

Tesi di Laurea: “Analisi genica del Wnt signaling e dell’infiammazione nel tessuto osseo, adiposo e muscolare di pazienti affetti da diabete mellito di tipo 2 candidati ad artroprotesi d’anca” (Sintesi)

Autore: M. Pileri

Relatore: R. Papalia

Correlatori: N. Napoli, G. Leanza

Introduzione

Il diabete mellito di tipo 2 (T2DM) è un disturbo metabolico caratterizzato da iperglicemia, dovuta a inefficienza biologica dell’ormone insulina e del suo recettore di legame (insulino-resistenza) che comporta nel tempo e con la progressione della malattia, una graduale disfunzione delle β -cellule pancreatiche¹⁻³. È di gran lunga la forma più frequente di diabete, rappresentando il 90% circa di tutti i casi⁴. La sua prevalenza mondiale è aumentata drammaticamente negli ultimi decenni, passando da 30 milioni di casi nel 1985 a 425 milioni nel 2018⁵.

Tra le complicanze del diabete, specie nei soggetti anziani, spicca la fragilità ossea e le conseguenti fratture, tipicamente a livello dell’anca⁶, ma possibili anche del polso, del piede o vertebrali^{7, 8}. Alcuni studi recenti hanno anche evidenziato la presenza nei soggetti diabetici di uno stato di infiammazione cronica del tessuto adiposo e muscolare⁹.

I meccanismi fisiopatologici coinvolti sono spiegati solo in parte dalla lipotossicità e dalla glucotossicità, determinate rispettivamente dall’aumento degli acidi grassi liberi circolanti e dall’iperglicemia. La presenza di uno stato infiammatorio sistemico

persistente, di un aumento dello stress ossidativo, di un accumulo di *Advanced Glycation end Products* (AGEs), oltre che di un danno ipossico, si ipotizza alterino le proprietà del collagene e le proprietà dei tessuti osseo, adiposo e muscolare¹⁰.

Uno dei principali meccanismi molecolari coinvolti nel metabolismo osseo, adiposo e muscolare, oltre che nella regolazione del differenziamento delle cellule staminali mesenchimali, è il Wnt signaling¹¹.

In modelli murini con T2DM l’espressione di sclerostina (codificata dal gene SOST) e del gene DKK-1, due dei principali inibitori del Wnt signaling, sono aumentati. Anche in vivo, i pazienti con T2DM presentano un aumento dei livelli sierici di sclerostina. Uno studio condotto dal laboratorio di Endocrinologia e Diabetologia dell’Università Campus Bio-Medico (Piccoli et al. 2020) ha evidenziato livelli elevati di AGEs nell’osso e un’espressione genica di SOST aumentata nei pazienti affetti da T2DM, oltre che una ridotta espressione di RUNX-2 (fattore di trascrizione essenziale per la differenziazione delle cellule osteoformatrici)¹². La letteratura recente (Nie et al. 2021) sottolinea come numerosi ligandi del Wnt signaling (Wnt5a, Wnt10b) giochino un ruolo cruciale nello sviluppo del T2DM e delle sue

complicanze, spesse volte agendo in sinergia con adipochine, miochine e citochine infiammatorie (IL-6, IL-8, IL-10, TNF α)¹³.

Lo studio: ipotesi ed obiettivi

L'ipotesi alla base dello studio, basata sulle evidenze suddette, è che l'inibizione del Wnt signaling sia coinvolta nell'aumento della fragilità ossea, della sarcopenia e dello stato infiammatorio cronico tipico del paziente con T2DM.

Gli obiettivi specifici dello studio sono:

- indagare la BMD (Bone Mineral Density) e la microstruttura ossea in pazienti diabetici rispetto a una popolazione di controllo (pazienti non diabetici);
- indagare le alterazioni del collagene di tipo 1 AGEs indotte attraverso l'espressione di Col1A1;
- indagare il Wnt signaling e l'infiammazione nei pazienti diabetici rispetto ai controlli tramite l'analisi genica tessuto-specifica rispettivamente di:
 - Tessuto osseo: Wnt5a, Wnt10b, ADIPOQ, SOST, Lef-1, Dkk-1, Col1A1, IL-6, IL-8, IL-10, TNF α ;
 - Tessuto adiposo: Wnt5a, Wnt10b, ADIPOQ, IL-6, IL-8, IL-10, TNF α ;
 - Tessuto muscolare: Wnt5a, Wnt10b, ADIPOQ, IL-6, IL-8, IL-10, TNF α .

Lo studio: materiali e metodi

Abbiamo condotto questo studio clinico traslazionale multicentrico presso il Policlinico Universitario Campus Bio-Medico di Roma e presso il laboratorio di Diabetologia ed Endocrinologia del Polo di Ricerca Avanzata in Biomedicina e Bioingegneria (PRABB) dell'Università Campus Bio-Medico, in collaborazione con il dipartimento di *Bone and Mineral Diseases* della *Washington University in St. Louis, MO, USA*.

Sono state arruolate, in base ai criteri di inclusione ed esclusione, un totale di 92 donne (19 soggetti con T2DM e 73 controlli non diabetici) in condizioni di post-menopausa e destinate ad un intervento di chirurgia sostitutiva protesica d'anca.

Dai referti clinici sono stati analizzati i parametri antropometrici (peso, altezza, BMI), i parametri relativi al controllo glicemico (HbA1c, glicemia a digiuno), i parametri cardio-metabolici (calcio, creatinina, azotemia), gli anni e la durata di malattia espressa in anni. Lo stato ponderale è stato ricavato calcolando il *Body Mass Index* (BMI). I partecipanti sono stati sottoposti i giorni precedenti all'intervento a un esame DXA, mentre il mattino prima a un prelievo ematico. L'intervento chirurgico protesico d'anca è stato effettuato presso le sale chirurgiche del Policlinico Universitario Campus Bio-Medico, utilizzando protesi totali d'anca, mediante un accesso postero-laterale. Completata l'operazione chirurgica i campioni di tessuto osseo, tessuto adiposo e tessuto muscolare, assieme a quelli ematici precedentemente prelevati, sono stati raccolti a fresco e conservati senza alcun tipo di fissante a 4 °C fino alla lavorazione da parte del team di studio. Per effettuare l'analisi dell'espressione genica i campioni sono stati lavorati in maniera differente dipendentemente dal tipo di tessuto, per poi essere sottoposti a protocolli di estrazione dell'RNA (tramite metodologia TRIzol[®]), quantificazione dell'RNA tramite TECAN[®], retrotrascrizione e Real Time PCR con metodologia TaqMan[®]. Una seconda biopsia ossea eseguita sui nuclei di osso trabecolare ottenuti dalla testa femorale (8 mm di diametro e 8-10 mm di lunghezza) ha consentito di effettuare la tomografia micro-computerizzata (micro-CT 40; SCANCO Medical[®]) per valutare: densità minerale tissutale (TMD), densità minerale ossea volumetrica (BMD) e parametri standard dell'architettura trabecolare.

Risultati

Per quanto concerne le caratteristiche demografiche e cliniche dello studio (Tab. 1), come prevedibile, i soggetti affetti da T2DM hanno mostrato valori di glicemia a digiuno (*fasting plasma glucose*) più elevati rispetto ai controlli (diabetici 100.7 ± 11.21 mg/dL, p-value=0.002). I valori di calcemia (non diabetici 9.2 ± 0.4 mg/dL vs diabetici 9.3 ± 0.5 mg/dL), creatinemia (non diabetici 0.76 ± 0.16 mg/dL vs diabetici 0.83 ± 0.25 mg/dL) e azotemia (non diabetici 41.5 ± 11.5 mg/dL vs diabetici 48 ± 15.6 mg/dL) hanno mostrato in entrambi i gruppi valori simili tra loro e nel range di normalità. Di seguito le altre caratteristiche demografiche e cliniche dei soggetti arruolati: età anagrafica della popolazione (non diabetici 73.2 ± 5.8 anni vs diabetici 75.2 ± 8.5 anni); durata della malattia (diabetici 14.6 ± 9.8 anni); BMI (non diabetici 27.7 ± 5.6 kg/m² vs diabetici 29.9 ± 5.4 g/m²); HbA1c (diabetici 6.5 ± 1.7 %).

I risultati della DXA (Tab. 2, sinistra) non hanno mostrato differenze strutturali statisticamente significative nell'osso di pazienti diabetici rispetto ai controlli: BMD Lumbar L1+L4 (non diabetici 0.92 ± 0.17

g/cm² vs diabetici 0.95 g/cm² ± 0.12 , p-value=0.43); Lumbar T-score (non diabetici -1.15 ± 1.43 SD vs diabetici -0.83 ± 1.14 SD, p-value=0.44); BMD Femoral total (non diabetici 0.79 ± 0.11 g/cm² vs diabetici 0.82 ± 0.09 g/cm², p-value=0.39); BMD Femoral neck (non diabetici 0.68 ± 0.12 g/cm² vs diabetici 0.66 ± 0.11 g/cm², p-value=0.62); Femoral T-score (non diabetici -1.36 ± 0.87 SD vs diabetici -0.89 ± 0.75 SD, p-value=0.27). I valori di T-score vertebrale e femorale hanno mostrato osteopenia nel 50% dei soggetti diabetici contro il 32.1% dei non diabetici.

I risultati della micro-CT (Tab. 2, destra) non hanno mostrato alcuna differenza significativa tra pazienti diabetici e controlli: BV/TV (non diabetici 0.26 ± 0.10 vs diabetici 0.24 ± 0.14 , p-value=0.54); Trabecular number (non diabetici 1.59 ± 0.37 1/mm vs diabetici 1.48 ± 0.5 1/mm, p-value=0.49); Trabecular thickness (non diabetici 0.2 ± 0.08 mm vs diabetici 0.2 ± 0.005 mm, p-value=0.98); Trabecular separation (non diabetici 0.61 ± 0.15 mm vs diabetici 0.71 ± 0.2 mm, p-value=0.14); Volumetric BMD (non diabetici 243.0 ± 74.0 mgHA/cm³ vs diabetici 220.4 ± 100.2 mgHA/cm³, p-value=0.48).

	Non-diabetic Subjects (n=73)	T2DM subjects (n=14)	P value
AGE (years)	73.2 (5.8)	75.2 (8.5)	NS
Menopausal age (years)	49.3 (5.2)	48.9 (5.9)	NS
Disease duration (years)	-	14.6 (9.8)	-
BMI (kg/m ²)	27.7 (5.6)	29.9 (5.4)	NS
Fasting plasma glucose (mg/dL)	100.7 (11.21)	120.1 (21.5)	0.002
HbA1c (%)	-	6.5 (1.7)	-
Serum calcium (mg/dL)	9.2 (0.4)	9.3 (0.5)	NS
Creatinine (mg/dL)	0.76 (0.16)	0.83 (0.23)	NS
Serum blood urea nitrogen (mg/dL)	41.5 (11.5)	48 (15.6)	NS

Tab. 1. Caratteristiche demografiche e cliniche dei soggetti dello studio. I dati sono riportati con: media (DS).

	Non-diabetic subjects (n=73)	T2DM subjects (n=14)	P Value
Dual-energy X-ray absorptiometry (DXA)			
BMD Lumbar L1 + L4 (g/cm²)	0.92 (0.17)	0.95 (0.12)	0.43
BMD Femoral total (g/cm²)	0.79 (0.11)	0.82 (0.09)	0.39
BMD Femoral neck (g/cm²)	0.68 (0.12)	0.66 (0.11)	0.62
Lumbar T-score	-1.15 (1.43)	-0.83 (1.14)	0.44
Femoral T-score	-1.36 (0.87)	-0.98 (0.75)	0.27
Microcomputed Tomography (micro-CT)			
BV/TV	0.26 (0.10)	0.24	0.54
Connectivity (1/mm³)	6.75 (2.41)	6.99 (4.25)	0.89
Trabecular number (1/mm)	1.59 (0.37)	1.48 (0.5)	0.49
Trabecular thickness (mm)	0.2 (0.08)	-0.2 (0.05)	0.98
Trabecular separation (mm)	0.61 (0.15)	0.71 (0.2)	0.14
Volumetric BMD (mgHA/cm³)	243.0 (74.8)	220.4 (100.2)	0.48
Tissue mineral density (mgHA/cm³)	685.5 (29.51)	689.36 (32.8)	0.65

Tab. 2. Dati della DXA, BMD e T-score (sinistra) e dati della micro-CT (destra). I dati sono riportati con: media (DS).

L'analisi dell'espressione genica ossea (Fig. 1) suggerisce una significativa ridotta espressione di Lef-1 nei diabetici rispetto ai non diabetici, in linea con l'ipotesi di un'inibizione del *pathway* canonico di Wnt alla base della fragilità ossea correlata al T2DM (non diabetici 0.02086 ± 0.02648 vs diabetici 0.004148 ± 0.004566 , p-value=0.02).

Non risultano esserci differenze di espressione genica ossea statisticamente significative per: Col1A1 (non diabetici 1.285 ± 1.584 vs diabetici 0.8350 ± 1.210 , p-value=0.35), IL-8 (non diabetici 0.01149 ± 0.01474 vs diabetici 0.008160 ± 0.01183 , p-value=0.47), IL-10 (non diabetici $0.007337 \pm$

0.009614 vs diabetici 0.004057 ± 0.007206 , p-value= 0.35), TNF α (non diabetici 0.02195 ± 0.05021 vs diabetici 0.001803 ± 0.004233 , p-value= 0.14), ADIPOQ (non diabetici 0.07836 ± 0.1631 vs diabetici 0.06400 ± 0.1620 , p-value= 0.79), Wnt5a (non diabetici 0.003094 ± 0.002348 vs diabetici 0.007292 ± 0.007772 , p-value= 0.09), Wnt10b (non diabetici 0.001238 ± 0.001294 vs diabetici 0.0006096 ± 0.0005368 , p-value= 0.12). È emerso un trend di aumento di Dkk-1 nei non diabetici rispetto ai diabetici (non diabetici 0.001959 ± 0.001478 vs diabetici 0.001074 ± 0.0007831 , p-value=0.06) e di IL-6 (non diabetici 0.01499 ± 0.02618 vs diabetici 0.003316 ± 0.006572 , p-value=0.07) seppur non statisticamente significativo.

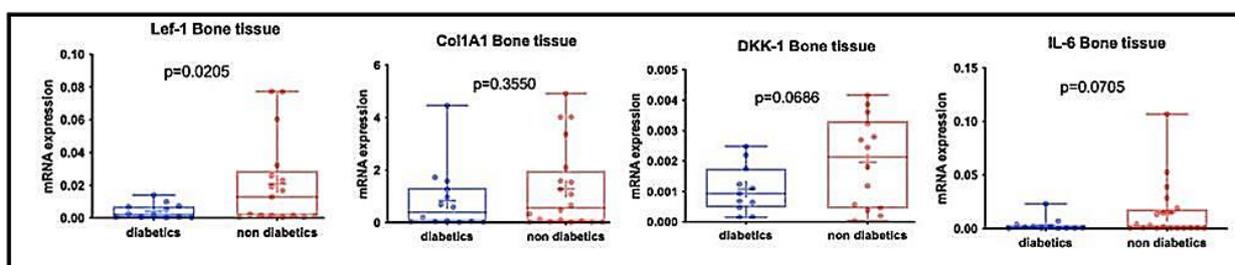


Fig. 1. Analisi dell'espressione genica nel tessuto osseo: Lef-1, Col1A1, DKK-1, IL-6.

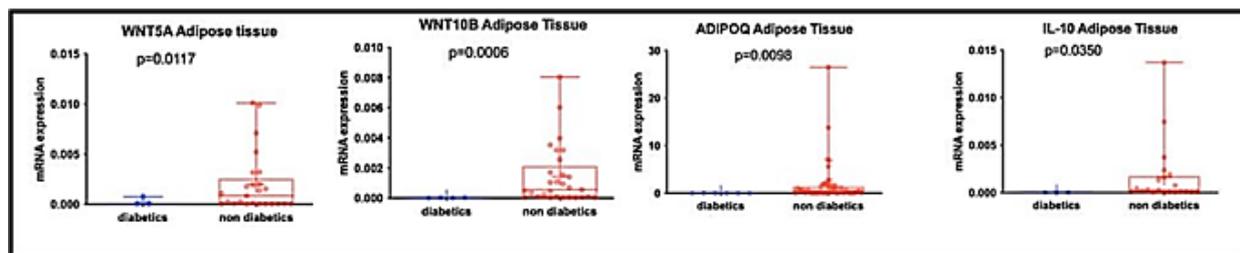


Fig. 2. Analisi dell'espressione genica nel tessuto adiposo: WNT5A, WNT10B, ADIPOQ, IL-10.

Nel tessuto adiposo (Fig. 2) risultano significativamente differenti: Wnt5a (non diabetici 0.002004 ± 0.002988 vs diabetici 0.0002502 ± 0.0004146 , p-value= 0.01), Wnt10b (non diabetici 0.001428 ± 0.001972 vs diabetici $1.666e-005 \pm 1.249e-005$, p-value= 0.0006), ADIPOQ (non diabetici 2.018 ± 4.75 vs diabetici 0.01578 ± 0.03073 , p-value=0.0098) e IL-10 (non diabetici 0.001638 ± 0.003284 vs diabetici $1.663e-005 \pm 0.000$ p-value=0.03). I livelli di espressione genica di Wnt5a, Wnt10b e adiponectina nel tessuto adiposo sono inferiori nel soggetto diabetico. La citochina infiammatoria IL-10 risulta significativamente più elevata nei soggetti non diabetici.

Sempre nel tessuto adiposo non vi sono differenze di espressione genica statisticamente significative per: IL-6 (non diabetici 0.02670 ± 0.04734 vs diabetici 0.009238 ± 0.01562 , p-value=0.22), IL-8 (non diabetici 0.01955 ± 0.03227 vs diabetici 0.01450 ± 0.03486 p-value=0.75), TNF α (non diabetici 0.001352 ± 0.002005 vs diabetici 0.002252 ± 0.003180 p-value=0.75).

Infine si riportano i dati del tessuto muscolare (Fig. 3), dove sono significativamente inferiori nei soggetti diabetici i livelli di espressione genica di Wnt10b (non diabetici 0.003722 ± 0.005434 vs diabetici 0.001335 ± 0.001485 , p-value= 0.02). Non risultano invece significativamente differenti: Wnt5a (non diabetici 0.08456 ± 0.01919 vs diabetici 0.1625 ± 0.3038 , p-value= 0.53), ADIPOQ (non diabetici 0.2382 ± 0.6997 vs diabetici 0.1840 ± 0.3035 , p-value=

0.70), IL-6 (non diabetici 0.03830 ± 0.07583 vs diabetici 0.02415 ± 0.03301 , p-value= 0.40), IL-8 (non diabetici 0.04327 ± 0.06914 vs diabetici 0.02906 ± 0.03754 , p-value= 0.44), IL-10 (non diabetici 0.0009544 ± 0.001512 vs diabetici 0.0004478 ± 0.0004878 , p-value= 0.13), TNF α (non diabetici 0.0008652 ± 0.0008804 vs diabetici 0.002270 ± 0.002188 p-value=0.09).

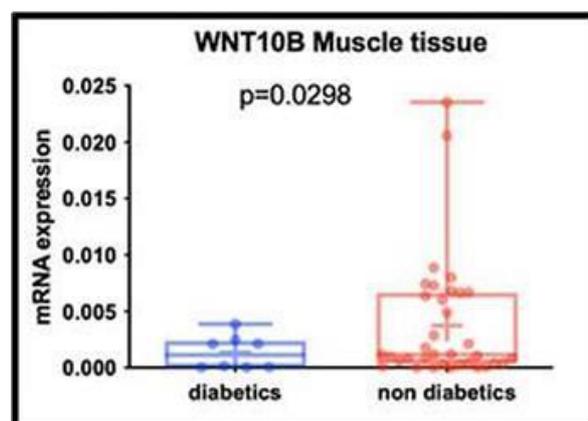


Fig. 3. Analisi dell'espressione genica nel tessuto muscolare: WNT10B.

Conclusioni

I dati sull'imaging osseo, conformemente a quanto riportato in letteratura su studi minori, non hanno evidenziato differenze strutturali significative tra diabetici e controlli, indicando pertanto l'assenza di alterazioni quantitative dell'osso nei pazienti con T2DM.

L'analisi dell'espressione genica ossea ha invece oggettivato una ridotta espressione di Lef-1 nei diabetici rispetto ai non diabetici, in linea con l'ipotesi di un'inibizione del

pathway canonico di Wnt alla base della fragilità ossea correlata al T2DM. Nessuna citochina infiammatoria ha mostrato una differenza significativa di espressione genica nell'osso tra soggetti diabetici e non diabetici.

A livello del tessuto adiposo, sia Wnt5a che Wnt10b sembrano avere un ruolo chiave nella regolazione del pathway di Wnt. Entrambe le molecole sono espresse meno nei soggetti diabetici. La riduzione di questi determinerebbe una minore insulino-sensibilità da parte del tessuto adiposo. I livelli di ADIPOQ risultano essere significativamente più elevati nei non diabetici, a riprova del fatto che l'adiponectina a livello del tessuto adiposo sia fisiologicamente fondamentale per garantire tolleranza glucidica e insulino-sensibilità. Anche IL-10 è significativamente più elevato nei non diabetici, confermando così la funzione antiinfiammatoria di questa citochina.

Infine, nel tessuto muscolare si evincono differenze significative di espressione di Wnt10b e TNF α , potendo far supporre così un possibile ruolo chiave del pathway Wnt e dell'infiammazione anche nella genesi delle complicanze muscolari indotte dal diabete.

Nonostante la ridotta dimensione campionaria, i risultati di questo studio forniscono dati preliminari molto importanti per studi futuri sul possibile targeting terapeutico del Wnt signaling per la prevenzione delle fratture da fragilità, per le complicanze muscolari e le caratteristiche adipogeniche dei soggetti affetti da diabete mellito di tipo 2. In ambito chirurgico, le evidenze dello studio sottolineano la necessità di un approccio mirato nei pazienti diabetici durante l'intervento chirurgico e nella riabilitazione post-intervento.

BIBLIOGRAFIA

1. Rugarli C. Medicina interna sistematica. Milano: EDRA Masson, 2015.

2. Pozzilli P, Briganti SI, Cannata F. L'endocrinologia del Campus Bio-Medico. Torino: Minerva Medica, 2020.
3. American Diabetes Association. Diagnosis and Classification of Diabetes Mellitus. Diabetes Care 2014; 37 (Suppl 1): S81-S90.
4. Chatterjee S, Khunti K, Davies MJ. Type 2 diabetes. Lancet 2017; 389: 2239-51.
5. International Diabetes Federation. IDF Diabetes Atlas, 10th edn. Brussels, Belgium, 2021. <https://www.diabetesatlas.org>.
6. Janghorbani M, Van Dam RM, Willett WC, Hu FB. Systematic Review of Type 1 and Type 2 Diabetes Mellitus and Risk of Fracture. Am J Epidemiol 2007; 166: 495-505.
7. Ahmed LA, Joakimsen RM, Berntsen GK, Fønnebø V, Schirmer H. Diabetes mellitus and the risk of non-vertebral fractures: the Tromsø study. Osteoporos 2006; 17: 495-500.
8. Yamamoto M, Yamaguchi T, Yamauchi M, Kaji H, Sugimoto T. Diabetic Patients Have an Increased Risk of Vertebral Fractures Independent of BMD or Diabetic Complications. J Bone Miner Res 2009; 24: 702-9.
9. Neutzsky-Wulff AV, Andreassen KV, Hjuler ST, et al. Future detection and monitoring of diabetes may entail analysis of both β -cell function and volume: How markers of β -cell loss may assist. J Transl Med 2012; 10: 214.
10. Napoli N, Chandran M, Pierroz DD, et al. Mechanisms of diabetes mellitus-induced bone fragility. Nat Rev Endocrinol 2017; 13: 208-19.
11. Baron R, Kneissel M. WNT signaling in bone homeostasis and disease: from human mutations to treatments. Nat Med 2013; 19: 179-92.
12. Piccoli A, Cannata F, Strollo R, et al. Sclerostin Regulation, Microarchitecture, and Advanced Glycation End-Products in the Bone of Elderly Women With Type 2 Diabetes. J Bone Miner Res 2020; 35: 2415-22.
13. Nie X, Wei X, Ma H, Fan L, Chen WD. The complex role of Wnt ligands in type 2 diabetes mellitus and related complications. J Cell Mol Med 2021; 25: 6479-95.

Sintesi della Tesi di Laurea discussa il 9 luglio 2021

Dott. Matteo Pileri, Corso di Laurea Magistrale in Medicina e Chirurgia, Facoltà di Medicina e Chirurgia, Università Campus Bio-Medico di Roma

Prof. Rocco Papalia, Professore Ordinario di Malattie apparato locomotore, Università Campus Bio-Medico di Roma

Prof. Nicola Napoli, Professore Ordinario di Endocrinologia, Università Campus Bio-Medico di Roma

Dott.ssa Giulia Leanza, PHD Fellow in Endocrinology, Università Campus Bio-Medico di Roma

Per la corrispondenza:
matteo.pileri95@gmail.com