caso del peptidoglicano TLR2 dimerizza con TLR6 formando un eterodimero. In alcuni casi il processo è più complesso e coinvolge delle proteine e dei recettori accessori. Nel caso del lipopolisaccaride (LPS) esso si associa dapprima a LPB (LPS binding protein), una proteina solubile presente nel plasma, poi questo complesso si lega al recettore CD14, una proteina estrinseca legata alla membrana plasmatica da glicofosfatidilinositolo. A questo punto LPB si distacca ed interviene la proteina MD2 che media l'attacco di CD14-LPB-LPS con il recettore Toll-like TLR4. Non è stato ancora definito se vi sia o meno un contatto diretto tra il lipopolisaccaride e TLR4. Una volta che il recettore è stato attivato dal ligando, recluta diverse proteine adattatrici che interagiscono con il suo dominio TIR (Toll IL-1 Receptor). Tutti i recettori TLR tranne TLR3 reclutano MyD88 (MYeloid Differentiation primary response gene 88) ed insieme ad esso formano combinazioni di proteine adattatrici tra le quali figurano MAL (MyD88 Adapter Like), TRIF (TIR domain containing adapter Inducing Interferon β) e TRAM (Trif-Related Adapter Molecule).

MyD88 e MAL attirano proteine IRAK (IL-1 Receptor Associated Kinase) come IRAK1 e IRAK4, che a loro volta interagiscono con TRAF6 (TNF Receptor Associated Factor 6) il quale attiva TAK1 (TGF- β Activated Kinase), che dà inizio alla cascata delle MAP-chinasi (Mytogen Activated Proteins) e attiva le chinasi I κ B. La

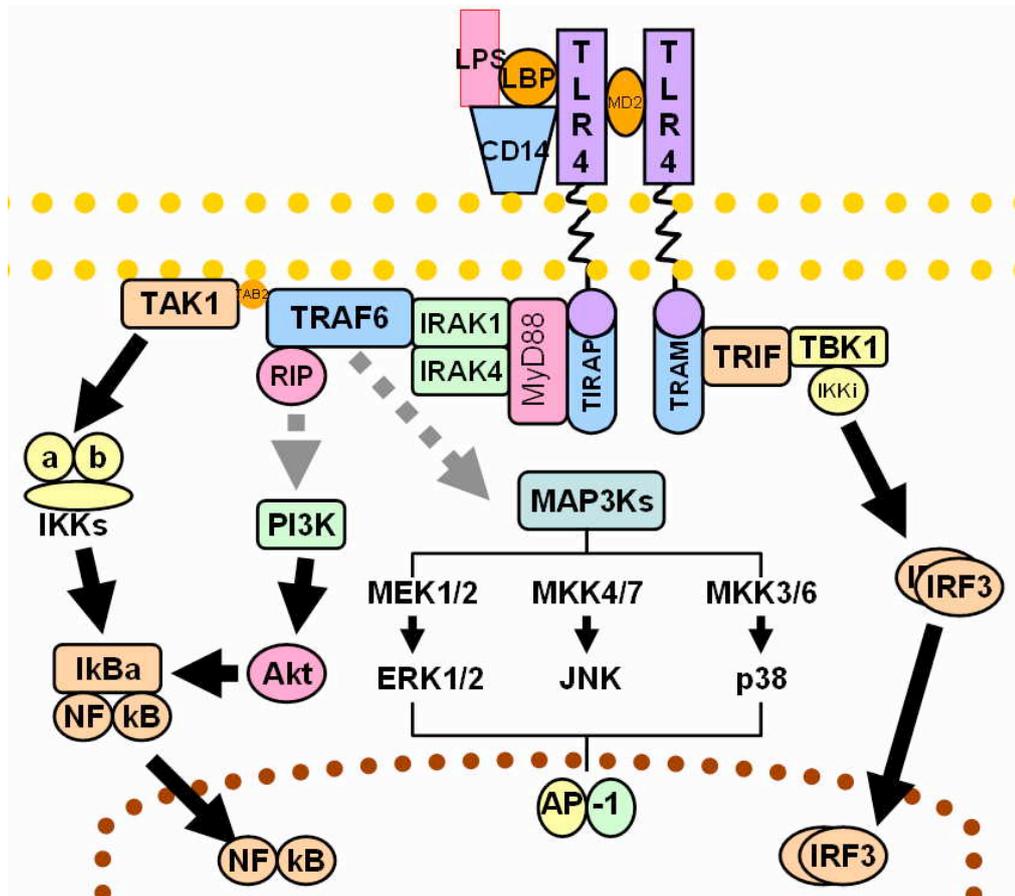


Fig. 1.2 – Trasduzione del segnale a seguito dell'attivazione dei recettori Toll-like.

cascata delle MAP-chinasi (IKK, NIK o NLK) attiva i fattori di trascrizione NF- κ B, Fos e Jun, queste proteine si associano formando il complesso di trascrizione AP-1 (Activator Protein 1). Tali fattori trascrivono geni codificanti interleuchine (IL-1, IL-6, IL-8, IL-12), fattore di necrosi tumorale (TNF), E-selectina, MCP-1 (Monocyte

Chemoattractant-Protein1). Nel caso siano reclutate TRAM e TRIF, esse si associano a TRAF6, che attiva TBK1 (Tank-Binding Kinase 1, dove TANK, Threonine-Protein Kinase) che a sua volta attiva il fattore di trascrizione IRF3 (Interferon Response Factor 3). IRF3 trascrive geni che codificano per gli interferoni α e β . I recettori TLR endosomiali come TLR3 e TLR9 reclutano rispettivamente TRIF e MyD88, il primo attiva TBK1 e successivamente IRF3, mentre il secondo attiva IRAK1 o IRAK4 che attivano TRAF6 e quindi la cascata della MAP chinasi e NF- κ B, mentre le IRAK attivano IRF7, che trascrive geni che codificano per interferoni.

1.5 Immunità acquisita

L'immunità acquisita (chiamata anche immunità adattiva o specifica) consiste di meccanismi che sono stimolati da (adattati a) microbi e che sono in grado di riconoscere anche le sostanze non microbiche, detti antigeni. L'immunità acquisita si sviluppa tardivamente, dopo l'esposizione a microrganismi ed è ancora più efficace nel combattere le infezioni. Per convenzione, il termine "risposta immunitaria" si riferisce all'immunità acquisita.

Vi sono due tipi di immunità adattiva, l'immunità cellulo-mediata (o cellulare), che è responsabile della difesa contro microbi intracellulari e l'immunità umorale, che protegge contro i batteri extracellulari e le loro tossine. L'immunità cellulare è mediata dai linfociti T e l'immunità umorale è mediata dai linfociti B e dai loro prodotti di secrezione, gli anticorpi.

Gli organi linfoidei primari, o generativi, sono i luoghi in cui vengono prodotti o inizia la maturazione dei linfociti. I due organi linfoidei primari nell'uomo sono il midollo osseo, da dove derivano inizialmente i progenitori dei linfociti e dove maturano i linfociti B, e il timo, dove maturano i linfociti T. I linfociti T si dividono principalmente in T-helper, T-citotossici e T-regolatori. Quando è in corso un'infezione, una cellula APC (Antigen-Presenting Cell) cattura l'antigene estraneo e lo trasporta attraverso i vasi sanguigni o i vasi linfatici fino a un organo linfoide secondario, generalmente un linfonodo nel caso sia trasportato per via linfatica, o la milza se per via ematica. Ciò permette di concentrare gli antigeni estranei in un luogo relativamente ristretto dove c'è un'alta concentrazione di linfociti naive (poiché essi vi migrano continuamente), cioè linfociti che non sono ancora venuti in contatto con l'antigene per cui sono specifici, e che possono interagire con le APC. Una volta che l'APC ha attivato il linfocita naive specifico per quell'antigene ha inizio la risposta immunitaria adattiva, il clone linfocitario attivato va incontro ad un'espansione clonale, cioè ad una forte proliferazione in seguito alla quale i linfociti attivati possono differenziarsi in linfociti effettori o cellule di memoria. Questi a loro volta migrano nel sangue, dove circolano fino a quando non raggiungono mediante chemiotassi, il sito dove è in corso l'infezione per svolgere le loro funzioni.

1.5.1 Linfociti T

L'attivazione dei linfociti T ha lo scopo di produrre una grande

quantità di linfociti T specifici per l'antigene riconosciuto come patogeno nel nostro organismo. I linfociti sono in grado di riconoscere un antigene grazie ai recettori di superficie antigene specifici TCR (antigen-specific T-Cell Receptor); questi sono associati a un certo numero di molecole non polimorfiche, dette anche molecole accessorie, di cui fanno parte le glicoproteine CD4 e CD8, che funzionano da corecettori e le glicoproteine CD2, CD28, CD40L e altre che fungono da costimolatori.

L'entrata di un agente microbico nell'organismo stimola l'immunità innata che a sua volta (mentre cerca di distruggere il patogeno) attiva la risposta adattiva. L'antigene proteico si lega alle proteine di classe I (per frammenti di batteri provenienti dal citosol) o II (per frammenti provenienti dal sito endolisosomiale) dell'MHC (Complesso Maggiore di Istocompatibilità) e tramite le cellule APC (Antigen-Presenting Cell) è presentato al linfocita, il quale lo riconosce tramite il complesso TRC; quindi, insieme al legame dei corecettori e dei costimolatori ha inizio la trasduzione del segnale all'interno della cellula, il cui fine è quello di attivare la trascrizione di geni normalmente non espressi nel linfocita T naive e che sono invece fulcro delle funzioni del linfocita T effetore. La formazione che si viene a creare tra la membrana plasmatica della cellula APC e quella del linfocita è detta sinapsi immunologica (SMAC, Supra-Molecular Activation Cluster). L'attivazione segue passaggi che prevedono il riconoscimento dell'antigene, la costimolazione, la produzione e la presenza di citochine, il tutto per indurre proliferazione e

differenziamento nei linfociti. La costimolazione o secondo segnale (come conseguenza al primo che risulta essere l'antigene) è un meccanismo che causa un aumento della risposta dei linfociti T dopo l'attivazione.

I linfociti T maturi possono essere distinti in due popolazioni in base alla presenza di proteine specifiche di membrana. I T helper, marcati dalla molecola di riconoscimento CD4 e quindi chiamati CD4+, sono cellule con funzioni regolatorie (secercono citochine), mentre i T citotossici CD8+, marcati dalla molecola di riconoscimento CD8, hanno funzioni effettrici (eliminano le cellule infettate).

Sono state individuate due popolazioni distinte di cellule helper CD4+. Le T helper 1 sintetizzano e secercono IL-2 e interferon- γ (IFN- γ), mentre le cellule T helper 2 producono IL-4, IL-5 e IL-13. La sottoclasse Th1 favorisce l'ipersensibilità ritardata, l'attivazione dei macrofagi, la sintesi di anticorpi (come le IgG2a nei topi), tutte azioni mediate dall'IFN- γ . La sottoclasse Th2 stimola la sintesi di altre sottoclassi di anticorpi, in particolare IgE (mediato da IL-4 e IL-13) e l'attivazione degli eosinofili (mediato da IL-5).

Le cellule T CD8+ agiscono soprattutto come cellule citotossiche ma, come le cellule CD4+, possono secerne citochine, principalmente del tipo Th1.

1.5.2 Linfociti B

I linfociti B originano da precursori immaturi del midollo osseo.

Le cellule B riconoscono l'antigene attraverso il complesso recettoriale della cellula B. Le immunoglobuline M (IgM) e IgD, presenti sulla superficie di cellule B native, costituiscono la componente antigene-legante del complesso recettoriale della cellula B. Dopo lo stimolo antigenico, le cellule B formano plasmacellule che secernono immunoglobuline, che sono mediatori dell'immunità umorale. Gli anticorpi secreti diffondono nelle secrezioni mucose e nel sangue e sono in grado di trovare, neutralizzare ed eliminare gli antigeni.

1.5.3 Cellule Natural Killer

Le cellule Natural Killer rappresentano circa il 10-15% dei linfociti del sangue periferico e non presentano recettori T-cellulari o immunoglobuline di superficie. Sono cellule importanti nel riconoscimento e distruzione di cellule tumorali e infette da virus. Sono in grado inoltre di produrre citochine, come l'interferone γ (che attiva i macrofagi), il fattore di necrosi tumorale e il fattore stimolante colonie granulocito-macrofagiche, GM-CSF. Le NK non necessitano di attivazione, avendo un sistema di riconoscimento del target del tutto diverso e indipendente dal "riconoscimento dell'antigene" caratteristico degli altri linfociti T e B. Le NK esplicano un'importante azione come prima difesa, tipica dell'immunità innata. Queste cellule sono le meno specializzate del sistema immunitario e distruggono ogni elemento cellulare riconosciuto come "non-self". Il riconoscimento avviene grazie a interazioni con il complesso

maggiore di istocompatibilità. Per questo motivo sono causa di rigetto nei trapianti di organi, riconosciuti come non self.

L'attività funzionale delle cellule NK è regolata dall'equilibrio tra segnali trasmessi da recettori attivatori e inibitori. Il recettore attivatore stimola l'attività citotossica delle cellule NK attraverso il riconoscimento di molecole malattia-specifiche sulle cellule bersaglio, alcune delle quali sono prodotti virali; i recettori inibitori frenano l'attivazione delle cellule NK riconoscendo molecole "self" e impedendo l'azione catalitica.

1.5.4 Macrofagi

I macrofagi appartengono al sistema dei fagociti mononucleati e originano dalla cellula staminale multipotente, sita nel midollo osseo, la quale subisce un processo di differenziamento, passando da monoblasto, monocita e infine macrofago. I macrofagi hanno un ruolo importante sia nella fase di induzione che in quella effettrice delle risposte immuni.

I macrofagi che hanno fagocitato microbi e antigeni proteici processano gli antigeni e presentano i frammenti peptidici alle cellule T. Quindi, i macrofagi sono coinvolti nell'induzione della risposta immunitaria cellulo-mediata.

I macrofagi sono coinvolti anche nell'immunità innata: effettuano fagocitosi dei microbi e producono citochine capaci di richiamare e attivare altre cellule infiammatorie.

In particolare, i macrofagi attivati, secernono:

- fattore di necrosi tumorale (TNF): prodotto anche dai linfociti T, determina infiammazione attivando i neutrofili e le cellule endoteliali. Agisce sull'ipotalamo provocando la febbre, sul fegato stimolando la sintesi delle proteine di fase acuta.
- IL-1: prodotta anche dalle cellule endoteliali, possiede effetti simili al TNF.
- IL-12: stimola sui linfociti T e sui linfociti NK la sintesi di IFN- γ che amplifica la risposta degli stessi macrofagi.

1.5.5 Citochine

L'innesco e la regolazione della risposta immunitaria vede molteplici interazioni tra linfociti, monociti, cellule infiammatorie e cellule endoteliali. Molte di queste interazioni dipendono da contatti tra le cellule; tuttavia, molte interazioni e funzioni effettrici sono mediate da citochine, mediatori solubili ad azione breve. Le citochine sono dette interleuchine, poiché mediano le comunicazioni tra leucociti. La maggior parte ha un ampio spettro di effetti e sono prodotte da diversi tipi di cellule. Per comodità, dividiamo queste molecole in classi funzionali distinte, anche se alcune appartengono a più di una categoria.

Citochine che mediano l'immunità innata. Sono inclusi IL-1, TNF- α , interferon di tipo 1 e IL-6. Alcune citochine, come IL-12 e

IFN γ , fanno parte sia dell'immunità innata che adattiva contro microbi. Alcune di queste citochine, come gli interferoni, proteggono contro le infezioni virali, mentre altre, come IL-1 e TNF promuovono il reclutamento dei leucociti e la risposta infiammatoria acuta.

Citochine che regolano la crescita, l'attivazione e il differenziamento dei leucociti. In questa categoria rientrano IL-2, IL-4, IL-12, IL-15 e il transforming growth factor- β (TGF- β). L'IL-2 è un importante fattore di crescita per le cellule T, l'IL-4 stimola il differenziamento verso i Th2 e agisce anche sulle cellule B, l'IL-12 stimola il differenziamento verso i Th1 e l'IL-15 stimola la crescita e l'attività delle cellule NK. Altre citochine in questo gruppo, come IL-10 e TGF- β , regolano negativamente la risposta infiammatoria.

Citochine che attivano la risposta infiammatoria. In questa categoria troviamo l'IFN- γ , che attiva i macrofagi, l'IL-5 che attiva gli eosinofili, il TNF- α e TNF- β che inducono infiammazione agendo sui neutrofili e cellule endoteliali.

Citochine che influiscono sui movimenti leucocitari, le chemochine. Le chemochine reclutano diversi tipi di leucociti nella sede di infiammazione.

Citochine che stimolano l'ematopoiesi. Molte citochine derivate da linfociti o da altre cellule stromali, stimolano la crescita e la produzione di nuove cellule ematiche, agendo sulle cellule ematopoietiche progenitrici. Numerosi componenti di questa famiglia

sono chiamati “fattori stimolanti colonie” (CSF).

Le citochine legandosi al proprio recettore, trasducono il segnale attivando la via JAK/STAT.

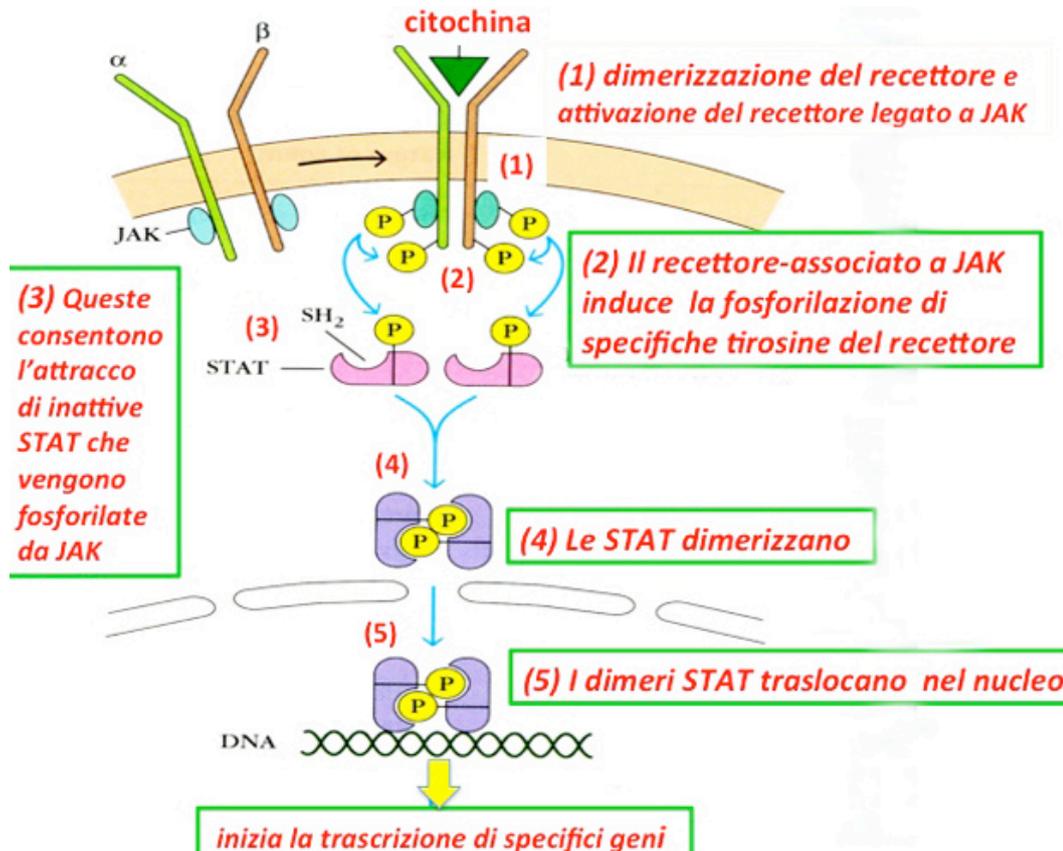


Fig. 1.3 – Cascata via JAK/STAT.

In assenza di citochina, le sub-unità recettoriali sono associate l'una all'altra in modo generico a livello della membrana e la regione citoplasmatica di ciascuna di queste sub-unità è associata in modo non covalente con delle tirosin-chinasi inattive, chiamate Janus Activated Kinases (JAKs, nome dovuto alla presenza di due domini molto simili bifronte). Il legame della citochina induce l'associazione delle due sub-unità recettoriali separate e l'attivazione delle JAKs associate al

recettore. Le JAKs associate al recettore fosforilano specifiche tirosine nelle sub-unità recettoriali. Questi residui di tirosina fosforilata servono come sedi di attracco per fattori di trascrizione inattivi conosciuti come Signal Transducers and Activators of Transcription (STATs). Le STATs inattive vengono fosforilate da JAK e dalle chinasi Tyk. I fattori di trascrizione STAT fosforilati dimerizzano, legandosi l'uno all'altro per mezzo di interazioni SH2/fosfotirosina. La fosforilazione dà poi luogo a modifiche conformazioni nel dimero STAT che evidenzia un segnale a localizzazione nucleare. Il dimero STAT trasloca dentro il nucleo, dove inizia la trascrizione di specifici geni.

CAPITOLO 2 - IMMUNOMETABOLISMO

L'inflammation è una risposta biologica complessa a un segnale di pericolo (un agente patogeno o allarme endogeno) e può essere descritta come un meccanismo protettivo stereotipato. In generale una risposta infiammatoria dirige i componenti del sistema immunitario nel sito di lesione e si manifesta con maggior afflusso di sangue, aumento della permeabilità vascolare, rilascio di peptidi chemiotattici e afflusso di neutrofili e cellule mononucleate.

L'inflammation locale è spesso definita come un aumento di cellule immunitarie, generalmente macrofagi, con successiva espressione dei geni coinvolti nella produzione di citochine e nell'aumento dei mediatori pro-infiammatori. Le infiammazioni locali, in una certa misura, possono trasformarsi in un'inflammation sistemica.

Nel contesto metabolico, sono spesso utilizzati i termini di “metaflammation” e di “immunometabolism” per evidenziare la stretta connessione tra eccesso di grassi di deposito e modifiche infiammatorie. Nell'obesità si osservano un'inflammation cronica di basso grado e un'attivazione del sistema immunitario, eventi che possono avere un ruolo nella patogenesi delle malattie metaboliche legate all'obesità. Infatti, l'aumento del grasso corporeo altera la risposta del corpo all'insulina, portando resistenza ad essa; l'insulino-resistenza e difetti nella secrezione di insulina sono alla base del diabete di tipo 2. La progressione da insulino-resistenza, registrata

nell'obesità, a diabete di tipo 2, rimane poco compresa ma implica un fallimento delle cellule β pancreatiche per compensare l'insulino-resistenza che porta a iperglicemia cronica. Nei paragrafi che seguono andiamo ad esaminare le evidenze che collegano il sistema immunitario all'obesità e quindi ad insulino-resistenza e insorgenza di diabete di tipo 2.

2.1 Malattie metaboliche

Dislipidemie

Le dislipidemie o iperliproteinemie comprendono un quadro eterogeneo di malattie del metabolismo, identificabili a livello biochimico, con la presenza di concentrazioni superiori alla media di una o più classi di lipoproteine. Il loro aumento comporta un incremento di lipidi (colesterolo, trigliceridi, fosfolipidi) nel plasma. L'interesse per le iperlipoproteinemie nasce dall'osservazione che le complicanze dell'aterosclerosi, e in particolare la cardiopatia ischemica sono direttamente proporzionali ai livelli di colesterolo del plasma e più precisamente, del colesterolo veicolato dalle LDL (low density lipoproteins), mentre sono inversamente proporzionali alle concentrazioni di HDL (high density lipoproteins).

Sindrome metabolica

La sindrome metabolica è una condizione che comprende una costellazione di anomalie metaboliche che costituiscono fattori di rischio cardiovascolare. La diagnosi clinica della sindrome metabolica

si fonda su criteri molto rigidi. La simultanea presenza di tre o più dei seguenti parametri è necessaria per diagnosticare la sindrome metabolica: aumento della circonferenza della vita, indice di massa corporea elevato, ipertrigliceridemia, bassi livelli di colesterolo HDL, ipertensione arteriosa, iperglicemia a digiuno. Un ruolo importante è rivestito dall'insulino-resistenza, che è spesso preludio allo sviluppo del diabete di tipo 2. Per insulino-resistenza si intende uno stadio in cui le quantità fisiologiche di insulina producono una risposta biologica ridotta, cioè si verifica una riduzione dell'azione dell'insulina sul controllo glicemico dopo il pasto. Ne consegue iperinsulinemia. Il tessuto adiposo viscerale, quello che si accumula nell'obesità centrale, sembra essere il motore principale della fisiopatologia della sindrome metabolica. Tale tessuto è definito organo adiposo per le sue attività peculiari non solo di tipo metabolico, ma anche endocrino. Il tessuto adiposo è in grado di produrre molte sostanze biologicamente attive, indicate complessivamente come adipochine. Oltre alle citochine classiche, avvengono la sintesi e l'insecrezione di molecole attive come la grelina, leptina e adiponectina, regolatrici del senso di fame e sazietà e del bilancio energetico.

Diabete mellito

Il diabete mellito comprende un gruppo eterogeneo di disordini del metabolismo glucidico, lipidico e proteico il cui denominatore comune è l'iperglicemia determinata da un deficit assoluto o relativo

di insulina. L'insulina è un ormone con diverse funzioni:

- facilita il trasporto del glucosio nelle cellule dei tessuti insulino-dipendenti (muscolo scheletrico e tessuto adiposo)
- promuove la glicogenosintesi nel fegato e muscolo scheletrico
- inibisce la gluconeogenesi nel fegato
- promuove la lipogenesi, inibisce la lipolisi nel tessuto adiposo
- facilita il passaggio di amminoacidi dal sangue alle cellule, stimola la sintesi proteica

Il deficit di insulina, relativo o assoluto, è alla base della classificazione del diabete in forme insulino-dipendenti o non insulino-dipendenti.

Il diabete di tipo I o diabete mellito insulino-dipendente, è caratterizzato dalla progressiva distruzione delle cellule β delle isole pancreatiche con conseguente diminuzione, fino alla scomparsa, della produzione di insulina. La conseguenza metabolica principale è l'iperglicemia che a lungo termine porta ad aterosclerosi che può aumentare il rischio per ictus e infarto del miocardio. Per la totale assenza di produzione endogena di insulina, si rende necessaria la somministrazione dell'ormone. Come per tutte le patologie autoimmuni, la patogenesi del diabete di tipo I è imputabile a fattori

genetici e ambientali.

Il diabete di tipo 2 o diabete mellito non insulino-dipendente, caratterizzato da un'inadeguata produzione insulinica e resistenza periferica all'ormone. I tessuti periferici, come il muscolo, il fegato o il tessuto adiposo possiedono recettori per l'insulina che, una volta attivati dalla presenza dell'ormone, innescano una complessa segnalazione citosolica che stimola la sintesi e l'esposizione sulla membrana dei trasportatori del glucosio GLUT-4. Nei pazienti con diabete di tipo 2, i tessuti periferici non sono in grado di captare il glucosio in presenza di normali livelli sierici di insulina. È possibile raggiungere un buon controllo metabolico attraverso opportuni regimi alimentari che, a volte, possono essere sufficienti. Può essere necessario l'utilizzo di farmaci che favoriscono l'utilizzazione del glucosio o l'increzione di insulina (antidiabetici orali) e infine può rendersi necessaria la somministrazione di insulina.

2.2 Infiammazione dei tessuti insulino-sensibili

Numerosi dati sperimentali e clinici hanno chiaramente stabilito che il tessuto adiposo, fegato, muscolo e pancreas sono siti di infiammazione in presenza di obesità e diabete di tipo 2; è stata vista una massiccia infiltrazione di macrofagi in questi tessuti a seguito di diversi studi effettuati in modelli umani e animali di obesità e diabete, nonché in individui umani obesi affetti da diabete di tipo 2 o sindrome metabolica. I macrofagi sono cellule cruciali per la produzione di citochine pro-infiammatorie, comprese TNF- α , IL-6 e IL-1 β .

Agiscono in modo autocrino e paracrino per favorire la resistenza all'insulina, interferendo con le vie di segnalazione dell'insulina nei tessuti periferici, attraverso l'attivazione dei pathways JNK e NF- κ B. Questi percorsi ("pathways") sono attivati in diversi tessuti nell'obesità e nel diabete di tipo 2 e hanno un ruolo centrale nel promuovere l'infiammazione.

2.2.1 Tessuto adiposo

Hotamisligil e colleghi furono i primi a dimostrare un'aumentata espressione e produzione di TNF- α nel tessuto adiposo di individui obesi e il suo ruolo diretto nell'insulino-resistenza indotta da obesità. Altri dati hanno poi confermato una specifica up-regulation dei geni che codificano per i fattori infiammatori e quindi un eccesso di produzione di molte citochine e chemochine nel tessuto adiposo aumentato. L'infiammazione del tessuto adiposo è stata così considerato come un evento cruciale che porta a sindrome metabolica, T2DM e disturbi aterosclerotici cardiovascolari.

In particolare, l'obesità induce un'infiltrazione di macrofagi nel tessuto adiposo sia nei topi che negli esseri umani. Anche se è stato dimostrato che gli stessi adipociti aumentati, producono citochine pro-infiammatorie e chemochine, i macrofagi del tessuto adiposo sembrano essere cruciali per la produzione di citochine proinfiammatorie. Infatti, il loro reclutamento è correlato con il grado di obesità ed è collegato a un'infiammazione sistemica, resistenza all'insulina e sindrome metabolica. Inoltre, in individui obesi, la

perdita di peso indotta da chirurgia dalla dieta ed esercizio fisico, determinano una riduzione del numero dei macrofagi nel tessuto adiposo, in parallelo alla diminuita espressione dei marker proinfiammatori sia nel tessuto adiposo che nel plasma.

I macrofagi possono essere classificati in due distinti sottotipi: il fenotipo 'macrofagi attivati in modo classico', denominati M1, che secernono citochine pro-infiammatorie come IL-1 β , IL-6, TNF- α , e il fenotipo 'macrofagi attivati alternativamente', definiti M2 che producono citochine antinfiammatorie come IL-10. Mentre nei topi, è ben consolidata l'esistenza nel tessuto adiposo di distinti sottoinsiemi di macrofagi M1 e M2, non è stata confermata nell'umano, dove i macrofagi sono stati piuttosto descritti come un mix tra fenotipi M1 e M2. Oltre all'infiltrazione dei macrofagi nel tessuto adiposo, l'obesità provoca un passaggio dal fenotipo M2 a quelli M1, inerente alla resistenza all'insulina, sia nei topi che nell'uomo. Segnali diretti e paracrini rilasciati dai macrofagi M1 possono compromettere la segnalazione dell'insulina e l'adipogenesi negli adipociti, mentre i macrofagi M2 sembrano proteggere contro la resistenza all'insulina indotta da obesità.

Sebbene i macrofagi siano la popolazione leucocitaria più abbondante in espansione nel tessuto adiposo, il sistema immunitario può seguire altre vie per promuovere l'infiammazione indotta dall'obesità. I linfociti infiltranti precedono le popolazioni di macrofagi nel tessuto adiposo, causando insulino-resistenza precoce, e

possono modificare il numero e lo stato di attivazione dei macrofagi tissutali. Nei modelli murini di obesità, l'aumento del numero di cellule effettrici citotossiche CD8+, sembra avviare il reclutamento e l'attivazione dei macrofagi del tessuto adiposo e promuovere cascate pro-infiammatorie associate a insulino-resistenza. L'obesità induce anche una modifica dell'equilibrio tra i sottoinsiemi delle cellule pro-infiammatorie (linfociti T helper 1 e T helper 17) e anti-infiammatorie (linfociti regolatori T helper 2) del sottoinsieme CD4+, che porta alla secrezione di citochine dai nuovi macrofagi tissutali. Di particolare interesse, il numero di linfociti T anti-infiammatori regolatori diminuisce con l'obesità nel tessuto adiposo nei topi e nell'uomo e ancora di più nei pazienti obesi con sindrome metabolica. I linfociti T regolatori esprimono alte quantità della citochina antinfiammatoria IL-10, la quale inibisce la migrazione dei macrofagi e induce la differenziazione di macrofagi M2. Un aumento del numero di queste cellule nei topi obesi può migliorare la sensibilità all'insulina e ridurre l'infiltrazione di macrofagi nel tessuto adiposo. Questi dati suggeriscono che le cellule T regolatrici possono reprimere l'infiammazione nel tessuto adiposo e giocare un ruolo nel fornire protezione contro l'insulino-resistenza indotta dall'infiammazione collegata all'obesità.

Complessivamente, questi dati rivelano una complicata interazione tra cellule dell'immunità innata e adattativa e l'equilibrio tra queste cellule immunitarie sembra essere importante per l'omeostasi e il controllo dell'infiammazione del tessuto adiposo nell'obesità e diabete

di tipo 2. Tuttavia, gli eventi molecolari che iniziano il reclutamento delle cellule immunitarie e l'attivazione non sono ancora pienamente compresi.

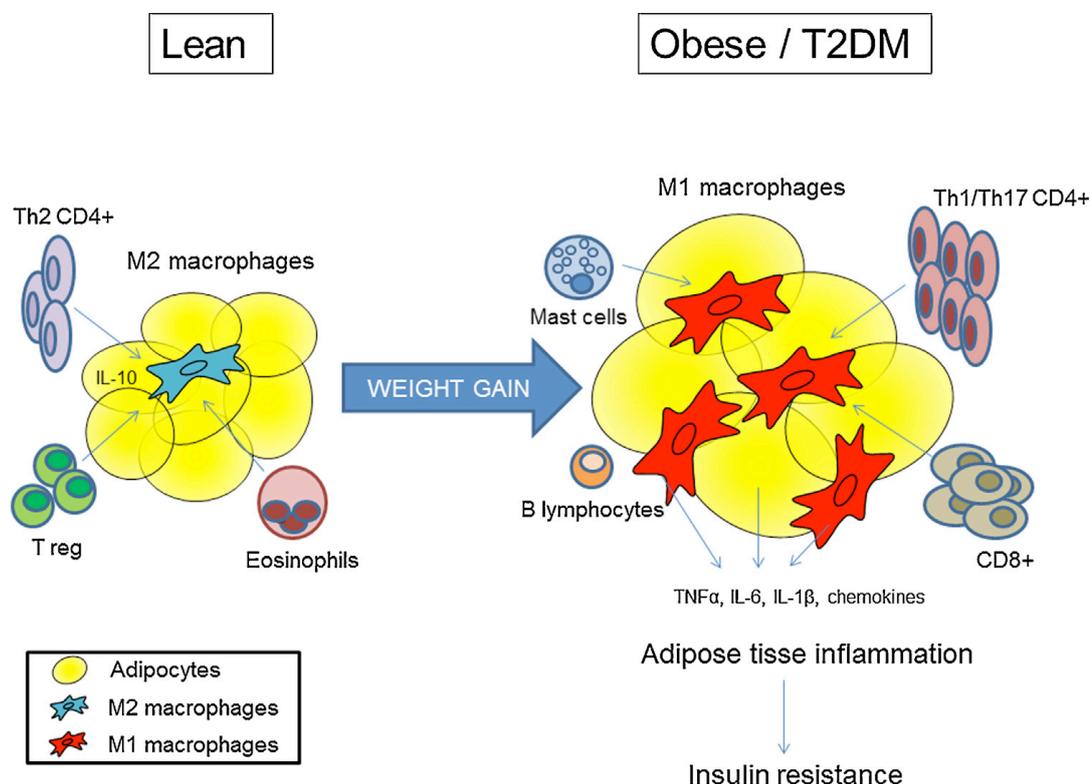


Fig. 2.1 – Infiammazione del tessuto adiposo nella patogenesi della sindrome metabolica e diabete di tipo 2.

L'obesità induce ipertrofia degli adipociti e attivazione fenotipica delle cellule staminali non definite a uno stato pro-infiammatorio. Le cellule del sistema immunitario adattativo interagiscono con i macrofagi del tessuto adiposo per modificare il loro stato di attivazione. Nel tessuto adiposo, T helper tipo 2, linfociti T regolatori e eosinofili promuovono il passaggio ai macrofagi M2, che mantengono uno stato antiinfiammatorio. Nell'obesità e diabete di tipo 2, il tessuto adiposo è caratterizzato da un arricchimento di macrofagi e linfociti T con un passaggio da uno stato antiinfiammatorio ad uno pro-infiammatorio. I linfociti CD8+ citotossici, linfociti T helper tipo 1 e T helper di tipo 17 stimolano la trasformazione verso i macrofagi M1. Altre cellule aumentano, compresi i linfociti B e mastociti, e possono contribuire all'infiammazione indotta dall'obesità. Nell'obesità, lo squilibrio tra le cellule immunitarie si traduce in una produzione di chemochine e citochine pro-infiammatorie, che promuovono l'infiammazione sistemica e insulino-resistenza.

Tessuto adiposo sottocutaneo e viscerale

L'obesità addominale è la componente chiave della sindrome metabolica, in pratica clinica, misurata dalla circonferenza della vita. Oltre all'adiposità totale, il ruolo patogenico del tessuto adiposo sembra essere determinato dalla sua posizione anatomica. Nonostante i tessuti adiposi, sottocutaneo e viscerale, siano associati con il rischio metabolico, eccessivo tessuto adiposo viscerale è maggiormente correlato con la sindrome metabolica rispetto al sottocutaneo. Inoltre, è associato con l'accumulo di lipidi ectopici nel fegato e nel muscolo scheletrico, che partecipano all'insulino-resistenza locale e contribuiscono a complicanze metaboliche associate. Tessuti adiposi sottocutanei e viscerali differiscono da caratteristiche fenotipiche, fisiologiche e funzionali. Sono state riportate specifiche differenze nel profilo infiammatorio, con più macrofagi, linfociti T e molecole infiammatorie nel viscerale contro i tessuti sottocutanei degli individui obesi. Inoltre, un numero inferiore di linfociti T antinfiammatori regolatori sono stati recentemente trovati nel tessuto adiposo viscerale dei soggetti obesi con sindrome metabolica. Questo profilo infiammatorio meno favorevole del tessuto adiposo viscerale, è in linea con la convinzione che questo tessuto abbia un ruolo più importante nello sviluppo dell'insulino-resistenza correlata all'obesità.

2.2.2. Fegato

La steatosi epatica non alcolica (NAFLD) accompagna spesso l'obesità addominale, e la sua prevalenza aumenta in parallelo a quella

del diabete di tipo 2. NAFLD comprende un ampio spettro di lesioni, dalla semplice steatosi benigna a steatoepatite non alcolica (NASH), che può portare a cirrosi e a epatocarcinoma. L'infiammazione gioca chiaramente un ruolo cardine nella progressione di questa patologia. Nell'obesità, la NAFLD e la conseguente insulino-resistenza epatica sono associate con una maggiore espressione e sovrapproduzione di mediatori dell'infiammazione, compresi TNF- α , IL-6 e IL-1 β . A differenza del tessuto adiposo, il fegato è densamente popolato con macrofagi residenti, le cellule di Kupffer, che rappresentano oltre il 10% cellule epatiche totali. Il numero di cellule di Kupffer non aumenta con l'obesità, ma il loro stato di attivazione cambia.

Sebbene le cellule di Kupffer siano meno studiate rispetto ai macrofagi, nel contesto di insulino-resistenza, essi chiaramente contribuiscono alla produzione di mediatori infiammatori che promuovono la resistenza all'insulina nel fegato. È interessante notare, come già descritto per i macrofagi del tessuto adiposo, l'attivazione del fenotipo alternativo M2 delle cellule di Kupffer sembra migliorare la resistenza all'insulina e ritardare la progressione di NASH nei topi. Questi dati suggeriscono che la steatosi potrebbe indurre una risposta infiammatoria sub-acuta nel fegato, simile a quella osservata nell'infiammazione del tessuto adiposo seguente l'accumulo di lipidi adipocitari. In alternativa, i mediatori proinfiammatori nella circolazione portale, potenzialmente prodotti dal grasso addominale, potrebbero anche avviare l'infiammazione epatica.

2.2.3. Muscolo

Il muscolo è un altro organo importante nella resistenza all'insulina, nell'obesità e diabete di tipo 2. Recenti studi hanno mostrato un'infiltrazione dei macrofagi all'interno dei muscoli scheletrici di topi obesi, in particolare nei depositi adiposi intramuscolari. Come nel tessuto adiposo, i macrofagi del muscolo scheletrico mostrano un fenotipo M1 proinfiammatorio, accompagnato da un'aumentata espressione di fattori infiammatori, contribuendo a livello locale per l'insulino-resistenza. Inoltre, l'espressione genica dei marcatori fenotipici di macrofagi pro-e anti-infiammatori nel muscolo scheletrico umano, sembrano essere correlati con la sensibilità all'insulina. Tuttavia, il numero di macrofagi nel muscolo scheletrico nei pazienti obesi è molto inferiore a quello contenuto nel tessuto adiposo o fegato. Per questo, sono necessarie ulteriori ricerche per determinare se il muscolo scheletrico sia veramente un obiettivo dell'insulino-resistenza indotta da infiammazione.

2.2.4 Pancreas

La progressione dell'insulino-resistenza correlata all'obesità e al diabete di tipo 2 implica un fallimento delle cellule β pancreatiche per compensare la resistenza all'insulina, determinando iperglicemia cronica. Nei pazienti diabetici tipo 2 è stata dimostrata un'infiammazione anche nelle isole pancreatiche, indicato dalla presenza di depositi di amiloide, fibrosi, aumentata morte delle cellule

β e infiltrazione di macrofagi con aumento dei livelli di citochine pro-infiammatorie e chemochine. Infatti, negli individui diabetici di tipo 2, è aumentata l'espressione e il rilascio locale della citochina proinfiammatoria IL-1 β nelle isole pancreatiche. Questa citochina sembra essere un regolatore principale dell'infiammazione degli isolotti nel diabete di tipo 2, aumentando l'espressione locale di citochine pro-infiammatorie e chemochine, portando al reclutamento di cellule immunitarie nelle isole. Questa infiammazione locale può ridurre la secrezione di insulina e innescare l'apoptosi delle cellule β , che porta a diminuire la massa degli isolotti, tutti eventi critici nella progressione del diabete di tipo 2.

2.3 Marker infiammatori nell'obesità e T2DM

2.3.1 IL-1

Nel 1977, Charles Dinarello descrisse per la prima volta la proteina IL-1, una citochina proinfiammatoria chiamata anche pirogeno, perché in grado di indurre la febbre. IL-1 è costituita da due principali proteine, IL-1 α e IL-1 β , le quali hanno simili proprietà biologiche ma sono fundamentalmente diverse nella localizzazione, maturazione e secrezione. Infatti, IL-1 α viene prodotta come forma biologicamente attiva, mentre IL-1 β viene generata da un precursore inattivo, la pro-IL-1 β che viene poi attivata da una proteasi, la caspasi-1. L'enzima caspasi-1, a sua volta, è controllato da un complesso proteico chiamato inflammasoma. Sia IL-1 α che IL-1 β si legano al

recettore IL-1 tipo I (IL-1RI) generando effetti simili. Oltre a queste, esiste anche un'altra citochina strutturalmente omologa (e quindi in grado di legarsi agli stessi recettori) ma funzionalmente inattiva; essa agisce quindi da inibitore, bloccando gli effetti di IL-1 α e IL-1 β e viene perciò chiamata IL-1 RA (IL-1 Receptor Antagonist). Sulla base dell'omologia strutturale e dell'attività biologica, fanno parte della famiglia delle IL-1 altri 11 membri, alcuni dei quali andremo a discutere più avanti.

2.3.1.1 IL-1 β e inflammasoma NLRP3

È stato dimostrato che l'IL-1 svolge un ruolo importante in molte malattie infiammatorie da iniziatore e potenziatore delle risposte infiammatorie e in particolare, diversi studi legano l'IL-1 β con l'obesità e la resistenza all'insulina, premessa per lo sviluppo di diabete. Sebbene diabete di tipo 1 e tipo 2 siano malattie diverse, entrambe sono caratterizzate da una distruzione delle cellule β pancreatiche. I meccanismi molecolari che portano alla distruzione delle cellule β nel diabete di tipo 1 sono abbastanza ben definiti poiché T1DM è un malattia autoimmune; tuttavia, i meccanismi che portano alla distruzione delle cellule β nel diabete di tipo 2 sono meno conosciuti. Dato che la resistenza all'insulina precede il diabete di tipo 2, è chiaro che l'iperinsulinemia o l'ipersecrezione di insulina dalle cellule β , sono seguiti da un peggioramento della funzione delle cellule β e morte cellulare mediante apoptosi. L'iniziatore dell'apoptosi è oggetto di discussione, ma è diventato abbastanza

evidente che IL-1 β è una citochina chiave nell'eziologia di T2DM, perché è implicata sia nella disfunzione che morte delle cellule β .

Esperimenti di laboratorio effettuati su topi alimentati con una dieta ricca di grassi, hanno registrato un aumento dei livelli di IL-1 β nel tessuto adiposo, a differenza dei topi nutriti con una dieta a basso contenuto di grassi. Un altro esperimento effettuato su topi trattati con IL-1 β , ha dimostrato che IL-1 β riduceva l'assorbimento di glucosio indotto dall'insulina, evento associato con una diminuita espressione dei geni del trasportatore del glucosio GLUT4, durante la differenziazione degli adipociti. Al contrario, il trattamento con IL-Ra, aumentava la sensibilità all'insulina a livello del tessuto adiposo. Questi risultati suggeriscono che l'obesità è associata con un aumento del rilascio di IL-1 β dal tessuto adiposo, che inibisce la sensibilità all'insulina.

La fonte di IL-1 β attiva non è chiara. Nel tessuto adiposo, i macrofagi penetrati a questo livello, sembrano essere i promotori principali della produzione di citochine durante lo sviluppo dell'obesità. Tuttavia, gli adipociti sono in grado di secernere IL-1 β , anche se in quantità minori rispetto ai macrofagi. Forse in vivo, la sinergia tra gli adipociti e l'infiltrazione delle cellule immunitarie nel tessuto adiposo, determina la definitiva capacità infiammatoria del tessuto adiposo.

Per quanto riguarda il tessuto adiposo, i trigger esatti e i successivi

meccanismi della cascata infiammatoria non sono chiari. La letteratura ha fornito una serie di ipotesi. È probabile che l'attivazione della risposta immunitaria innata associata all'obesità comporti un impegno dei Pattern Recognition Receptors (PRR), in particolare, di questa famiglia, i recettori Toll-like (TLR) sono in prima linea dell'immunità innata e possono percepire specifici ligandi esogeni ed endogeni.

Tuttavia, per la produzione e il rilascio di citochine della famiglia IL-1, l'attivazione dipendente da PRR non è sufficiente, e recenti studi hanno dimostrato che sono richiesti due segnali. Mentre il primo segnale 'innesca' la cellula e agisce come un induttore dell'IL-1 β e della trascrizione dell'mRNA del recettore NLR3 (Nod-like-receptor-3) della famiglia dei recettori NOD (Nucleotide binding Oligomerization Domain), il secondo segnale induce cambiamenti conformazionali nell'inflammasoma, complesso proteico coinvolto nell'immunità innata, il quale attiva la caspasi-1.

Classicamente, il primo segnale è causato da invasori patogeni riconosciuti dai TLR che portano alla trascrizione dell'mRNA della pro-IL-1 β , che viene stoccata inattiva nella cellula. Il secondo segnale è di natura più eterogenea e può consistere non solo di componenti microbiche ma anche di ligandi endogeni, come l'adenosina trifosfato (ATP) o acido urico. Come questi ligandi inducano l'attivazione della caspasi-1 non è precisamente conosciuto, ma un rapido flusso di K⁺ dalle cellule, sembra un comune denominatore.

Non tutti i tipi di cellule hanno bisogno di questo tipo di

attivazione per indurre la produzione di IL-1 β ; per esempio, i monociti richiedono solo il primo segnale per indurre il rilascio di IL-1 β , a causa dell'attivazione costitutiva della caspasi-1 in questo tipo di cellule. IL-1 β può anche essere elaborata da una scissione caspasi-1-indipendente attraverso proteasi serine derivanti da neutrofili.

L'inflammasoma è un complesso proteico ad alto peso molecolare e un componente centrale dell'immunità innata: riconosce prodotti microbici (PAMPs, Pathogen Associated Molecular Patterns) e molecole endogene (DAMPs, Danger Associated Molecular Patterns) attraverso recettori PRRs. L'inflammasoma comprende principalmente l'interazione tra un Pattern Recognition Receptors (PRR), in particolare un membro della famiglia degli NLR, la proteina ASC (apoptosis-associated speck-like protein with a CARD), una proteina pro-apoptotica contenente "pyrin domain" (PD) e "caspase-recruitment domain" (CARD) e la caspasi-1. Fra diversi NLRs che formano le piattaforme dell'inflammasoma, esistono evidenze convincenti di un ruolo importante della famiglia NLRP3 (NOD-like receptor family, pyrin domain containing 3) nella progressione dell'obesità al diabete tipo 2.

Molte evidenze scientifiche attribuiscono un ruolo centrale all'inflammasoma NLRP3 nella resistenza all'insulina indotta da obesità. Nel tessuto adiposo e soprattutto nei macrofagi si registra un aumento dell'espressione dei componenti dell'inflammasoma NLRP3, dell'attività della caspasi-1 e dei livelli di IL-1 β ; caratteristiche tipiche

della sindrome metabolica e della gravità del diabete di tipo 2.

L'inflammasoma NLRP3 sembra fungere da sensore di segnali pericolosi metabolici che si accumulano durante l'obesità, tra cui alti livelli di glucosio, acidi grassi liberi saturi, lipidi intermedi come ceramidi e acido urico, e la sua attivazione provoca la produzione di IL-1 β e l'induzione di numerose citochine e chemochine. La sua inibizione ha mostrato di avere effetti pleiotropici combinati, migliorata segnalazione dell'insulina nel tessuto adiposo, fegato e muscolo scheletrico, e aumento della secrezione di insulina nel pancreas.

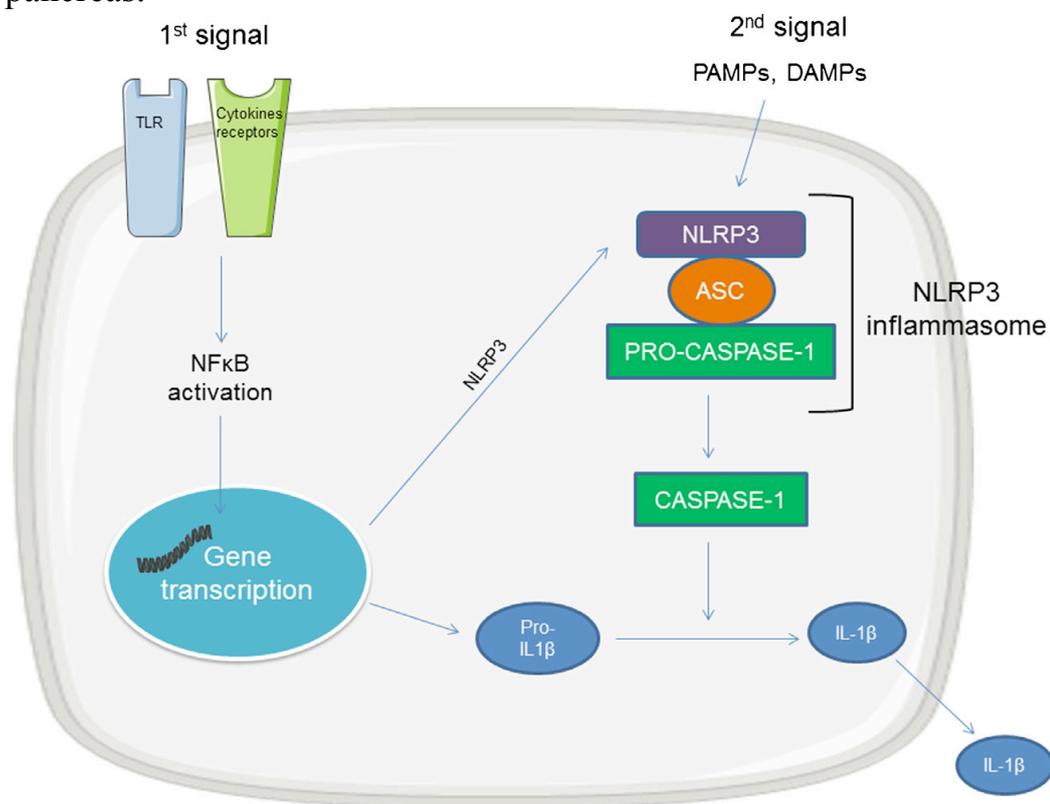


Fig. 2.1 – Inflammasoma NLRP3 attivo.

L'attivazione dell'inflammasoma NLRP3 e la successiva

produzione di IL-1 β , sono dei meccanismi rintracciati anche nelle cellule β pancreatiche permeate dai macrofagi. Essi contribuiscono all'infiammazione degli isolotti pancreatici, indotta da esposizione cronica ad alti livelli di acidi grassi liberi e glucosio, portando ad un aumento dell'apoptosi e ridotta secrezione insulinica dalle cellule β . Inoltre, sembra che la proteina IAPP (Islet Amyloid Polypeptide), una proteina che forma i depositi di amiloide nel pancreas in pazienti affetti da T2DM, contribuisca alla produzione di IL-1 β negli isolotti attraverso l'attivazione dell'inflammasoma NLRP3. Diversi studi sembrano confermare che la proteina IAPP contribuisca all'infiammazione degli isolotti reclutando e attivando macrofagi.

2.3.1.2 Caspasi-1

A causa del ruolo cruciale della caspasi-1 per l'attivazione dell'IL-1 β , sono stati eseguiti una serie di esperimenti per determinare il suo ruolo nell'attivazione dell'inflammasoma nel tessuto adiposo. In primo luogo, l'espressione della caspasi-1 è stata valutata durante adipogenesi in vitro.

La differenziazione degli adipociti sia nei topi che nell'uomo è stata associata con un significativo aumento dell'espressione di caspasi-1, in parallelo con l'espressione di PPAR- γ . La proteina codificata dal gene PPAR- γ è coinvolta nella differenziazione degli adipociti, nel deposito degli acidi grassi e metabolismo del glucosio. Successivamente è stato notato un aumento dell'espressione genica

della caspasi-1 e la sua attivazione nel tessuto adiposo bianco (WAT) di topi alimentati con una dieta ad alto contenuto di grassi (HDF). L'inibizione della caspasi-1 tramite pralnacasan, negli animali geneticamente obesi, riduceva non solo l'incremento di peso ma migliorava anche la sensibilità all'insulina. In parallelo, i topi che erano geneticamente deficienti per caspasi-1 erano protetti contro la resistenza all'insulina indotta da HDF.

Studi simili sono stati effettuati su topi che erano geneticamente deficienti per NLRP3 e ASC. È stato visto che i topi ASC deficienti, avevano un fenotipo simile a quella dei topi caspasi-1 deficienti, poiché protetti da insulino-resistenza indotta da HDF e ipertrofia degli adipociti, sebbene l'afflusso di macrofagi nel tessuto adiposo non fosse impedito. I topi NLRP3 deficienti presentavano una risposta minima a HDF, suggerendo che sebbene NLRP3 giochi un ruolo fondamentale, l'attivazione della caspasi-1 negli adipociti può verificarsi anche attraverso membri non NLRP3 o è in parte indipendente dall'inflammasoma.

Un altro gruppo di studi ha mostrato che nei soggetti obesi con diabete di tipo 2, la restrizione calorica e la perdita di peso con l'esercizio fisico, è stata associata con una riduzione dell'espressione tissutale di NLRP3 nonché con una diminuzione dell'infiammazione e migliorata sensibilità all'insulina. È stato ipotizzato che l'inflammasoma NLRP3 captando segnali esogeni o endogeni, induca un ulteriore clivaggio della caspasi-1 nei macrofagi e nel tessuto

adiposo. Nei topi che erano geneticamente NLRP3 deficiente, non si aveva l'attivazione dell'inflammasoma e una segnalazione rafforzata dell'insulina. Questo gruppo di studio ha anche trovato prove di un coinvolgimento della proteina ASC nella resistenza all'insulina associata all'obesità.

Complessivamente, questi dati dimostrano che i componenti dell'inflammasoma NLRP3 sono coinvolti nel rilevamento dei segnali di pericolo associati all'obesità e contribuiscono all'inflammatione indotta dall'obesità e all'insulino-resistenza. Però, in questo contesto, la caspasi-1 sembra essere il regolatore più importante, seguito da ASC, mentre l'NLRP3 probabilmente gioca un ruolo più indiretto.

In futuro, quando la composizione e la funzione dell'inflammasoma saranno ulteriormente definite, sarà più chiaro anche il contributo all'inflammatione associata all'obesità, dei suoi componenti individuali.

2.3.2 *TNF- α*

Tra le citochine proinfiammatorie, il TNF- α è il più studiato e da sempre associato alla resistenza all'insulina. Il primo studio che ha stabilito il concetto di inflammatione del tessuto adiposo indotta da obesità è stato condotto da Hotamisligil e colleghi, i quali notarono che il TNF- α era elevato nei roditori obesi e che la neutralizzazione di TNF- α migliorava l'insulino-resistenza. Inoltre, i topi deficienti in TNF- α avevano un miglioramento della sensibilità all'insulina. Anche

in vitro, a seguito del trattamento degli adipociti con TNF- α , questo induce insulino-resistenza, con conseguente diminuita espressione delle risposte insuliniche dei trasportatori di glucosio GLUT4 e PPAR- γ . TNF- α può stimolare serine chinasi, che portano alla fosforilazione della serina del substrato-1 del recettore dell'insulina (IRS-1), che a sua volta riduce a valle la segnalazione dell'insulina. TNF- α attenua il segnale insulinico negli adipociti, migliorando l'espressione della proteina soppressore di segnalazione delle citochine SOCS (Suppressor Of Cytokine Signaling proteins) che lega il recettore per l'insulina e riduce la sua capacità di fosforilare le proteine dell'IRS.

2.3.3 *IL-18*

L'IL-18 è un membro della famiglia delle citochine IL-1 ed è largamente espressa in molte cellule e/o tessuti compresi fegato, tessuto adiposo, muscolo scheletrico, pancreas, cervello ed endotelio. L'IL-18 è meglio conosciuta per il suo ruolo nell'infiammazione, perché l'inflammasoma porta all'attivazione di caspasi-1, mediante la scissione della pro-IL-18 nell'IL-18 matura. Successivamente l'IL-18 trasduce il segnale tramite recettori eterodimeri transmembrana IL-18 (α e β) e recettori TLR, con il risultato di attivare i fattori di trascrizione NF κ B. Studi in topi carenti di NLRP3 hanno dimostrato, senza sorpresa, che la produzione di IL-18 era ridotta e questo era associato a una migliore omeostasi metabolica in condizione di sovraccarico di nutrienti, implicando l'IL-18 come un potenziale

mediatore nella resistenza all'insulina nel contesto dell'inflammatione indotta da obesità. A sostegno di questa tesi, si è visto che le concentrazioni di IL-18 sono elevate nel sangue degli esseri umani obesi e in pazienti con diabete di tipo 2. Tuttavia, un blocco completo delle citochine infiammatorie chiave, può essere indesiderabile per il mantenimento dell'omeostasi metabolica e questo, infatti, sembra essere il caso dell'IL-18. Uno studio effettuato da due diversi laboratori, dimostrava che i topi carenti in IL-18 divenivano obesi e resistenti all'insulina, mentre il trattamento con IL-18 ricombinante migliorava le loro condizioni. Al contrario, invece, in un altro studio, è stato mostrato che i topi carenti di IL-18 attivavano la trasduzione del segnale tramite fattori di trascrizione STAT3 nel fegato e per questo avevano esacerbato steatosi epatica non alcolica; questo dimostrava che STAT3 ha un ruolo fondamentale nel mantenere l'omeostasi metabolica nel fegato.

STAT3 inoltre è una via di segnalazione che provoca l'attivazione della chinasi AMPK (attivata dall'AMP), che aumenta l'ossidazione dei grassi nel muscolo scheletrico, attenuando così l'alta percentuale di grassi nella dieta inducente resistenza a insulina.

In questo recente studio, i topi deficienti di recettori per IL-18 hanno mostrato aumento di peso e nel muscolo scheletrico, deposizione lipidica, rafforzata inflammatione, e ridotta segnalazione AMPK.

Gli studi effettuati, quindi, hanno evidenziato il ruolo paradossale

dell'IL-18, ponendo forti dubbi sull'utilità di un suo blocco totale.

2.3.4 IL-33

L'IL-33 è stata completamente caratterizzata durante la metà degli anni 2000 come una citochina con stretta omologia di sequenza con l'IL-18, ma che segnala attraverso un recettore simile a quello dell'IL-1 noto anche come ST2L, recettore transmembrana membro della superfamiglia dei recettori TIR (recettore Toll-interleuchina 1). Sembra che la pro IL-33 abbia proprietà anti-infiammatorie, ma l'IL-33 matura, prodotto dal processo dell'inflammasoma, è proinfiammatoria. Se l'IL-33 sia pro o anti-infiammatoria dipende anche dalla particolare malattia e/o modello in fase di studio. Studi recenti hanno identificato che l'IL-33 è espressa nell'uomo sia negli adipociti che pre-adipociti. Similmente al paradosso dell'IL-18, un recente studio importante suggerisce che l'IL-33 ha un ruolo protettivo, anziché deleterio, nell'omeostasi metabolica. Uno studio recente ha mostrato che la somministrazione di IL-33 ricombinante a topi carenti ha ridotto l'adiposità, la glicemia a digiuno e migliorata la tolleranza al glucosio e insulina. Inoltre, i topi privi di ST2L endogeno, il quale non attiva i fattori di trascrizione NFκB, avevano avuto un aumento del peso corporeo e della massa grassa, peggioramenti nella secrezione di insulina e nella regolazione del glucosio, quando nutriti con una dieta ricca di grassi. Pertanto, analogamente all'IL-18, l'IL-33 può avere un ruolo protettivo nello sviluppo dell'infiammazione dei tessuti adiposi durante l'obesità.

2.3.5 IL-6

Come discusso sopra, l'obesità vede la secrezione di citochine infiammatorie, tra cui l'IL-6, da parte dei macrofagi e/o adipociti. Data questa osservazione, insieme al fatto che i livelli di IL-6 circolante sono elevati nell'obesità e nelle malattie metaboliche, inizialmente si pensava che l'innalzamento delle concentrazioni plasmatiche o tissutali di IL-6 avessero un effetto negativo sul metabolismo. Questa conclusione non è priva di fondamento, dato che diversi studi, sia in vitro e in vivo, dimostrano che l'IL-6 è in grado di indurre insulino-resistenza. Tuttavia, se l'IL-6 abbia un effetto positivo o negativo è diventato oggetto di polemiche, specialmente dalla scoperta che l'IL-6 è prodotta e rilasciata dalle cellule muscolari scheletriche, in risposta a una contrazione concentrica muscolare e non dannosa e considerato che invece, nell'immediato periodo dopo l'esercizio fisico, si registra un'aumentata sensibilità all'insulina. Inoltre, IL-6 rilasciata dal muscolo scheletrico durante la contrazione è risultata essere coinvolta nei meccanismi di trasduzione del segnale del tessuto (tissue crosstalk) con il fegato, il tessuto adiposo e, più recentemente, con l'intestino, il pancreas e il cervello. Queste prime scoperte furono un punto di inizio per lo sviluppo di alcuni aspetti importanti, perché identificavano il muscolo scheletrico come un organo endocrino in grado di produrre "miochine".

Nonostante l'identificazione dell'IL-6 come un fattore secreto dal muscolo, il suo ruolo nell'omeostasi metabolica è stato in gran parte

definito da studi genetici sul topo. Inizialmente, un primo studio basato su topi carenti di IL-6, ha descritto un'insorgente obesità che è stata poi associata ad una diminuzione della tolleranza al glucosio. Uno studio più recente sostiene l'ipotesi che i topi carenti di IL-6 sviluppano obesità, intolleranza al glucosio e insulino resistenza ma inoltre, in risposta a una dieta ricca di grassi, sviluppano una maggiore resistenza all'insulina e aumentata infiammazione epatica. Questo studio era coerente con i dati di un altro, il quale affrontava l'effetto dell'IL-6 di bloccare la trasduzione del segnale specificamente negli epatociti, tramite l'interruzione del recettore IL-6 (IL-6Ra). Topi privi del recettore IL-6Ra sugli epatociti mostravano maggiore infiammazione sistemica, soprattutto a causa di una maggiore secrezione di citochine infiammatorie da parte delle cellule di Kupffer. Questa maggiore infiammazione, innescava una compromissione sistemica dell'azione dell'insulina, negli animali carenti del recettore specifico per IL6 a livello degli epatociti,.

Similmente all'IL-18, IL-6 attiva STAT3, che come discusso sopra può portare all'attivazione di AMPK. Infatti, l'effetto anti-obesità dell'IL-6 è probabilmente dovuto alla sua capacità di attivare AMPK, che porta a una protezione contro l'alta percentuale di grassi in un'alimentazione che induce obesità e insulino-resistenza. Tuttavia, va osservato che il meccanismo con cui IL-6 può prevenire la resistenza all'insulina obesità indotta non è esclusivamente via AMPK, infatti, è stato visto che topi transgenici con elevati valori di IL6 circolante, mostrano migliore azione della leptina centrale e migliore

omeostasi dei nutrienti, proteggendo dall'obesità.

Sebbene il ruolo dell'IL-6 rimanga controverso, nell'eziologia dell'insulino-resistenza, essa sembra che, a conti fatti, sia una citochina con generali effetti positivi sul metabolismo.

2.3.6 IL-10, IL-13, IL-15

L'IL-10 e l'IL-13 sono classicamente note come citochine anti-infiammatorie. La principale funzione di IL-10 sembra essere quello di limitare e infine terminare la risposta infiammatoria: può ridurre l'attività di citochine infiammatorie attraverso il rilascio dell'antagonista IL-1RA. IL-10 è anche un fattore di protezione contro l'insulino-resistenza indotta da una dieta ad alto contenuto di grassi, infatti, infusioni di IL-10 possono migliorare la sensibilità all'insulina. Recentemente, uno studio ha dimostrato che la sovraespressione di IL-10 nei topi nutriti con una dieta ad alta percentuale di grassi, previene l'aumento di peso, la tolleranza al glucosio e impedisce l'infiltrazione di macrofagi nel tessuto adiposo. Inoltre in questo studio, è stato interessante notare, che i topi privi di IL-10 nelle cellule immunitarie, mostravano invece un'aumentata espressione di IL-10 nel fegato e/o tessuto adiposo, suggerendo che questi tessuti facciano una upregulation di IL-10 per compensazione.

Analogamente all'IL-10, l'IL-13 è una citochina che media l'attivazione dei macrofagi, che sono ben noti per avere un ruolo nell'infiammazione dei tessuti adiposi e nell'omeostasi metabolica

alterata in risposta a un sovraccarico di nutrienti. Tuttavia, recenti evidenze, suggeriscono che l'IL-13 ha un ruolo diretto nel mantenimento dell'omeostasi del glucosio durante l'obesità. Come l'IL-10, l'IL-13 è espressa in quantità apprezzabili nel fegato e nel tessuto adiposo dei topi e uno studio apposito ha dimostrato che il mantenimento dell'omeostasi del glucosio e dell'insulina, è un'azione dipendente dall'IL-13. Infatti, è stato visto che i topi carenti di IL-13 e alimentati con una dieta ricca di grassi, sono diventati intolleranti al glucosio e insulino-resistenti. Così come IL-6 e IL-18, gli effetti metabolici positivi dell'IL-13 sembrano dipendere dall'attivazione di STAT3, dato che, la capacità dell'IL-13 per sopprimere l'espressione genica della gluconeogenesi nel fegato è STAT3 dipendente. Infine, l'IL-13 si aggiunge alla crescente lista di “miochine”, perché è sintetizzata e rilasciata dal muscolo scheletrico umano per aumentare l'assorbimento del glucosio del muscolo tramite la trasduzione dell'insulina. A sostegno di ciò, sono stati valutati i livelli di IL-13 nei pazienti affetti da T2DM che sono risultati inferiori rispetto a quelli registrati nei pazienti sani.

L'IL-15 è secreta dai monofagociti nucleari a seguito di un'infezione virale ma più che altro, è espressa nel muscolo scheletrico umano, dove ha effetti anabolici. Infatti, l'IL-15 sembra avere un ruolo nella riduzione della massa del tessuto adiposo. La somministrazione di IL-15 nei ratti o la sua sovraespressione nel muscolo, si traduce in una maggiore concentrazione circolante di IL-15 che riduceva l'adiposità. La spiegazione potrebbe risiedere nel fatto

che l'IL-15 riduce l'incorporazione di lipidi nel tessuto adiposo e aumenta l'ossidazione dei lipidi. Due recenti studi forniscono ulteriori prove dell'effetto positivo dell'IL-15. Topi alimentati con una dieta ad alto contenuto di grassi e trattati con IL-15, erano esposti a una perdita di peso e a un miglioramento dell'omeostasi del glucosio, rispetto ai topi non trattati con IL-15. Ancora più importante, l'IL-15 sembra essere selettivo più per il grasso viscerale piuttosto che per il grasso sottocutaneo: in uno studio separato, era stata iperespressa IL-15 nel muscolo scheletrico di topi ed è stato notato che la massa grassa del tronco, ma non sottocutanea, si riduceva a prescindere dalla dieta.

Example	Function	Response to obesity
Leptin	Regulates food intake and energy expenditure	↑
Adiponectin	Regulates glucose and lipid metabolism, insulin sensitivity, food intake	↓
Visfatin	Insulin-mimetic effects	↑
Resistin	Regulation of inflammation	↑
Adipsin	Enhance fat storage	↑
Tumor necrosis factor (TNF- α)	Pro-inflammatory inflammation, antagonism of insulin signaling	↑
Interlukin (IL)-1	Pro-inflammatory, early mediator of inflammation	↑
IL-4	Anti-inflammatory, inhibition of pro-inflammatory cytokines	↓
IL-6	Pro-inflammatory, regulates energy homeostasis and inflammation	↑
IL-10	Anti-inflammatory cytokine, host responses to systemic inflammation	↓
Vascular endothelial growth factor (VEGF)	Stimulates vasculogenesis, angiogenesis, and T-cell cytokine production	↑
Transforming growth factor (TGF- β)	Regulate of cell growth, cell proliferation, cell differentiation and apoptosis	↑
Plasminogen activator inhibitor-1 (PAI-1)	Inhibit endothelial plasminogen activator, elevated in inflammatory and obese states	↑
Serum amyloid A (SAA)	Family of acute-phase proteins, elevated with inflammation	↑
C-reactive protein (CRP)	Family of acute-phase proteins, increased during inflammatory condition	↑

↑ : increase, ↓ : decrease.

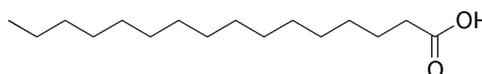
Fig. 2.2 – Funzioni delle adipochine.

2.4 Trigger dell'inflammatione

Per quanto riguarda il tessuto adiposo, non sono chiari i trigger esatti della cascata infiammatoria, tuttavia possiamo ipotizzare un certo numero di potenziali segnali di pericolo metabolico, i quali possono essere operativi nell'attivazione dell'inflammasoma e nel conseguente rilascio di citochine IL-1.

2.4.1 Acidi grassi

L'insulino-resistenza è strettamente associata con elevati livelli di acidi grassi liberi circolanti e si è tentato di attribuirgli un ruolo importante nel promuovere la risposta infiammatoria; infatti, studi in vitro hanno suggerito che gli acidi grassi saturi, legano e attivano membri della famiglia TLR. Uno degli acidi grassi saturi più comuni negli animali e nelle piante è l'acido esadecanoico o acido palmitico, poiché contenuto nell'olio di palma. Per esempio, il palmitato agisce come un ligando per il TLR4 e induce l'espressione dell'mRNA dell'IL-6 attraverso l'attivazione del fattore di trascrizione NF- κ B. Se le cellule umane THP-1 (linea cellulare derivata da pazienti affetti da leucemia) sono trattate con palmitato, l'espressione dell'mRNA di IL-1 β aumenta e gli acidi grassi saturi possono così fornire il primo segnale necessario per la produzione di IL-1 β .



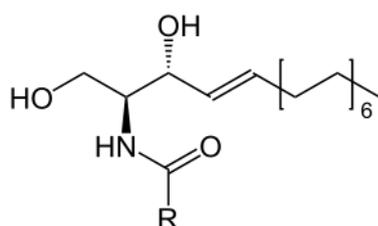
Acido esadecanoico o palmitico.

Non tutti gli studi sembrano, tuttavia, confermare un'attivazione

della cascata infiammatoria, da parte degli acidi grassi saturi, esclusivamente tramite stimolazione dei TLR. Recentemente è stato dimostrato che il palmitato è in grado di attivare direttamente l'inflammasoma NLRP3 nei macrofagi e quindi può fornire il secondo segnale necessario per il rilascio di IL-1 β .

2.4.2 Ceramidi

L'insulino-resistenza è associata con un accumulo ectopico di metaboliti lipidici. Dopo l'assorbimento nella cellula, gli acidi grassi vengono rapidamente esterificati dal coenzima A in grassi acil-CoA, che vengono successivamente accoppiati al glicerolo per formare mono-, di-, tri- acilgliceroli. In alternativa, i grassi acil-CoA possono essere esterificati con sfingosina a formare ceramidi. Gli intermedi dei lipidi, tra cui diacilglicerolo e ceramidi, possono funzionare come



Struttura delle ceramidi.

trasmettitori di segnali. Nei soggetti obesi i livelli di ceramidi sono aumentati in correlazione alla sensibilità all'insulina.

Le ceramidi derivano anche dal palmitato: l'esposizione delle cellule al palmitato induce accumulo intracellulare di ceramide, la quale è prodotta da una via biosintetica ubiquitaria, avviata dalla condensazione di palmitoil-coenzima A (CoA) e serina. Quindi possiamo affermare che, la prevenzione della sintesi ex novo di ceramide, evocata da palmitato, limita lo sviluppo dell'insulino-resistenza.

Recentemente, la ceramide è stata identificata come una potente attivatrice dell'inflammasoma nei macrofagi, e quindi anche il palmitato, alimentando la biosintesi di ceramide, può fornire un approvvigionamento continuo di segnali pericolosi per l'attivazione dell'inflammasoma NLRP3. L'attivazione dell'inflammasoma guidata da palmitato non è limitata ai macrofagi, poiché è stato recentemente dimostrato che anche cellule non mieloidi, come gli epatociti, possono essere un obiettivo.

Sebbene la maggior parte del lavoro sia stato eseguito prendendo in considerazione il palmitato, non tutti gli acidi grassi possono provocare l'attivazione dell'inflammasoma. Per esempio, acidi grassi altamente insaturi possono impedire l'attivazione dell'inflammasoma, e quindi esercitare effetto anti-infiammatori; questo perché non hanno la possibilità di attivare TLR4 o evocare la sintesi di ceramide e quindi impedire l'attivazione sia del primo o il secondo segnale di produzione per l'IL-1 β . È stato molto interessante notare che, né palmitato né ceramide, inducono l'attivazione dell'inflammasoma e successiva secrezione di IL-1 β , senza una precedente esposizione dei macrofagi a LPS. Tuttavia, è ancora da dimostrare che LPS possa veramente servire da primo segnale di infiammazione negli individui obesi, poiché aumentati livelli di LPS sono presente anche nei soggetti sani, a causa dell'apporto energetico della dieta.

2.4.3 Glucosio

L'iperglicemia cronica può portare sia a una diminuzione della

secrezione insulinica che a un aumento nella resistenza all'insulina, una condizione classicamente chiamata “tossicità al glucosio”. Alcuni studi hanno dimostrato che l'iperglicemia induce la produzione di IL-1 β in diversi tipi cellulari, tra cui cellule endoteliali, monociti, cellule β e di altre cellule delle isole pancreatiche. Nonostante l'esposizione a basse concentrazioni di IL-1 β , migliori la funzione delle cellule β , alti livelli di IL-1 β , interferiscono negativamente sulla segnalazione dell'insulina. Come descritto prima, l'IL-1 β è prodotta mediante scissione della pro-IL-1 β ad opera della caspasi-1 ma il meccanismo di rilascio di IL-1 β , indotto da iperglicemia, è stato per lungo tempo poco chiaro. Un gruppo di ricercatori ha recentemente individuato un ruolo importante per la proteina thioredoxing-interacting TXNIP, durante l'attivazione della caspasi-1 mediata dall'alta concentrazione di glucosio nelle cellule β murine. TXNIP è una proteina espressa in una grande varietà di tipi di cellule inclusi miociti scheletrici, cellule β pancreatiche, cellule endoteliali ma anche da adipociti e agisce come un inibitore endogeno delle specie reattive dell'ossigeno (ROS). Il gene espresso da TXNIP è stato legato alla resistenza all'insulina e al diabete, perché i pazienti diabetici esprimevano costantemente livelli superiori del gene TXNIP nel muscolo scheletrico. Al contrario, gli animali privi TXNIP visualizzavano un fenotipo ipoglicemico, ipoinsulinemico.

Studi recenti, hanno dimostrato che alti livelli di glucosio guidano l'attivazione di TXNIP e caspasi-1 per la produzione di IL-1 β . Infatti,

è stato visto che caspasi-1 e TXNIP risultavano attivati nel tessuto adiposo in animali trattati con 25 mM di glucosio. Viceversa, l'assenza di caspasi-1 e TXNIP migliorava significativamente la sensibilità all'insulina e portava a livelli plasmatici di glucosio inferiori. Nel topo knockdown di TXNIP si registrano ridotti livelli di mRNA dell'IL-1 β negli adipociti, questo implica che, in presenza di elevati livelli di glucosio, TXNIP regola i livelli di espressione genica dell'IL-1 β , ad esempio, regolando la disponibilità del promotore dell'IL-1 β . Inoltre, è stato dimostrato che il recettore PPAR γ regola negativamente l'espressione di TXNIP nel tessuto adiposo e quindi il trattamento del tessuto adiposo con l'agonista PPAR γ , rosiglitazone, ha portato a livelli di TXNIP ridotti in parallelo con un calo di IL-1 β . Teoricamente, l'inibizione della TXNIP può rappresentare un nuovo bersaglio terapeutico nel trattamento dell'insulino-resistenza, in particolare nella situazione di tossicità al glucosio.

2.4.4 Specie reattive dell'ossigeno

Oltre agli acidi grassi, ceramidi e alte concentrazioni di glucosio, altri nutrienti, intermedi biochimici e composti, tra cui l'acido urico e il polipeptide amiloide possono servire come potenziali segnali di pericolo metabolico e avviare la generazione di IL-1 β . È stato ipotizzato che, il denominatore comune di attivazione da parte di questi segnali metabolici, potrebbe essere l'induzione di ROS, le specie reattive dell'ossigeno, che sono i radicali liberi a maggior diffusione. I più importanti ROS sono l'anione superossido O $_2^-$, il

perossido d'idrogeno H_2O_2 e il radicale ossidrilico $\bullet OH$.

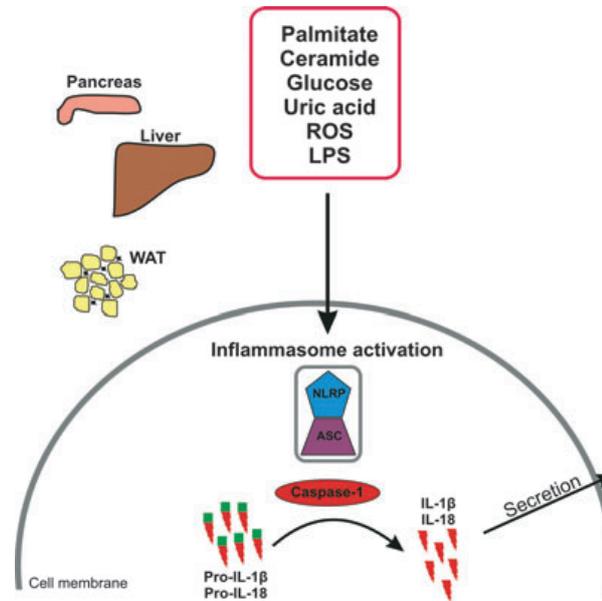


Fig. 2.3 – Rappresentazione schematica di attivazione dell'inflammasoma.

2.4.5 Ipertrofia degli adipociti, ipossia e morte cellulare

Considerato l'afflusso di macrofagi come un evento cruciale dell'infiammazione del tessuto adiposo, vari trigger possono contribuire. Abbiamo visto gli acidi grassi, palmitato e ceramidi, il glucosio e i ROS ma ci possono essere anche delle modifiche a livello cellulare che innescano l'infiammazione nel tessuto adiposo.

L'obesità porta a un aumento delle dimensioni degli adipociti e gli adipociti ipertrofici possono produrre, da soli, citochine e chemochine, causando il reclutamento di macrofagi. L'ipertrofia degli adipociti può anche essere responsabile di ipossia o addirittura morte degli adipociti. Sono state osservate aree di ipossia nel tessuto adiposo di espansione

nei topi obesi ed esseri umani, come risultato della vascolarizzazione e fornitura di ossigeno insufficienti. L'ipossia può indurre, ancora una volta, al reclutamento di macrofagi e all'espressione di citochine pro-infiammatorie, contribuendo alla disfunzione e infiammazione del tessuto adiposo. In assenza di approvvigionamento di sostanze nutritive, l'ipertrofia può inoltre provocare necrosi degli adipociti e rilascio del loro contenuto cellulare nello spazio extracellulare ed innescare una risposta infiammatoria. In particolare, alcuni degli adipociti moribondi o morti vengono circondati dai macrofagi per formare la "struttura a corona" osservata nel tessuto adiposo in espansione.

2.4.6 Stress del reticolo endoplasmatico

Un altro potenziale meccanismo di attivazione dell'NLRP3 nei macrofagi, coinvolge il reticolo endoplasmatico, un importante sito per la maturazione, il traffico e il folding delle proteine. Nell'obesità, l'assunzione cronica di nutrienti in eccesso, genera stress del reticolo endoplasmatico dovuto ad un aumento della domanda sintetica, portando all'attivazione delle vie di segnalazione pro-infiammatorie. Questo stress è stato riscontrato nel tessuto adiposo di individui obesi resistenti all'insulina e può essere una causa per lo sviluppo della resistenza all'insulina e dell'infiammazione.

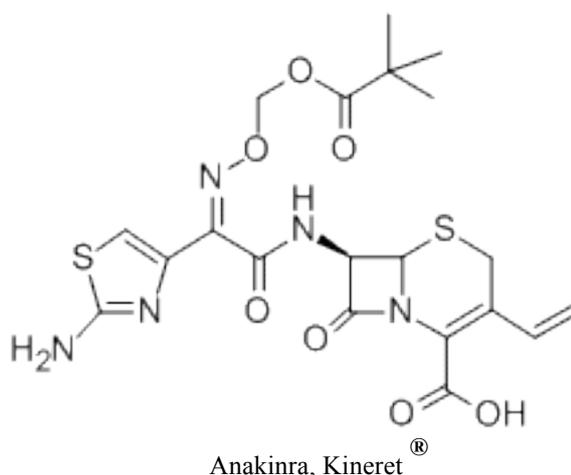
CAPITOLO 3 - STRATEGIE TERAPEUTICHE

3.1 Anti IL-1 β

Considerando il ruolo centrale dell'IL-1 β nella patogenesi del diabete di tipo 2, negli ultimi anni si è avanzata l'ipotesi di trattamenti in grado di bloccare gli effetti dell'IL-1 β . Se, sia il guasto delle cellule β pancreatiche che la resistenza all'insulina, sono indotte dall'IL-1 β , non è sorprendente che il blocco della sua attività abbia mostrato un miglioramento nel controllo del glucosio nelle popolazioni prediabetiche o T2DM. Gli effetti dell'IL-1 β possono essere bloccati in diversi modi.

3.1.1 Antagonisti recettoriali

Il metodo più usato è la somministrazione di anakinra, nome commerciale Kineret[®]. L'anakinra è una forma ricombinante, non glicosilata, dell'IL-1Ra, l'antagonista endogeno che si lega ai recettori IL-1 e inibisce gli effetti pro-infiammatori dell'IL-1. Somministrata per via sottocutanea, l'anakinra ha una biodisponibilità elevata (95%) e raggiunge livelli plasmatici massimi in 3-7 ore. Il farmaco è eliminato con le urine, sotto forma immodificata per meno del 10%



con un'emivita terminale di 4-6 ore. Oggi l'anakinra viene utilizzato nel trattamento dell'artrite reumatoide, una malattia autoimmune, caratterizzata da una infiammazione cronica sistemica e sinoviale, mediata dall'attivazione dei linfociti T e dal successivo rilascio di citochine pro-infiammatorie. Il trattamento con anakinra richiede un'iniezione subcutanea giornaliera e il trattamento sottocutaneo è associato a effetti collaterali locali, molto probabilmente a causa della soluzione di dissoluzione della proteina ricombinante.

L'idea che IL-1 β fosse rilevante sul piano umano pato-fisiologico, è stata fortemente sostenuta dalla scoperta che il blocco delle vie di segnalazione di IL-1, mediante trattamento con l'IL-1Ra Anakinra, ha migliorato il controllo glicemico in pazienti con diabete mellito tipo 2.

In uno studio, pazienti affetti da diabete di tipo 2 e mal controllato, sono stati randomizzati ad anakinra o a placebo; i pazienti del gruppo anakinra, dopo 13 settimane di terapia, hanno dato miglior controllo glicemico e della funzione delle cellule β . Così, il controllo del glucosio è migliorato probabilmente dal miglioramento della secrezione di insulina, coerente con l'ipotesi che l'iperglicemia cronica può avviare una risposta infiammatoria che coinvolge IL-1 β a livello delle isole pancreatiche che può, almeno in parte, essere invertita. Pertanto, la distruzione delle cellule β che producono insulina, potrebbe essere vista come un malattia autoimmune mediata da IL-1 β .

3.1.2 Anticorpi monoclonali

Recentemente si sono rese disponibili alternative per il blocco dell'IL-1 β , cioè anticorpi monoclonali anti IL-1 β che agiscono bloccandone l'attività biologica. Il vantaggio di questi anticorpi è la durata d'azione, sostanzialmente più lunga, che richiede intervalli di dosaggio meno frequenti, che vanno da 1 settimana a 3 mesi. Gli anticorpi attualmente disponibili sono XOMA-052, AMG-108, canakinumab (Ilaris[®]). Tuttavia, mentre IL-1Ra blocca entrambi gli effetti di IL-1 β e IL-1 α , gli anticorpi legano solo IL-1 β . Studi iniziali con anticorpi monoclonali anti IL-1 β , sembravano confermare i risultati positivi degli anticorpi, illustrando il raggiungimento dei livelli di glucosio in risposta alla terapia. Studi recenti, tuttavia, hanno riportato risultati meno favorevoli della terapia con anticorpi IL-1 β in pazienti con diabete di tipo 2.

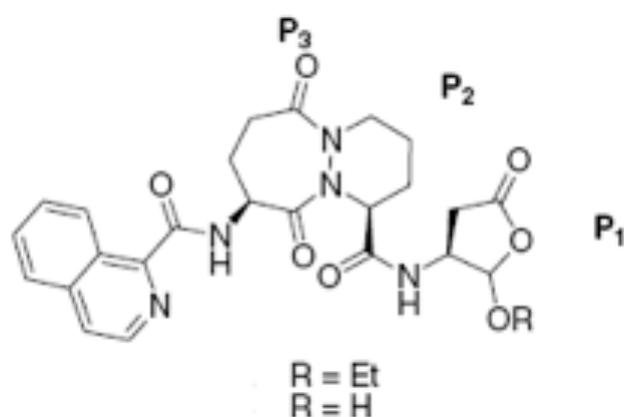
Per questo, sono necessari maggiori sforzi per identificare in ambito clinico, quei pazienti che possono beneficiare maggiormente del blocco dell'IL-1 β . Attualmente, lo studio outcome cardiovascolare CANTOS sta reclutando pazienti con livelli elevati di proteina C-reattiva, che saranno randomizzati al trattamento con canakinumab o corrispondenti placebo. Questo progetto è ancora in corso e i risultati non sono attesi prima del 2016.

A oggi, l'uso di Canakinumab è approvato dall'EMEA e dalla FDA nelle "sindromi periodiche associate alla criopirina", un gruppo

di malattie autoinfiammatorie rare, genetiche e potenzialmente letali accomunate dalle mutazioni a carico del gene NLRP3/CIAS1, che codifica per la proteina NLRP3, ovvero la criopirina.

3.1.3 Inibitori di caspasi-1

Oltre a bloccare gli effetti di IL-1 β , un approccio alternativo può essere quello di inibire la sua produzione. Teoricamente, questo tipo di blocco può essere realizzato mediante inibizione della caspasi-1, chiamata anche ICE (Interleukin-1 β converting enzyme). A tal scopo, sono stati sviluppati e testati come potenziali agenti



immunosoppressori, gli inibitori di caspasi-1, in particolare oggetto di studio è il Pralnacasan[®], pro-farmaco di un inibitore reversibile di ICE che consente a quest'ultimo di

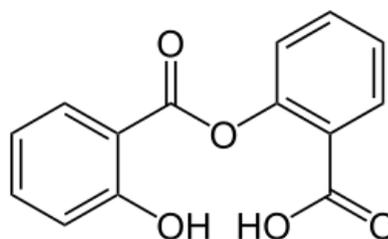
essere somministrato per via orale. In particolare, la molecola Pralnacasan[®] possiede un *core* peptidomimetico biciclico che costringe la regione P₂-P₃ a mantenere l'inibitore in una conformazione che favorisca il legame con l'enzima ICE, il quale avviene con la regione P₁. È stato dimostrato nei topi, che il trattamento di due settimane, diminuiva l'aumento di peso, migliorava la sensibilità all'insulina e diminuiva l'infiammazione a livello di adiposo. Questi risultati suggeriscono che l'inibizione di

caspasi-1 può essere utile nell'infiammazione associata all'obesità, tuttavia nessuno di questi farmaci è stato approvato per l'uso clinico. Attualmente, il Pralnacasan[®] ha raggiunto la fase III degli studi clinici e sono attesi futuri sviluppi.

3.2 Salicilato e salsalato

Salicilato di sodio e aspirina hanno dimostrato effetti benefici nel trattamento del diabete di tipo 2, migliorando il controllo glicemico attraverso l'inibizione dell'attività della via di trasduzione del segnale NF-κB. Il salsalato, profarmaco del salicilato, che a differenza dell'aspirina e sodio salicilato, non porta a rischio di sanguinamento

(ulcera), può migliorare la sensibilità all'insulina e il controllo del glucosio in prediabetici e diabetici di tipo 2 e con un buon profilo di sicurezza. Più in particolare, un ampio studio randomizzato, TINSAL-T2D, prove di



Salsalato. Nome IUPAC: acido 2-(2-idrossibenzoil)ossibenzoico.

trattamento dell'infiammazione nel diabete di tipo 2 con salsalato, ha concluso che il salsalato migliora il controllo del glucosio nei pazienti con T2DM, diminuzione della glicemia a digiuno e dei livelli di emoglobina glicata e migliora il profilo lipidico. Questi dati suggeriscono che le vie NF-κB possono rappresentare un bersaglio terapeutico per la prevenzione e il trattamento di diabete di tipo 2. Tuttavia, sono necessari studi per confermare se, continuando la somministrazione di questi farmaci, gli effetti siano sostenibili.

3.3 Anti TNF- α

TNF- α è stata la prima citochina pro-infiammatoria implicata nella patogenesi dell'insulino-resistenza e diabete di tipo 2 correlati all'obesità; tuttavia, l'antagonismo di TNF- α non ha dimostrato miglioramento significativo sulla sensibilità all'insulina in pazienti con sindrome metabolica o diabete di tipo 2. Il motivo del fallimento di questi studi è da identificare nel numero di pazienti e nella durata di tempo del trattamento, entrambi troppo esigui. A tal proposito, sono attesi studi più ampi e duraturi, soprattutto per le numerose relazioni che descrivono il ruolo di TNF- α nella resistenza all'insulina legata all'obesità: il trattamento con anticorpi TNF- α potrebbe invertire l'infiammazione e migliorare la sensibilità all'insulina. perché l'antagonismo di TNF- α nei pazienti non diabetici con poliartrite reumatoide, aveva migliorato la sensibilità all'insulina.

Alcuni studi hanno riportato positivi effetti, a seguito del trattamento con anticorpi neutralizzanti TNF- α ; in particolare in pazienti con artrite reumatoide, ma in generale in pazienti obesi, questi anticorpi avevano solo effetti marginali sui livelli di glucosio a digiuno e non erano efficaci per invertire l'insulino-resistenza associata all'obesità. La mancanza di efficacia dei trattamenti con target TNF- α nell'uomo potrebbe essere una conseguenza delle concentrazioni insufficienti di anticorpi neutralizzanti che raggiungono lo spazio interstiziale nel tessuto adiposo, dove i livelli di TNF- α sono particolarmente elevati.

CAPITOLO 4 – FATTORI ALIMENTARI

La dieta è un importante fattore di regolazione sulla risposta immunitaria. Ci sono considerevoli prove che suggeriscono che la malnutrizione porta a immunosoppressione dovuta a una suscettibilità alle infezioni. Modelli di dieta o alimentari giocano un ruolo critico nell'obesità e altre condizioni fisiopatologiche, quindi una dieta sana e alcuni nutrienti sono generalmente considerati benefici; tuttavia, alcuni alimenti sono ancora considerati controversi.

4.1 Carboidrati

I carboidrati sono la principale fonte di energia alimentare e può essere valutata in base all'indice glicemico (GI) e ai valori del carico glicemico (GL). GI è una classifica degli alimenti sulla base delle loro risposte glicemiche nel sangue e una misura della qualità dei carboidrati. GL è una misura che incorpora sia la quantità che la qualità dei carboidrati alimentari. Studi sezionali hanno mostrato un'associazione tra GI/GL e citochine infiammatorie. Nello studio “Women’s Health Study”, condotto su un campione di donne (> 45 anni di età), alti valori di GI e GL erano correlati con livelli ematici elevati di proteina C-reattiva (CRP). Analogamente, in uno studio olandese, con donne fra i 42-87 anni di età), livelli elevati di GI e GL erano positivamente associati con livelli ematici di CRP, i quali erano bassi. Inoltre, altri due studi, il “Nurse Health Study” su un campione di 902 individui fra 30-55 anni di età e il “Health Professionals’

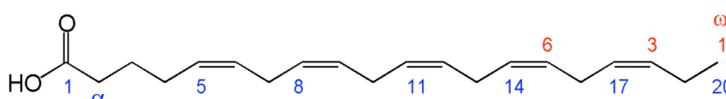
Follow-Up Study” su un campione di 532 individui fra 40 e 75 anni di età hanno mostrato che alti livelli GI o GL erano significativamente associato con bassi livelli plasmatici di adiponectina. Livelli ematici elevati di CRP e bassi livelli di adiponectina sono caratteristici di uno stato infiammatorio di basso grado correlato con l'obesità. A conferma, una restrizione energetica del 30% ha mostrato un calo delle concentrazioni sieriche di CRP in adulti sani in sovrappeso (n = 34, 24-42 anni di età).

4.2 Acidi grassi

Una dieta ricca di grassi provoca eccessivo accumulo di grasso corporeo e compromette il sistema immunitario, per questo sono stati studiati per gli effetti sullo stato infiammatorio, un gran numero di acidi grassi diversi, tra cui polinsaturi (PUFA), se sono presenti due o più doppi legami, acidi grassi insaturi con isomeria trans e acidi saturi, se non sono presenti doppi legami. Recentemente, è stato dimostrato che gli acidi grassi hanno un forte impatto sull'espressione genica e produzione di TNF- α e IL-6.

4.2.1 PUFAs (PolyUnsaturated Fatty Acids)

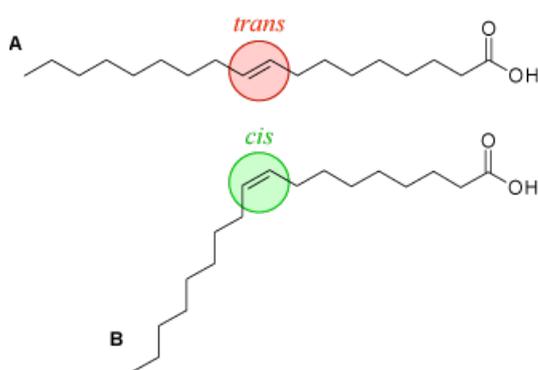
Fanno parte dei PUFA le famiglie degli acidi omega-6 e omega-3, precursori degli eicosanoidi che svolgono un ruolo importante nella



Acido eicosapentaenoico (EPA). Acido grasso n-3.

risposta immunitaria. In studi trasversali sono stati osservati gli effetti antiinfiammatori di n-3 PUFA (acido eicosapentaenoico [EPA] e acido docosaesaenoico [DHA]). In particolare, nello studio “Nurses’ Health Study I” condotto su 727 individui fra 43-69 anni di età e lo studio “Attica study” condotto su 3.042 fra 18-89 anni di età, hanno dimostrato che l'assunzione di acidi grassi n-3 o pesce quale fonte di omega-3, è inversamente associata con biomarcatori di infiammazione CRP, IL-6 e TNF- α . Uno studio interventzionale (n = 30, età media 60 anni) riporta anche che la supplementazione di olio di pesce (14 g/die di olio di pesce per 5 settimane) riduce i livelli ematici di CRP e IL-6 in donne sane in postmenopausa.

4.2.2 FA saturi e trans



Acidi grassi cis e trans.

Studi osservazionali e interventzionali suggeriscono che gli acidi grassi saturi (es. l'acido palmitico) o acidi grassi trans sono significativamente correlati alla risposta immunitaria.

Secondo lo studio “Nurses’ Health Study I cohort” su 730 pazienti fra 43-69 anni di età, un più alto valore di consumo di acidi grassi trans (contenuti nelle margarine) è stato associato con alti livelli di CRP e di IL-6. In uno studio randomizzato cross-over (n = 50), la sostituzione di acidi grassi trans (8%), in una dieta ricca di grassi (39% di grasso) ha aumentato

significativamente i livelli ematici di CRP e IL-6.

4.3 Frutta e verdura

Molti studi trasversali e osservazionali hanno riportato un'associazione inversa tra un elevato consumo di frutta e verdura, sia in combinazione o da soli, e livelli di CRP. Lo studio "Boston Puerto Rican Health Study" eseguito su un campione di 1.159 persone con età compresa fra 45-75 anni, ha mostrato che il consumo di frutta variabile era inversamente correlato con livelli ematici di CRP. Al contrario, un altro studio di Salas-Salvadò e colleghi condotto su 772 persone fra 55-80 anni di età e un altro di Freese e colleghi su 77 individui fra 19-52 anni di età, non ha mostrato alcuna associazione tra una dieta ricca di vegetali e frutta con i marcatori infiammatori (adiponectina, CRP, IL-6, molecola di adesione intercellulare come ICAM-1 e VCAM-1).

Se effettivamente l'assunzione di frutta e verdura possa influire positivamente sui livelli dei mediatori infiammatori, rimane ancora un aspetto controverso.

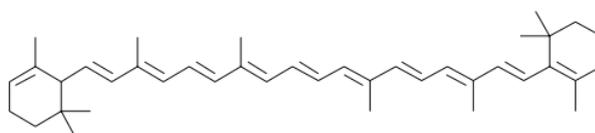
4.4 Vitamine

Alcune vitamine hanno dimostrato avere un effetto benefico sullo stress ossidativo e risposte immunitarie. Molteplici studi hanno dimostrato che le vitamine sono associate ai livelli di marker infiammatori (CRP, TNF- α e IL-6).

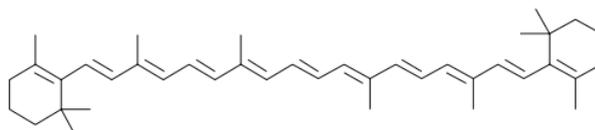
4.4.1 Vitamina A

La vitamina A in natura si trova in due forme principali: il retinolo (di origine animale in forma alcolica) e i carotenoidi (di origine vegetale) che sono provitamine, cioè precursori della vitamina A. I carotenoidi sono contenuti in numerosi vegetali di colore rosso o arancio ed esistono in due forme dette α e β , dove il β -carotene è la forma più diffusa in natura.

Nei soggetti in sovrappeso o obesi si registrano di frequente livelli plasmatici inferiori di carotenoidi circolanti poiché una grande porzione di carotenoidi, essendo solubili nei lipidi, vengono immagazzinati nel tessuto adiposo. Lo studio “Women’s Health Study” condotto su 2.895 donne di età maggiore o uguale ai 45 anni, ha registrato che a più alte concentrazioni di α e β -carotene corrispondono minori livelli di CRP nel plasma.



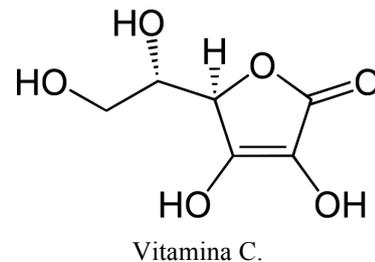
α -carotene



β -carotene

4.4.2 Vitamina C

L'acido L-ascorbico, vitamina C, è un composto organico presente in natura con proprietà antiossidanti, presente in alcuni alimenti, soprattutto nei vegetali a foglia verde, peperoni, pomodori, kiwi e negli agrumi. Comunemente, è noto che la vitamina C ha effetti benefici sull'immunità. Lo studio condotto da Aasheim e colleghi su un campione di soggetti obesi (62 uomini e 106 donne, 19-59 anni di età) ha mostrato che livelli plasmatici bassi di vitamina C erano associati con elevati livelli di CRP. Incrementando la vitamina C nei fumatori (515 mg / die per 8 settimane), i livelli ematici di CRP si sono ridotti significativamente.

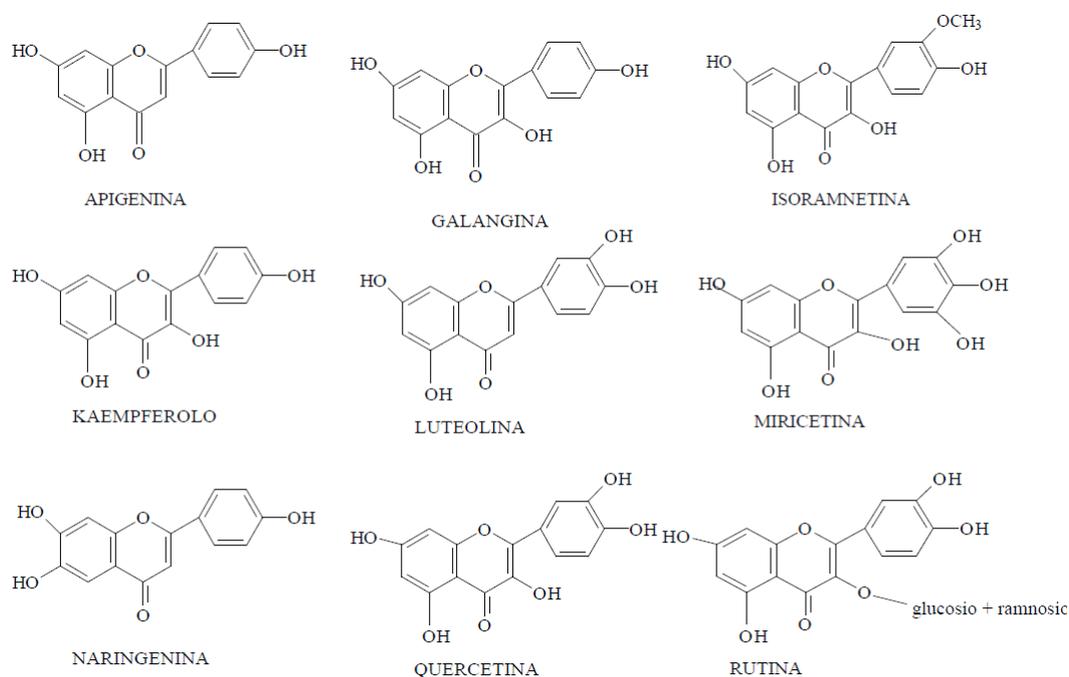


Tuttavia, non sembrano esserci delle certezze assolute, infatti in un altro studio condotto da Fumeron e colleghi su 42 persone fra 18 e 80 anni di età) ha riferito che la supplementazione di vitamin C (750 mg/die per 8 settimane) non ha cambiato livelli ematici di CRP.

4.5 Flavonoidi

I flavonoidi sono dei composti polifenolici biologici presenti nei vegetali, frutti, erbe, cioccolato, tè e vino rosso. Sono principalmente idrosolubili, sono di solito presenti nella pianta come glicosidi e nella stessa pianta un aglicone può esistere in combinazione con diversi

zuccheri. Si conoscono attualmente più di 4000 glicosidi dei flavonoidi e più di 1800 agliconi appartenenti a questa classe. Il termine è completamente interscambiabile con bioflavonoidi, nome con il quale sono comunemente conosciuti questi nutrienti.



Flavonoidi più noti.

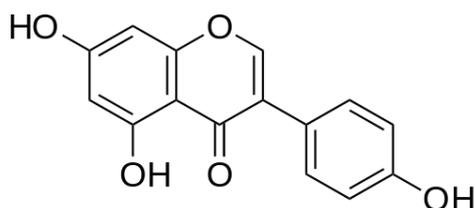
Molti studi epidemiologici hanno mostrato le chiare proprietà antiossidanti dei flavonoidi; tuttavia i loro effetti infiammatori e immunoregolatori sono meno chiari. Lo studio “Nurses’ Health Study” su 2.115 individui fra 43-70 anni di età, hanno dimostrato che una dieta ricca in flavonoidi è stata associata con basse concentrazioni di biomarcatori pro-infiammatori (IL-18 e VCAM-1). Recentemente, il Dipartimento dell’Agricoltura degli Stati Uniti ha eseguito uno studio su 8335 individui con età ≥ 19 anni e ha riportato che un

consumo elevato di flavonoidi nella dieta era inversamente associato con la concentrazione plasmatica di CRP. Uno studio parallelo su 120 persone con età fra 40-74 anni, ha mostrato che la supplementazione con succo di mirtillo (300 ml/die per 3 settimane) ha ridotto i livelli nel plasma di citochine pro-infiammatorie (TNF- α , IL-6, e IL-8), senza variazioni dei livelli di CRP. L'effetto dei flavonoidi sui livelli di CRP rimane ancora da chiarire, poiché gli studi hanno dato risultati contrastanti.

4.6 Fitoestrogeni

I fitoestrogeni sono composti di origine vegetale ad attività similestrogenica, che si rintracciano in una grande varietà di alimenti, fagioli, semi, e grani. La principale classe dei fitoestrogeni è quella degli isoflavoni, riconosciuti per avere proprietà anti-infiammatorie. In uno studio si è visto che una dieta di pasta naturalmente arricchita con isoflavoni (33mg/die) ha ridotto significativamente le concentrazioni di CRP nel plasma. I livelli plasmatici di CRP sono ritornati alla concentrazione iniziale, quando i soggetti sono tornati alla dieta abituale (n = 62, età media di 58,2 anni).

Nel frattempo, altri tre studi condotti su donne sane e obese in postmenopausa, hanno dimostrato, invece, che la supplementazione di isoflavoni di soia (Genisteina a 54 o 40 mg/die) per 6 mesi non ha avuto



Genisteina.

effetti sulle concentrazioni di CRP (donne sane Genisteina 54mg n= 30, 50-60 anni di età, donne sane Genisteina 40mg n= 80, età media di 49,5 anni, donne obese n = 50, età media di 58 anni media).

Ci sono alcune evidenze degli effetti benefici sulla supplementazione dei fitoestrogeni sui marker infiammatori; tuttavia, i risultati sono incoerenti.

4.7 Probiotici

I probiotici sono microrganismi viventi che hanno un effetto benefico per la salute per il loro ospite. Per via orale i batteri probiotici sono in grado di modulare la risposta immunitaria; tuttavia, esistono differenze negli effetti immuno-modulatori di diversi ceppi di probiotici. In uno studio, la combinazione di *Lactobacillus gasseri* e *Lactobacoryniformis Cillus* con *Staphylococcus thermophilus* per 2 o 4 settimane non ha avuto effetto sui livelli sierici di TNF- α o IL-12 nei soggetti sani (n = 30, 23-43 anni di età). Un altro studio ha confrontato il trattamento con *L. rhamnosus* e quello con *Bifidobacterium animalis ssp. lactis BB12* e *Propionibacterium ssp freudenreichii. Shermanii JS* per 3 settimane in soggetti sani (n = 81, 23-58 anni di età). Non c'era alcun effetto sui livelli sierici di TNF- α , IL-6, IL-10 o IFN- γ , ma una diminuzione dei livelli di CRP nel gruppo di supplementazione con *L.rhamnosus*. Anche se i probiotici hanno dimostrato di avere effetti benefici sui livelli dei marker infiammatori, sono necessari ulteriori studi per raggiungere risultati conclusivi.

4.8 Prebiotici

I prebiotici sono componenti alimentari non digeribili che hanno un beneficio sulla salute dell'ospite, perché utilizzati dalla flora batterica intestinale. Sono nella grande maggioranza carboidrati, in particolare oligosaccaridi, tra questi rivestono un ruolo importante i frutto-oligosaccaridi (FOS), presenti in diverse specie di vegetali.

La supplementazione con oligofruuttosio, un tipo di prebiotico, (8 g/die per 3 settimane) negli anziani (n = 19, età 85 anni media), ha diminuito l'espressione di mRNA dell'IL-6. Al contrario, la supplementazione di oligofruuttosio (1,95-3,9 g / d per 12 settimane) non ha avuto effetto sui livelli plasmatici di IL-6 e TNF- α in soggetti anziani (età media di 70 anni) poco nutriti. Pochi studi osservazionali hanno dimostrato una convincente associazione tra la supplementazione di prebiotico e riduzione dei markers infiammatori, per tanto, è prematuro fare questa associazione benefica.

CONCLUSIONI

Il concetto di diabete di tipo 2 come una malattia infiammatoria ha iniziato a prendere piede di recente e sembra essere confermato da molte evidenze. Una serie di studi hanno dimostrato che l'obesità addominale è associata ad un'inflammatione sistemica di basso grado portando a insulino-resistenza e disordini metabolici. Il tessuto adiposo sembra giocare un ruolo centrale nell'induzione dell'inflammatione, infatti l'eccesso di nutrizione provoca cambiamenti nella sua composizione cellulare e nella produzione di citochine e chemochine proinfiammatorie. Fra le citochine, la famiglia delle IL-1 ha un ruolo importante nel collegamento infiammatorio tra obesità e insulino-resistenza, poiché sono fattori pro- e anti-infiammatori. In particolare, la citochina IL-1 β è tradotta dalla pro-IL-1 β e successivamente attivata da caspasi-1, espressa negli adipociti. Anche altri membri della famiglia IL-1, in particolare IL-18, sono trasformati da caspasi-1 e sembrano rilevanti nell'inflammatione del tessuto adiposo. La caspasi-1, è strettamente regolata dall'inflammasoma, una piattaforma multiproteica dell'immunità innata, coinvolta nel rilevamento dei segnali di pericolo associati all'obesità; l'inflammasoma sembra essere un regolatore fondamentale nell'inflammatione del tessuto adiposo sia nei topi che nei soggetti umani obesi. Nel pancreas, l'attivazione dell'inflammasoma NLRP3 a causa di elevati livelli di glucosio e acidi grassi, e conseguente rilascio di IL-1 β , porta a una disfunzione delle cellule β e apoptosi, carenza di

insulina e progressione a diabete di tipo 2. Viene anche attivato l'inflammasoma NLRP3 nei macrofagi infiltranti il tessuto adiposo viscerale di pazienti obesi con disordini metabolici, e contribuisce alla locale infiammazione, difetto nell'adipogenesi e resistenza all'insulina.

Tutti questi meccanismi sono operativi nel tessuto adiposo umano e sono più pronunciati nel viscerale confrontato al tessuto sottocutaneo.

Un'infiammazione locale si osserva anche nel fegato e nel muscolo scheletrico ma il suo ruolo nei disturbi metabolici legati all'obesità deve ancora essere determinato.

È importante porre la nostra attenzione sul fatto che i marker infiammatori sistemici possono predire lo sviluppo di diabete di tipo 2 e malattie cardiovascolari nella popolazione in generale, e devono essere quindi utilizzati più ampiamente nella pratica clinica per individuare i soggetti a rischio.

Sebbene l'esatto meccanismo con cui l'IL-1 β induca resistenza all'insulina locale e sistemica, non sia ancora chiaro, la famiglia delle citochine IL-1, in particolare IL-1 β , rappresenta chiaramente un target terapeutico per invertire le conseguenze metaboliche dell'obesità, senza complicazioni gravi. Tuttavia, sembra che la maggior parte degli sforzi dovrebbe concentrarsi su un targeting selettivo dell'inflammasoma NLRP3, sia per il trattamento dell'insufficienza di cellule beta e nella resistenza all'insulina, dove le azioni deleterie di

ceramide e infiammazione prevalgono.

Ad oggi, gli studi eseguiti hanno dato risultati promettenti, anche se in parte includenti, circa il trattamento con IL-1Ra, ma ci sono ancora diversi dubbi. Per questo, si sono resi necessari ulteriori studi per stabilire l'intervento più efficace e vantaggioso, sia per un trattamento di prevenzione equilibrato, sia per una più adatta terapia.

BIBLIOGRAFIA

1. www.salute.gov.it
2. Robbins e Cotran. Le basi patologiche delle malattie. Patologia generale (2010) Elsevier
3. David L. Nelson, Michael M. Cox. I principi di biochimica di Lehninger (2014) Zanichelli
4. Shoelson, S.E. et al. (2006) Inflammation and insulin resistance. *J. Clin. Invest.* 116, 1793–1801
5. Hecht, A. and Goldner, M.G. (1959) Reappraisal of the hypoglycemic action of acetylsalicylate. *Metabolism* 8, 418–428
6. Reid, J. et al. (1957) Aspirin and diabetes mellitus. *Br. Med. J.* 2, 1071–1074
7. Hotamisligil, G.S. et al. (1993) Adipose expression of tumor necrosis factor- α : direct role in obesity-linked insulin resistance. *Science* 259, 87–91
8. Uysal, K.T. et al. (1997) Protection from obesity-induced insulin resistance in mice lacking TNF- α function. *Nature* 389, 610–614
9. Karin, M. et al. (2002) NF- κ B in cancer: from innocent bystander to major culprit. *Nat. Rev. Cancer* 2, 301–310
10. Yuan, M. et al. (2001) Reversal of obesity- and diet-induced insulin resistance with salicylates or targeted disruption of I κ B β . *Science* 293, 1673–1677
11. Cai, D. et al. (2005) Local and systemic insulin resistance resulting from hepatic activation of IKK- β and NF- κ B. *Nat. Med.* 11, 183–190
12. Karin, M. (1998) Mitogen-activated protein kinase cascades as regulators of stress responses. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 851, 139–146
13. Hirosumi, J. et al. (2002) A central role for JNK in obesity and insulin resistance. *Nature* 420, 333–336
14. Sabio, G. et al. (2008) A stress signaling pathway in adipose tissue regulates hepatic insulin resistance. *Science* 322, 1539–1543
15. Gao, Z. et al. (2002) Serine phosphorylation of insulin receptor substrate 1 by inhibitor κ B kinase complex. *J. Biol. Chem.* 277, 48115–48121
16. Brocker, C. et al. (2010) Evolutionary divergence and functions of the human interleukin (IL) gene family. *Hum. Genomics* 5, 30–55
17. Fève, B. and Bastard, J.P. (2009) The role of interleukins in insulin resistance and type 2 diabetes mellitus. *Nat. Rev. Endocrinol.* 5, 305–311
18. Dinarello, C.A. (2011) Interleukin-1 in the pathogenesis and treatment of inflammatory diseases. *Blood* 117, 3720–3732
19. March, C.J. et al. (1985) Cloning, sequence and expression of two distinct human interleukin-1 complementary DNAs. *Nature* 315, 641–647
20. Auron, P.E. et al. (1984) Nucleotide sequence of human monocyte interleukin 1 precursor cDNA. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 81, 7907–7911
21. Chaparro, R.J. et al. (2006) Nonobese diabetic mice express aspects of both type 1 and type 2 diabetes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 103, 12475–12480
22. Hyppönen, E. et al. (2000) Obesity, increased linear growth, and risk of type 1 diabetes in children. *Diabetes Care* 23, 1755–1760
23. Donath, M.Y. et al. (2008) Cytokines and beta-cell biology: from concept to clinical translation. *Endocr. Rev.* 29, 334–350
24. van Belle, T.L. et al. (2011) Type 1 diabetes: etiology, immunology, and therapeutic strategies. *Physiol. Rev.* 91, 79–118
25. Butler, A.E. et al. (2003) Beta-cell deficit and increased beta-cell apoptosis in humans with type 2 diabetes. *Diabetes* 52, 102–110
26. Mandrup-Poulsen, T. (1996) The role of interleukin-1 in the pathogenesis of IDDM. *Diabetologia* 39, 1005–1029
27. Maedler, K. et al. (2002) Glucose-induced beta cell production of IL-1 β contributes to glucotoxicity in human pancreatic islets. *J. Clin. Invest.* 110, 851–860
28. Larsen, C.M. et al. (2007) Interleukin-1-receptor antagonist in type 2 diabetes

- mellitus. *N. Engl. J. Med.* 356, 1517–1526
29. Ridker, P.M. et al. (2011) Interleukin-1beta inhibition and the prevention of recurrent cardiovascular events: rationale and design of the Canakinumab Anti-inflammatory Thrombosis Outcomes Study (CANTOS). *Am. Heart J.* 162, 597–605
 30. Schroder, K. and Tschopp, J. (2010) The inflammasomes. *Cell* 140, 821–832
 31. Masters, S.L. et al. (2010) Activation of the NLRP3 inflammasome by islet amyloid polypeptide provides a mechanism for enhanced IL-1beta in type 2 diabetes. *Nat. Immunol.* 11, 897–904
 32. Westwell-Roper, C. et al. (2011) IL-1 blockade attenuates islet amyloid polypeptide-induced proinflammatory cytokine release and pancreatic islet graft dysfunction. *J. Immunol.* 187, 2755–2765
 33. Coll, R.C. and O'Neill, L.A. (2011) The cytokine release inhibitory drug CRID3 targets ASC oligomerisation in the NLRP3 and AIM2 inflammasomes. *PLoS ONE* 6, e29539
 34. Wen, H. et al. (2012) A role for the NLRP3 inflammasome in metabolic diseases: did Warburg miss inflammation? *Nat. Immunol.* 13, 352–357
 35. Horng, T. and Hotamisligil, G.S. (2011) Linking the inflammasome to obesity-related disease. *Nat. Med.* 17, 164–165
 36. De Nardo, D. and Latz, E. (2011) NLRP3 inflammasomes link inflammation and metabolic disease. *Trends Immunol.* 32, 373–379
 37. Turner, N. et al. (2013) Distinct patterns of tissue-specific lipid accumulation during the induction of insulin resistance in mice by high-fat feeding. *Diabetologia* 56, 1638–1648
 38. Unger J, Parkin CG. Type 2 diabetes: an expanded view of pathophysiology and therapy. *Postgrad Med* 2010;122:145–157.
 39. Ferrannini E. The stunned beta cell: a brief history. *Cell Metab* 2010;11:349–352.
 40. Reaven GM. Insulin resistance: the link between obesity and cardiovascular disease. *Med Clin North Am* 2011;95:875–892.
 41. Osborn O, Olefsky JM. The cellular and signaling networks linking the immune system and metabolism in disease. *Nat Med* 2012;18: 363–374.
 42. Lumeng CN, Saltiel AR. Inflammatory links between obesity and metabolic disease. *J Clin Invest* 2011;121:2111–2117.
 43. Schenk S, Saberi M, Olefsky JM. Insulin sensitivity: modulation by nutrients and inflammation. *J Clin Invest* 2008;118:2992–3002.
 44. Gregor MF, Hotamisligil GS. Inflammatory mechanisms in obesity. *Annu Rev Immunol* 2011;29:415–445.
 45. Dinarello CA, Renfer L, Wolff SM. The production of antibody against human leukocytic pyrogen. *J Clin Invest* 1977;60:465–472.
 46. Dinarello CA. Immunological and inflammatory functions of the interleukin-1 family. *Annu Rev Immunol* 2009;27:519–550.
 47. Akdis M, et al. Interleukins, from 1 to 37, and interferon-c: receptors, functions, and roles in diseases. *J Allergy Clin Immunol* 2011;127:701–721.
 48. Dinarello C, et al. IL-1 family nomenclature. *Nat Immunol* 2010;11:973.
 49. Boraschi D, et al. IL-37: a new anti-inflammatory cytokine of the IL-1 family. *Eur Cytokine Netw* 2011;22:127–47.
 50. Hong J, et al. Identification of constitutively active interleukin 33 (IL-33) splice variant. *J Biol Chem* 2011;286:20078–20086.
 51. Jager J, Gre´meaux T, Cormont M, Le Marchand-Brustel Y, Tanti JF. Interleukin-1beta-induced insulin resistance in adipocytes through down-regulation of insulin receptor substrate-1 expression. *Endocrinology* 2007;148:241–251.
 52. Stienstra R, et al. The inflammasome-mediated caspase-1 activation controls adipocyte differentiation and insulin sensitivity. *Cell Metab* 2010;12:593–605.
 53. McGillicuddy FC, et al. Lack of interleukin-1 receptor I (IL-1RI) protects mice from high-fat diet-induced adipose tissue inflammation coincident with improved glucose homeostasis. *Diabetes* 2011;60:1688–1698.
 54. Koenen TB, et al. The inflammasome and caspase-1 activation: a new mechanism underlying increased inflammatory activity in human visceral adipose tissue. *Endocrinology* 2011;152:3769–3778.
 55. Spranger J, et al. Inflammatory cytokines and

- the risk to develop type 2 diabetes: results of the prospective population-based European Prospective Investigation into Cancer and Nutrition (EPIC)-Potsdam Study. *Diabetes* 2003;52:812–817.
56. Larsen CM, et al. Interleukin-1-receptor antagonist in type 2 diabetes mellitus. *N Engl J Med* 2007;356:1517–1526.
 57. Kono AC, Brining JC. Toll-like receptors: linking inflammation to metabolism. *Trends Endocrinol Metab* 2011;22:16–23.
 58. Gong YN, et al. Chemical probing reveals insights into the signaling mechanism of inflammasome activation. *Cell Res* 2010;20:1289–1305.
 59. Joosten LA, et al. Engagement of fatty acids with Toll-like receptor 2 drives interleukin-1 β production via the ASC/caspase 1 pathway in monosodium urate monohydrate crystal-induced gouty arthritis. *Arthritis Rheum* 2010;62: 3237–3248.
 60. Hornung V, et al. AIM2 recognizes cytosolic dsDNA and forms a caspase-1-activating inflammasome with ASC. *Nature* 2009;458: 514–518.
 61. Lamkanfi M, et al. Glyburide inhibits the Cryopyrin/Nalp3 inflammasome. *J Cell Biol* 2009;187:61–70.
 62. Netea MG, et al. Differential requirement for the activation of the inflammasome for processing and release of IL-1 β in monocytes and macrophages. *Blood* 2009;113:2324–2335.
 63. Joosten LA, et al. Inflammatory arthritis in caspase 1 gene-deficient mice: contribution of proteinase 3 to caspase 1-independent production of bioactive interleukin-1 β . *Arthritis Rheum* 2009;60:3651–3662.
 64. Krebs M, Roden M. Molecular mechanisms of lipid-induced insulin resistance in muscle, liver and vasculature. *Diabetes Obes Metab* 2005;7:621–632.
 65. Lee JY, Sohn KH, Rhee SH, Hwang D. Saturated fatty acids, but not unsaturated fatty acids, induce the expression of cyclooxygenase-2 mediated through Toll-like receptor 4. *J Biol Chem* 2001;276:16683–16689.
 66. Shi H, Kokoeva MV, Inouye K, Tzameli I, Yin H, Flier JS. TLR4 links innate immunity and fatty acid-induced insulin resistance. *J Clin Invest* 2006;116:3015–3025.
 67. Haaverson L, Danielsson KN, Fogelstrand L, Wiklund O. Induction of proinflammatory cytokines by long-chain saturated fatty acids in human macrophages. *Atherosclerosis* 2009;202:382–393. Erridge C, Samani NJ. Saturated fatty acids do not directly stimulate Toll-like receptor signaling. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2009;29: 1944–1949.
 68. Wen H, et al. Fatty acid-induced NLRP3-ASC inflammasome activation interferes with insulin signaling. *Nat Immunol* 2011;12:408–415.
 69. Samuel VT, Shulman GI. Mechanisms for insulin resistance: common threads and missing links. *Cell* 2012;148:852–871.
 70. Haus JM, et al. Plasma ceramides are elevated in obese subjects with type 2 diabetes and correlate with the severity of insulin resistance. *Diabetes* 2009;58:337–43.
 71. Chavez JA, et al. A role for ceramide, but not diacylglycerol, in the antagonism of insulin signal transduction by saturated fatty acids. *J Biol Chem* 2003;278:10297–10303.
 72. Vandanmagsar B, et al. The NLRP3 inflammasome instigates obesity-induced inflammation and insulin resistance. *Nat Med* 2011;17:179–188.
 73. Holland WL, et al. Lipid-induced insulin resistance mediated by the proinflammatory receptor TLR4 requires saturated fatty acid-induced ceramide biosynthesis in mice. *J Clin Invest* 2011;121:1858–1870.
 74. Cani PD, et al. Metabolic endotoxemia initiates obesity and insulin resistance. *Diabetes* 2007;56:1761–1772.
 75. Amar J, et al. Energy intake is associated with endotoxemia in apparently healthy men. *Am J Clin Nutr* 2008;87:1219–1223.
 76. Rossetti L, Giaccari A, DeFronzo RA. Glucose toxicity. *Diabetes Care* 1990;13:610–630.
 77. Asakawa H, Miyagawa J, Hanafusa T, Kuwajima M, Matsuzawa Y. High glucose and hyperosmolarity increase secretion of interleukin-1 β in cultured human aortic endothelial cells. *J Diabetes Complications* 1997;11:176–179.
 78. Maedler K, et al. Glucose-induced beta cell production of IL-1 β contributes to glucotoxicity in human pancreatic islets. *J Clin Invest* 2002;110:851–860.

79. Shanmugam N, Reddy MA, Guha M, Natarajan R. High glucose-induced expression of proinflammatory cytokine and chemokine genes in monocytic cells. *Diabetes* 2003;52:1256–1264.
80. Maedler K, et al. Glucose- and interleukin-1 β -induced β -cell apoptosis requires Ca²⁺ influx and extracellular signal-regulated kinase (ERK) 1/2 activation and is prevented by a sulfonylurea receptor 1/inwardly rectifying K⁺ channel 6.2 (SUR/Kir6.2) selective potassium channel opener in human islets. *Diabetes* 2004;53:1706–1713.
81. Franchi L, Eigenbrod T, Muñoz-Planillo R, Núñez G. The inflammasome: a caspase-1-activation platform that regulates immune responses and disease pathogenesis. *Nat Immunol* 2009;10:241–247.
82. Zhou R, Tardivel A, Thorens B, Choi I, Tschopp J. Thioredoxin-interacting protein links oxidative stress to inflammasome activation. *Nat Immunol* 2010;11:136–140.
83. Minn AH, Hafele C, Shalev A. Thioredoxin-interacting protein is stimulated by glucose through a carbohydrate response element and induces β -cell apoptosis. *Endocrinology* 2005;146:2397–2405.
84. Parikh H, Carlsson E, Chutkan WA, et al. TXNIP regulates peripheral glucose metabolism in humans. *PLoS Med* 2007;4:e158.
85. Stoltzman CA, Peterson CW, Breen KT, Muoio DM, Billin AN, Ayer DE. Glucose sensing by MondoA/Mlx complexes: a role for hexokinases and direct regulation of thioredoxin-interacting protein expression. *Proc Natl Acad Sci USA* 2008;105:6912–6917.
86. Chutkan WA, Patwari P, Yoshioka J, Lee RT. Thioredoxin-interacting protein (Txnip) is a critical regulator of hepatic glucose production. *J Biol Chem* 2008;283:2397–2406.
87. Koenen TB, et al. Hyperglycemia activates caspase-1 and TXNIP-mediated IL-1 β transcription in human adipose tissue. *Diabetes* 2011;60:517–524.
88. Hui ST, et al. Txnip balances metabolic and growth signaling via PTEN disulfide reduction. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2008;105:3921–3926.
89. Chutkan WA, et al. Deletion of the α -arrestin protein Txnip in mice promotes adiposity and adipogenesis while preserving insulin sensitivity. *Diabetes* 2010;59:1424–1434.
90. Lee YS, et al. Inflammation is necessary for long-term but not short-term high-fat diet-induced insulin resistance. *Diabetes* 2011;60:2474–2483.
91. Kanda H, et al. MCP-1 contributes to macrophage infiltration into adipose tissue, insulin resistance, and hepatic steatosis in obesity. *J Clin Invest* 2006;116:1494–1505.
92. Olefsky JM, Glass CK. Macrophages, inflammation, and insulin resistance. *Annu Rev Physiol* 2010;72:219–246.
93. Jiang C, et al. Disruption of hypoxia-inducible factor 1 in adipocytes improves insulin sensitivity and decreases adiposity in high-fat diet-fed mice. *Diabetes* 2011;60:2484–2495.
94. Kosteli A, et al. Weight loss and lipolysis promote a dynamic immune response in murine adipose tissue. *J Clin Invest* 2010;120:3466–3479.
95. Petrilli V, Dostert C, Muruve DA, Tschopp J. The inflammasome: a danger sensing complex triggering innate immunity. *Curr Opin Immunol* 2007;19:615–622.
96. Wilmanski JM, Petnicki-Ocwieja T, Kobayashi KS. NLR proteins: integral members of innate immunity and mediators of inflammatory diseases. *J Leukoc Biol* 2008;83:13–30.
97. Lamkanfi M, et al. Targeted peptidocentric proteomics reveals caspase-7 as a substrate of the caspase-1 inflammasomes. *Mol Cell Proteomics* 2008;7:2350–2363.
98. Ye Z, Ting JP. NLR, the nucleotide-binding domain leucine-rich repeat containing gene family. *Curr Opin Immunol* 2008;20:3–9.
99. Kanneganti TD, et al. Bacterial RNA and small antiviral compounds activate caspase-1 through cryopyrin/Nalp3. *Nature* 2006;440:233–236.
100. Sutterwala FS, et al. Critical role for NALP3/CIA1/Cryopyrin in innate and adaptive immunity through its regulation of caspase-1. *Immunity* 2006;24:317–327.
101. Mariathasan S, et al. Cryopyrin activates the inflammasome in response to toxins and ATP. *Nature* 2006;440:228–232.
102. Duewell P, et al. NLRP3 inflammasomes are required for atherogenesis and activated by cholesterol crystals. *Nature* 2010;464:1357–1361.
103. Martinon F, Petrilli V, Mayor A, Tardivel A,

- Tschopp J. Gout-associated uric acid crystals activate the NALP3 inflammasome. *Nature* 2006;440:237–241.
104. Menu P, Vince JE. The NLRP3 inflammasome in health and disease: the good, the bad and the ugly. *Clin Exp Immunol* 2011;166:1–15.
 105. Dunne A. Inflammasome activation: from inflammatory disease to infection. *Biochem Soc Trans* 2011;39:669–673.
 106. Schroder K, Zhou R, Tschopp J. The NLRP3 inflammasome: a sensor for metabolic danger? *Science* 2010;327:296–300.
 107. Stienstra R, et al. Inflammasome is a central player in the induction of obesity and insulin resistance. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2011;108:15324–15329.
 108. Mandrup-Poulsen T, Bendtzen K, Nerup J, Dinarello CA, Svenson M, Nielsen JH. Affinity-purified human interleukin 1 is cytotoxic to isolated islets of Langerhans. *Diabetologia* 1986;29:63–67.
 109. Bendtzen K, Mandrup-Poulsen T, Nerup J, Nielsen JH, Dinarello CA, Svenson M. Cytotoxicity of human interleukin-1 for pancreatic islets of Langerhans. *Science* 1986;232:1545–1547.
 110. Dinarello CA, Donath MY, Mandrup-Poulsen T. Role of IL-1beta in type 2 diabetes. *Curr Opin Endocrinol Diabetes Obes* 2010;17:314–321.
 111. Van Asseldonk EJ, Stienstra R, Koenen TB, Joosten LA, Netea MG, Tack CJ. Treatment with Anakinra improves disposition index but not insulin sensitivity in nondiabetic subjects with the metabolic syndrome: a randomized, double-blind, placebo-controlled study. *J Clin Endocrinol Metab* 2011;96:2119–2126.
 112. Donath M, Whitmore J, Bauer R, Scannon P, Weder C, et al. Xoma 052, an anti-IL-1b antibody, in a double-blind, placebo-controlled, dose-escalation study of the safety and pharmacokinetics in patients with type 2 diabetes mellitus, a new approach to therapy. *Diabetologia* 2008;51:433 (abstract).
 113. Sloan-Lancaster J, et al. Safety, tolerability and efficacy of subcutaneous (SC) LY2189102, a neutralising IL-1b antibody, in patients (Pts) with type 2 diabetes. *Diabetologia* 2011;54:S387 (abstract).
 114. Ridker PM, Thuren T, Zalewski A, Libby P. Interleukin-1b inhibition and the prevention of recurrent cardiovascular events: rationale and design of the Canakinumab Anti-inflammatory Thrombosis Outcomes Study (CANTOS). *Am Heart J* 2011;162:597–605.
 115. Randle JC, Harding MW, Ku G, Schoenharting M, Kurrle R. ICE/Caspase-1 inhibitors as novel anti-inflammatory drugs. *Expert Opin Investig Drugs* 2001;10:1207–1209.
 116. Stanley TL, et al. TNF- α antagonism with etanercept decreases glucose and increases the proportion of high molecular weight adiponectin in obese subjects with features of the metabolic syndrome. *J Clin Endocrinol Metab* 2011;96:E146–E150.
 117. Huvers FC, Popa C, Netea MG, van den Hoogen FH, Tack CJ. Improved insulin sensitivity by anti-TNF α antibody treatment in patients with rheumatic diseases. *Ann Rheum Dis* 2007;66:558–559.
 118. Gonzalez-Gay MA, Gonzalez-Juanatey C, Vazquez-Rodriguez TR, Miranda-Filloo JA, Llorca J. Insulin resistance in rheumatoid arthritis: the impact of the anti-TNF- α therapy. *Ann N Y Acad Sci* 2010;1193:153–159.
 119. Alberti KG, Eckel RH, Grundy SM, Zimmet PZ, Cleeman JI, Donato KA, et al. Harmonizing the metabolic syndrome: a joint interim statement of the International Diabetes Federation Task Force on Epidemiology and Prevention;
 120. National Heart, Lung, and Blood Institute; American Heart Association; World Heart Federation; International Atherosclerosis Society; and International Association for the Study of Obesity. *Circulation* 2009;120:1640–5.
 121. Donath MY, Shoelson SE. Type 2 diabetes as an inflammatory disease. *Nat Rev Immunol* 2011;11:98–107.
 122. Chawla A, Nguyen KD, Goh YP. Macrophage-mediated inflammation in metabolic disease. *Nat Rev Immunol* 2011;11:738–49.
 123. Ouchi N, Parker JL, Lugus JJ, Walsh K. Adipokines in inflammation and metabolic disease. *Nat Rev Immunol* 2011;11:85–97.
 124. Pickup JC, Mattock MB, Chusney GD, Burt D. NIDDM as a disease of the innate immune system: association of acute-phase reactants and interleukin-6 with metabolic syndrome X. *Diabetologia* 1997;40:1286–92.

125. Yudkin JS, Stehouwer CD, Emeis JJ, Coppack SW. C-reactive protein in healthy subjects: associations with obesity, insulin resistance, and endothelial dysfunction: a potential role for cytokines originating from adipose tissue. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1999;19:972–8.
126. Bastard JP, Jardel C, Bruckert E, Blondy P, Capeau J, Laville M, et al. Elevated levels of interleukin 6 are reduced in serum and subcutaneous adipose tissue of obese women after weight loss. *J Clin Endocrinol Metab* 2000;85:3338–42.
127. Haffner S, Temprosa M, Crandall J, Fowler S, Goldberg R, Horton E, et al. Intensive lifestyle intervention or metformin on inflammation and coagulation in participants with impaired glucose tolerance. *Diabetes* 2005;54:1566–72.
128. Bruun JM, Helge JW, Richelsen B, Stallknecht B. Diet and exercise reduce low-grade inflammation and macrophage infiltration in adipose tissue but not in skeletal muscle in severely obese subjects. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 2006;290:E961–7.
129. Belalcazar LM, Haffner SM, Lang W, Hoogveen RC, Rushing J, Schwenke DC, et al. Lifestyle intervention and/or statins for the reduction of C-reactive protein in type 2 diabetes: from the look AHEAD study. *Obesity* 2013;21:944–50.
130. Vozarova B, Weyer C, Lindsay RS, Pratley RE, Bogardus C, Tataranni PA. High white blood cell count is associated with a worsening of insulin sensitivity and predicts the development of type 2 diabetes. *Diabetes* 2002;51:455–61.
131. Natali A, Toschi E, Baldeweg S, Ciociaro D, Favilla S, Sacca L, et al. Clustering of insulin resistance with vascular dysfunction and low-grade inflammation in type 2 diabetes. *Diabetes* 2006;55:1133–40.
132. Phillips CM, Perry IJ. Does inflammation determine metabolic health status in obese and nonobese adults. *J Clin Endocrinol Metab* 2013;98:E1610–9.
133. Duncan BB, Schmidt MI, Pankow JS, Ballantyne CM, Couper D, Vigo A, et al. Low-grade systemic inflammation and the development of type 2 diabetes: the atherosclerosis risk in communities study. *Diabetes* 2003;52:1799–805.
134. Spranger J, Kroke A, Mohlig M, Hoffmann K, Bergmann MM, Ristow M, et al. Inflammatory cytokines and the risk to develop type 2 diabetes: results of the prospective population-based European Prospective Investigation into Cancer and Nutrition (EPIC)-Potsdam Study. *Diabetes* 2003;52:812–7.
135. Herder C, Baumert J, Thorand B, Koenig W, de Jager W, Meisinger C, et al. Chemokines as risk factors for type 2 diabetes: results from the MONICA/KORA Augsburg study, 1984–2002. *Diabetologia* 2006;49:921–9.
136. Festa A, D’Agostino Jr R, Tracy RP, Haffner SM, Insulin Resistance Atherosclerosis Study. Elevated levels of acute-phase proteins and plasminogen activator inhibitor-1 predict the development of type 2 diabetes: the insulin resistance atherosclerosis study. *Diabetes* 2002;51:1131–7.
137. Wang X, Bao W, Liu J, Ouyang YY, Wang D, Rong S, et al. Inflammatory markers and risk of type 2 diabetes: a systematic review and meta-analysis. *Diabetes Care* 2013;36:166–75.
138. Blake GJ, Ridker PM. Inflammatory biomarkers and cardiovascular risk prediction. *J Intern Med* 2002;252: 283–94.
139. Ridker PM, Buring JE, Cook NR, Rifai N. C-reactive protein, the metabolic syndrome, and risk of incident cardiovascular events: an 8-year follow-up of 14,719 initially healthy American women. *Circulation*
140. Jager A, van Hinsbergh VW, Kostense PJ, Emeis JJ, Yudkin JS, Nijpels G, et al. von Willebrand factor, C-reactive protein, and 5-year mortality in diabetic and nondiabetic subjects: the Hoorn Study. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1999;19:3071–8.
141. Saito I, Folsom AR, Brancati FL, Duncan BB, Chambless LE, McGovern PG. Nontraditional risk factors for coronary heart disease incidence among persons with diabetes: the Atherosclerosis Risk in Communities (ARIC) Study. *Ann Intern Med* 2000;133:81–91.
142. Best LG, Zhang Y, Lee ET, Yeh JL, Cowan L, Palmieri V, et al. C-reactive protein as a predictor of cardiovascular risk in a population with a high prevalence of diabetes: the Strong Heart Study. *Circulation* 2005;112:1289–95.
143. Soinio M, Marniemi J, Laakso M, Lehto S, Ronnema T. High-sensitivity C-reactive protein and coronary heart disease mortality in patients with type 2 diabetes: a 7-year follow-up study. *Diabetes Care* 2006;29:329–33.

144. Kengne AP, Batty GD, Hamer M, Stamatakis E, Czernichow S. Association of C-reactive protein with cardiovascular disease mortality according to diabetes status: pooled analyses of 25,979 participants from four UK prospective cohort studies. *Diabetes Care* 2012;35:396–403.
145. Lowe G, Woodward M, Hillis G, Rumley A, Li Q, Harrap S, et al. Circulating inflammatory markers and the risk of vascular complications and mortality in people with type 2 diabetes and cardiovascular disease or risk factors: the ADVANCE Study. *Diabetes* 2014;63:1115–23.
146. Canello R, Henegar C, Viguerie N, Taleb S, Poitou C, Rouault C, et al. Reduction of macrophage infiltration and chemoattractant gene expression changes in white adipose tissue of morbidly obese subjects after surgery-induced weight loss. *Diabetes* 2005;54:2277–86.
147. Weisberg SP, McCann D, Desai M, Rosenbaum M, Leibel RL, Ferrante Jr AW. Obesity is associated with macrophage accumulation in adipose tissue. *J Clin Invest* 2003;112:1796–808.
148. O'Rourke RW, White AE, Metcalf MD, Olivas AS, Mitra P, Larison WG, et al. Hypoxia-induced inflammatory cytokine secretion in human adipose tissue stromovascular cells. *Diabetologia* 2011;54:1480–90.
149. Skurk T, Alberti-Huber C, Herder C, Hauner H. Relationship between adipocyte size and adipokine expression and secretion. *J Clin Endocrinol Metab* 2007;92:1023–33.
150. Esser N, L'Homme L, De Roover A, Kohnen L, Scheen AJ, Moutschen M, et al. Obesity phenotype is related to NLRP3 inflammasome activity and immunological profile of visceral adipose tissue. *Diabetologia* 2013;56:2487–97.
151. Lumeng CN, Bodzin JL, Saltiel AR. Obesity induces a phenotypic switch in adipose tissue macrophage polarization. *J Clin Invest* 2007;117:175–84.
152. Fujisaka S, Usui I, Bukhari A, Ikutani M, Oya T, Kanatani Y, et al. Regulatory mechanisms for adipose tissue M1 and M2 macrophages in diet-induced obese mice. *Diabetes* 2009;58:2574–82.
153. Wentworth JM, Naselli G, Brown WA, Doyle L, Phipson B, Smyth GK, et al. Pro-inflammatory CD11c+CD206+ adipose tissue macrophages are associated with insulin resistance in human obesity. *Diabetes* 2010;59:1648–56.
154. Feuerer M, Herrero L, Ciolletta D, Naaz A, Wong J, Nayer A, et al. Lean, but not obese, fat is enriched for a unique population of regulatory T cells that affect metabolic parameters. *Nat Med* 2009;15:930–9.
155. Nishimura S, Manabe I, Nagasaki M, Eto K, Yamashita H, Ohsugi M, et al. CD8+ effector T cells contribute to macrophage recruitment and adipose tissue inflammation in obesity. *Nat Med* 2009;15:914–20.
156. Winer S, Chan Y, Paltser G, Truong D, Tsui H, Bahrami J, et al. Normalization of obesity-associated insulin resistance through immunotherapy. *Nat Med* 2009;15: 921–9.
157. Deiluiis J, Shah Z, Shah N, Needleman B, Mikami D, Narula V, et al. Visceral adipose inflammation in obesity is associated with critical alterations in regulatory cell numbers. *PLoS ONE* 2011;6:e16376.
158. Jagannathan-Bogdan M, McDonnell ME, Shin H, Rehman Q, Hasturk H, Apovian CM, et al. Elevated proinflammatory cytokine production by a skewed T cell compartment requires monocytes and promotes inflammation in type 2 diabetes. *J Immunol* 2011;186:1162–72.
159. Koster A, Stenholm S, Alley DE, Kim LJ, Simonsick EM, Kanaya AM, et al. Body fat distribution and inflammation among obese older adults with and without metabolic syndrome. *Obesity* 2010;18:2354–61.
160. Tchernof A, Despres JP. Pathophysiology of human visceral obesity: an update. *Physiol Rev* 2013;93:359–404.
161. Serfaty L, Lemoine M. Definition and natural history of metabolic steatosis: clinical aspects of NAFLD, NASH and cirrhosis. *Diabetes Metab* 2008;34:634–7.
162. Levitan EB, Cook NR, Stampfer MJ, Ridker PM, Rexrode KM, Buring JE, et al. Dietary glycemic index, dietary glycemic load, blood lipids, and C-reactive protein. *Metabolism* 2008;57:437–43.
163. Du H, van der A DL, van Bakel MM, van der Kallen CJ, Blaak EE, van Greevenbroek MM, et al. Glycemic index and glycemic load in relation to food and nutrient intake and metabolic risk factors in a Dutch population. *Am J Clin Nutr* 2008;87:655–61.
164. Qi L, Meigs JB, Liu S, Manson JE, Mantzoros C, Hu FB. Dietary fibers and glycemic load, obesity, and plasma adiponectin levels in women with type 2 diabetes. *Diabetes Care* 2006;29:1501–5.

165. Pischon T, Girman CJ, Rifai N, Hotamisligil GS, Rimm EB. Association between dietary factors and plasma adiponectin concentrations in men. *Am J Clin Nutr* 2005;81:780-6.
166. Pittas AG, Roberts SB, Das SK, Gilhooly CH, Saltzman E, Golden J, et al. The effects of the dietary glycemic load on type 2 diabetes risk factors during weight loss. *Obesity (Silver Spring)* 2006;14:2200-9.
167. Shikany JM, Phadke RP, Redden DT, Gower BA. Effects of low- and high-glycemic index/glycemic load diets on coronary heart disease risk factors in over-weight/obese men. *Metabolism* 2009;58:1793-801.
168. Vrolix R, Mensink RP. Effects of glycemic load on metabolic risk markers in subjects at increased risk of developing metabolic syndrome. *Am J Clin Nutr* 2010;92: 366-74.
169. Joffe YT, Collins M, Goedecke JH. The relationship between dietary fatty acids and inflammatory genes on the obese phenotype and serum lipids. *Nutrients* 2013;5:1672-705.
170. Lopez-Garcia E, Schulze MB, Manson JE, Meigs JB, Albert CM, Rifai N, et al. Consumption of (n-3) fatty acids is related to plasma biomarkers of inflammation and endothelial activation in women. *J Nutr* 2004;134:1806-11.
171. Zampelas A, Panagiotakos DB, Pitsavos C, Das UN, Chrysohoou C, Skoumas Y, et al. Fish consumption among healthy adults is associated with decreased levels of inflammatory markers related to cardiovascular disease: the ATTICA study. *J Am Coll Cardiol* 2005;46:120-4.
172. Ciubotaru I, Lee YS, Wander RC. Dietary fish oil decreases C-reactive protein, interleukin-6, and triacylglycerol to HDL-cholesterol ratio in postmenopausal women on HRT. *J Nutr Biochem* 2003;14: 513-21.
173. Lopez-Garcia E, Schulze MB, Meigs JB, Manson JE, Rifai N, Stampfer MJ, et al. Consumption of trans fatty acids is related to plasma biomarkers of inflammation and endothelial dysfunction. *J Nutr* 2005;135:562-6.
174. Baer DJ, Judd JT, Clevidence BA, Tracy RP. Dietary fatty acids affect plasma markers of inflammation in healthy men fed controlled diets: a randomized crossover study. *Am J Clin Nutr* 2004;79:969-73.
175. Lichtenstein AH, Erkkilä AT, Lamarche B, Schwab US, Jalbert SM, Ausman LM. Influence of hydrogenated fat and butter on CVD risk factors: remnant-like particles, glucose and insulin, blood pressure and C-reactive protein. *Atherosclerosis* 2003;171:97-107.
176. Bhupathiraju SN, Tucker KL. Greater variety in fruit and vegetable intake is associated with lower inflammation in Puerto Rican adults. *Am J Clin Nutr* 2011;93:37-46.
177. Salas-Salvadó J, Garcia-Arellano A, Estruch R, Marquez-Sandoval F, Corella D, Fiol M, et al. Components of the Mediterranean-type food pattern and serum inflammatory markers among patients at high risk for cardiovascular disease. *Eur J Clin Nutr* 2008;62: 651-9.
178. Freese R, Vaarala O, Turpeinen AM, Mutanen M. No difference in platelet activation or inflammation markers after diets rich or poor in vegetables, berries and apple in healthy subjects. *Eur J Nutr* 2004;43:175-82.
179. Morand C, Dubray C, Milenkovic D, Lioger D, Martin JF, Scalbert A, et al. Hesperidin contributes to the vascular protective effects of orange juice: a randomized crossover study in healthy volunteers. *Am J Clin Nutr* 2011;93:73-80.
180. Brady WE, Mares-Perlman JA, Bowen P, Stacewicz- Sapuntzakis M. Human serum carotenoid concentrations are related to physiologic and lifestyle factors. *J Nutr* 1996;126:129-37.
181. Wang L, Gaziano JM, Norkus EP, Buring JE, Sesso HD. Associations of plasma carotenoids with risk factors and biomarkers related to cardiovascular disease in middle-aged and older women. *Am J Clin Nutr* 2008;88:747-54.
182. Aasheim ET, Hofsø D, Hjelmessaeth J, Birkeland KI, Bøhmer T. Vitamin status in morbidly obese patients: a cross-sectional study. *Am J Clin Nutr* 2008;87:362-9.
183. Block G, Jensen C, Dietrich M, Norkus EP, Hudes M, Packer L. Plasma C-reactive protein concentrations in active and passive smokers: influence of antioxidant supplementation. *J Am Coll Nutr* 2004;23:141-7.
184. Fumeron C, Nguyen-Khoa T, Saltiel C, Kebede M, Buisson C, Drüeke TB, et al. Effects of oral vitamin C supplementation on oxidative stress and inflammation status in haemodialysis patients. *Nephrol Dial Transplant* 2005;20:1874-9.

185. Chacko SA, Song Y, Nathan L, Tinker L, de Boer IH, Tyllavsky F, et al. Relations of dietary magnesium intake to biomarkers of inflammation and endothelial dysfunction in an ethnically diverse cohort of postmenopausal women. *Diabetes Care* 2010;33:304-10.
186. Landberg R, Sun Q, Rimm EB, Cassidy A, Scalbert A, Mantzoros CS, et al. Selected dietary flavonoids are associated with markers of inflammation and endothelial dysfunction in U.S. women. *J Nutr* 2011;141:618-25.
187. Chun OK, Chung SJ, Claycombe KJ, Song WO. Serum C-reactive protein concentrations are inversely associated with dietary flavonoid intake in U.S. adults. *J Nutr* 2008;138:753-60.
188. Karlsen A, Retterstøl L, Laake P, Paur I, Bøhn SK, Sandvik L, et al. Anthocyanins inhibit nuclear factor-kappaB activation in monocytes and reduce plasma concentrations of pro-inflammatory mediators in healthy adults. *J Nutr* 2007;137:1951-4.
189. Karlsen A, Paur I, Bøhn SK, Sakhi AK, Borge GI, Serafini M, et al. Bilberry juice modulates plasma concentration of NF-kappaB related inflammatory markers in subjects at increased risk of CVD. *Eur J Nutr* 2010;49:345-55.
190. Suomela JP, Ahotupa M, Yang B, Vasankari T, Kallio H. Absorption of flavonols derived from sea buckthorn (*Hippophaë rhamnoides* L.) and their effect on emerging risk factors for cardiovascular disease in humans. *J Agric Food Chem* 2006;54:7364-9.
191. D'Anna R, Baviera G, Corrado F, Cancellieri F, Crisafulli A, Squadrito F. The effect of the phytoestrogen genistein and hormone replacement therapy on homocysteine and C-reactive protein level in postmenopausal women. *Acta Obstet Gynecol Scand* 2005;84:474-7.
192. Yildiz MF, Kumru S, Godekmerdan A, Kutlu S. Effects of raloxifene, hormone therapy, and soy isoflavone on serum high-sensitive C-reactive protein in postmenopausal women. *Int J Gynaecol Obstet* 2005;90: 128-33.
193. Clerici C, Setchell KD, Battezzati PM, Pirro M, Giuliano V, Ascitti S, et al. Pasta naturally enriched with isoflavone aglycons from soy germ reduces serum lipids and improves markers of cardiovascular risk. *J Nutr* 2007;137:2270-8.
194. Aubertin-Leheudre M, Lord C, Khalil A, Dionne IJ. Effect of 6 months of exercise and isoflavone supplementation on clinical cardiovascular risk factors in obese postmenopausal women: a randomized, double-blind study. *Menopause* 2007;14:624
195. Salminen S, Bouley C, Boutron-Ruault MC, Cummings JH, Franck A, Gibson GR, et al. Functional food science and gastrointestinal physiology and function. *Br J Nutr* 1998;80(Suppl 1):S147-71.
196. Nova E, Wärnberg J, Gómez-Martínez S, Díaz LE, Romeo J, Marcos A. Immunomodulatory effects of probiotics in different stages of life. *Br J Nutr* 2007; 98(Suppl 1):S90-5.
197. Olivares M, Díaz-Ropero MP, Gómez N, Lara-Villoslada F, Sierra S, Maldonado JA, et al. The consumption of two new probiotic strains, *Lactobacillus gasseri* CECT 5714 and *Lactobacillus coryniformis* CECT 5711, boosts the immune system of healthy humans. *Int Microbiol* 2006;9:47-52.
198. Olivares M, Paz Díaz-Ropero M, Gómez N, Sierra S, Lara-Villoslada F, Martín R, et al. Dietary deprivation of fermented foods causes a fall in innate immune response. Lactic acid bacteria can counteract the immunological effect of this deprivation. *J Dairy Res* 2006;73:492-8.
199. Kekkonen RA, Lummela N, Karjalainen H, Latvala S, Tynkkynen S, Jarvenpaa S, et al. Probiotic intervention has strain-specific anti-inflammatory effects in healthy adults. *World J Gastroenterol* 2008;14: 2029-36.
200. Pineiro M, Asp NG, Reid G, Macfarlane S, Morelli L, Brunser O, et al. FAO technical meeting on prebiotics. *J Clin Gastroenterol* 2008;42(Suppl 3 Pt 2):S156-9.
201. Guigoz Y, Rochat F, Perruisseau-Carrier G, Rochat I, Schiffrin EJ. Effects of oligosaccharide on the faecal flora and non-specific immune system in elderly people. *Nutr Res* 2002;22:13-25.
202. Schiffrin EJ, Thomas DR, Kumar VB, Brown C, Hager C, Van't Hof MA, et al. Systemic inflammatory markers in older persons: the effect of oral nutritional supplementation with prebiotics. *J Nutr Health Aging* 2007;11:475-9

RINGRAZIAMENTI

Ringrazio il prof. Antonio Lucacchini per la disponibilità e i preziosi consigli che ha saputo darmi durante l'attività di tesi.

Ringrazio il prof. Paolo Crotti per l'entusiasmo e la dedizione che l'hanno sempre contraddistinto, per me motivo di grande stima.

Ringrazio i miei genitori, Marco e Giovanna, i quali mi hanno insegnato a rialzarsi, quando ormai tutto sembra perduto.

Ringrazio i miei nonni, Vito ed Elia, che con me facevano il conto alla rovescia degli esami e sembrava non finissero mai.

Ringrazio i miei parenti, tutti, che hanno fatto sempre il tifo per me, anche da lassù.

Ringrazio il mio fidanzato Marco, per essere il punto fermo di cui ho bisogno.