Diabete e aterosclerosi, due malattie con la stessa "matrice"

Massimo Federici
Dipartimento di Medicina Interna, Università di Roma Tor Vergata

Il diabete mellito tipo 2 (DMT2) e l'aterosclerosi spesso si presentano nello stesso paziente e sono tra le principali problematiche per la salute pubblica nel nostro paese. Rispetto a una visione classica del legame tra le due malattie, che vedeva la prima come fattore di predisposizione all'insorgenza della seconda, si sostituisce oggi una rivisitazione della patogenesi che spesso sfuma in un unico processo in cui è difficile trovare una netta separazione. In questo articolo cercheremo di illustrare questo nuovo scenario, che porta alla inevitabile conclusione che gli algoritmi diagnostici e terapeutici devono mirare alla prevenzione e alla cura di entrambe le malattie in modo simultaneo.

I risultati di diversi studi epidemiologici hanno evidenziato che sia l'insulino-resistenza sia la glucotossicità promuovono la malattia macrovascolare diabetica, sebbene con differenti intensità e meccanismi (1). Infatti, tutti i più recenti trial clinici sono d'accordo nell'affermare che il controllo metabolico da solo non è sufficiente ad arrestare la progressione delle complicanze macrovascolari. Inoltre, tutti concordano sulla necessità di un approccio terapeutico globale verso tutti i fattori di rischio cardiovascolari, come l'ipertensione arteriosa, la dislipidemia aterogenica (basso HDL/ipertrigliceridemia) e l'ipercolesterolemia, pur riconoscendo che un controllo glicemico precoce possa prevenire complicanze macrovascolari a lungo termine (2, 3). Peraltro, è ormai noto come DMT2 e/o intolleranza ai carboidrati siano latenti in circa il 60% dei soggetti affetti da cardiopatia ischemica acuta o cronica, genericamente classificati in ambito cardiologico come normoglicemici (4). Inoltre, è sempre più evidente che la presenza di diabete (anche non diagnosticato) aumenta la mortalità nell'infarto miocardico acuto anche nella popolazione italiana (5).

Diabete e aterosclerosi: una nuova visione

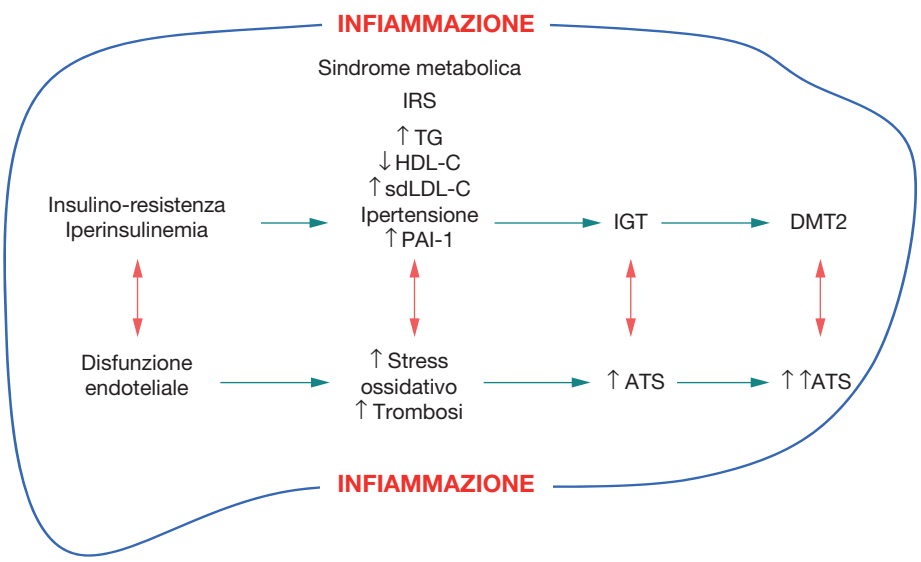
L'aterosclerosi è stata classicamente considerata come una complicanza macrovascolare tardiva e comune sia al diabete tipo 1 (DMT1) sia al DMT2. Più recentemente, diversi studi sperimentali hanno suggerito che il diabete e l'aterosclerosi sono due facce della stessa medaglia e che la sindrome metabolica è a sua volta identificabile come una piattaforma comune alle due malattie (Figura 1) (1).

Inoltre, evidenze su modelli animali indicano che attenuare la captazione di lipidi da parte di organi insulino-sensibili, come il tessuto adiposo o il fegato, possa persino migliorare la sensibilità insulinica (6), avvalorando l'ipotesi che alcune alterazioni del metabolismo lipidico provochino alterazioni dell'omeostasi metabolica. A supporto di questa evidenza sperimentale è la nostra recente osservazione che il diabete "occulto" si correla con il numero di siti affetti da malattia aterosclerotica in soggetti con aterosclerosi clinicamente evidente (7). Questi dati, anche corretti per età, sesso, terapia e altri fattori confondenti, suggeriscono che all'aumento della gravità dell'aterosclerosi segua un difetto metabolico latente che potrebbe contribuire a incrementare il rischio di eventi ricorrenti (7).

In questo scenario di percorso parallelo delle due malattie le evidenze relative all'identificazione di

Lettura Premio SID Alcmeone, XXIII Congresso della Società Italiana di Diabetologia. Padova, 9–12 giugno 2010

Figura 1 **Diabete e aterosclerosi corrono su due vie parallele**



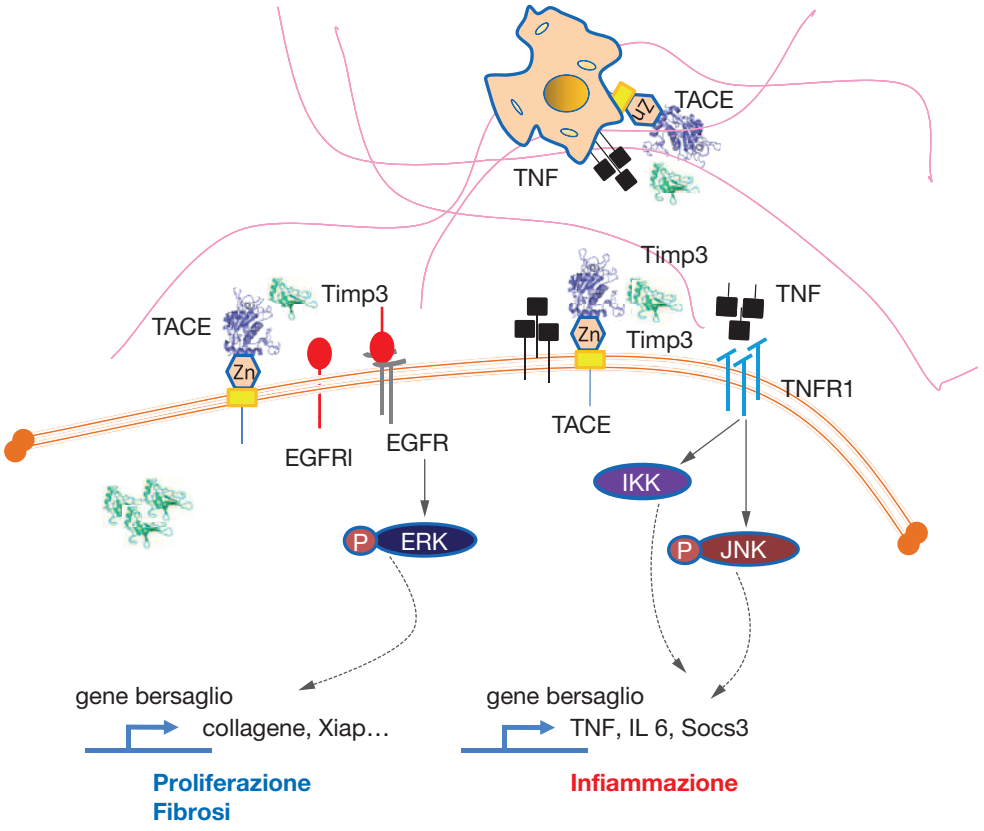
L'infiammazione subclinica può rappresentare una matrice che unisce le due patologie. IRS: insulin resistance sindrome*; TG: trigliceridi; HDL-C: colesterolo HDL; sdLDL-C: LDL piccole dense; PAI-1:* plasminogen activator inhibitor 1*; IGT:* impaired glucose tolerance*; ATS: aterosclerosi*

difetti che possano indurre simultaneamente infiammazione di basso grado e insulino-resistenza sono ancora limitate. Nel corso degli ultimi anni abbiamo identificato e caratterizzato uno tra i vari meccanismi alla base dell'interrelazione tra diabete e aterosclerosi (8).

TIMP3 e TACE: un binomio che regola il rilascio di proteine transmembrana

Allo scopo di identificare meccanismi comuni a diabete ed aterosclerosi, abbiamo concentrato la nostra attenzione su un modello tipico di diabete e insulino-resistenza, il *knock-out* eterozigote del recettore per l'insulina, *Insr*$^{+/-}$ (8). Questi animali sono normoglicemici (*Insr*$^{+/-}$N), tranne una piccola quota (circa il 20% del totale) che sviluppa iperinsulinemia e diabete (*Insr*$^{+/-}$D), in assenza di variazioni del peso corporeo. Un'analisi di confronto effettuata sul tessuto vascolare di *Insr*$^{+/-}$N e *Insr*$^{+/-}$D ha rivelato che questi ultimi, oltre a presentare un fenotipo diabetico, mostravano segni di infiammazione vascolare, come evidenziato dall'aumentata espressione di metalloproteasi di matrice (MMP) 2 e 9, due enzimi tipicamente sovra-espressi in tessuti sottoposti a segnali infiammatori. Un'analisi comparativa dell'espressione genica nel tessuto muscolare e aortico dei due ceppi *Insr*$^{+/-}$N e *Insr*$^{+/-}$D e degli animali WT rivelava che nei diabetici vi è una forte diminuzione di una proteina chiamata inibitore tissutale 3 delle metalloproteasi (TIMP3), un inibitore endogeno fondamentale nella regolazione dell'attività di diverse metalloproteasi della famiglia delle MMP. TIMP3 è inoltre il solo inibitore fisiologico conosciuto di un'altra metalloproteasi chiamata enzima di conversione del *tumor necrosis factor* (TNF)-α (TACE) (Figura 2) (9). TACE, nota anche come ADAM17 (*A disintegrin and A metalloproteinase* 17), è una proteina transmembrana di tipo 1 che appartiene alla superfamiglia delle metalloproteasi Zn-dipendenti. TACE svolge un ruolo chiave nella regolazione del rilascio proteolitico dalle membrane cellulari di alcune citochine (come il TNF-α), di fattori di crescita e dei loro recettori, come i recettori I e II del TNF-α, *transforming growth factor* (TGF)-α, L-selectina, interleuchina (IL)-6 e recettore *macrophage colony-stimulating factor* (M-CSF)1. Il rilascio avviene grazie a un processo conosciuto come "taglio degli ectodomini" e modifica il segnale a valle e le risposte metaboliche delle cellule bersaglio (9). Il modello animale *knock-out* per TACE non è vitale e le cellule prive di TACE mostrano un alterato rilascio di molte proteine bersaglio; ciò indica che TACE è un regolatore cru-

Figura 2 **Meccanismo di azione di TIMP3**



TIMP3 è un inibitore di metalloproteasi di matrice (MMP): TACE appartiene a questa classe di enzimi. TACE innesca segnali infiammatori via TNF-IKK-JNK e segnali proliferativi via EGFR-ERK

ciale di citochine infiammatorie e di fattori di crescita (9). Una ridotta regolazione di TIMP3 aumenta l'attività di TACE, mentre una sovra regolazione di TIMP3 inibisce l'attività di TACE. Inoltre, il modello con ridotta espressione di TIMP3 mostra aumentati livelli di TNF-α e di infiammazione epatica (10). I livelli di TIMP3 sono ridotti nel tessuto adiposo di modelli genetici di obesità (11).

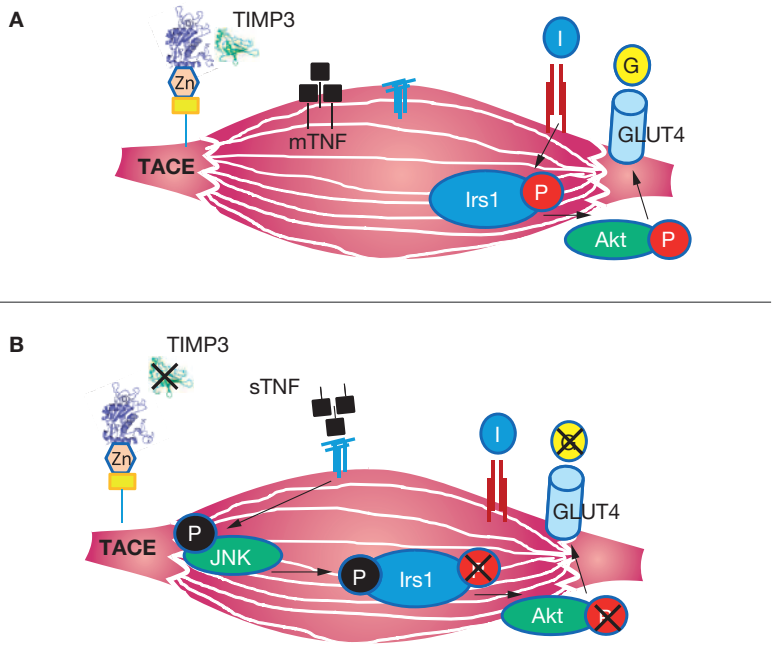
La principale citochina pro-infiammatoria metabolizzata da TACE è il TNF-α, una citochina infiammatoria pleiotropica prodotta da varie cellule (fra cui i macrofagi, i monociti e i linfociti T) che riveste un ruolo cruciale nella patogenesi dell'infiammazione. Il TNF-α agisce sia in maniera paracrina, nella sua forma solubile che lega il recettore p55 (TNFR1), sia in maniera autocrina, nella forma di membrana che utilizza il recettore TNFR2 (p75). I due recettori possono determinare differenti effetti e il TNFR1/p55 è la forma dominante, responsabile della maggior parte degli effetti negativi del TNF-α sull'omeostasi metabolica e vascolare. Il rapporto fra le forme solubile e di membrana di TNF-α è regolato da TACE (9).

Un'aumentata attività di TACE come possibile conseguenza di un deficit di TIMP3 attiva il segnale mediato dalla forma solubile del TNF-α che, attraverso il suo recettore TNFR1, innesca le proteine chinasi IKK e JNK. Queste agiscono su fattori di trascrizione, come *nuclear factor* (NF)-κB e AP-1, esacerbando la risposta infiammatoria mediante la produzione di citochine (IL-6, *monocyte chemoattractant protein* (MCP)-1) e molecole di adesione (Figura 2). Vari marcatori infiammatori, di cui è noto l'aumento in malattie come l'ischemia, lo scompenso cardiaco, l'artrite, l'aterosclerosi, il diabete, il cancro, malattie neurologiche e immunitarie, sono substrati di TACE, come ad esempio sVCAM1, sICAM1, sIL6R, sTNFR1, sCX3CL1, sCXCL16 (9).

TACE nell'insulino-resistenza del muscolo scheletrico

Un effetto negativo del TNF-α sul segnale insulinico e sulla captazione di glucosio è stato dimostrato, *in vivo* e in vitro, sia a livello recettoriale sia post-recettoriale (12, 13). Infatti, TNF-α può controllare, mediante un'inibizione diretta e indiretta, l'attività tirosino chinasica del recettore insulinico e soprattutto la fosforilazione in serina dell'*insulin receptor substrate* (Irs)1 (14), che riduce la capacità delle cellule di attivare i trasportatori di glucosio GLUT4 (Figura 3). Al contrario, l'inibizione del TNF-α con approcci genetici migliora la sensibilità insulinica in diversi modelli (15, 16). Noi e altri abbiamo dimostrato come nei modelli sperimentali e nei soggetti affetti da diabete l'attività di TACE sia aumentata, con conseguente incremento del rilascio proteolitico del TNF-α e della sua azione infiammatoria recettore-mediata (17–19). Abbiamo ipotizzato che l'aumento dell'attività di TACE sia determinato da un meccanismo a "due stadi". Il primo è la deregolazione di ERK1/2, spesso presente negli stati di insulino-resistenza, che potrebbe incrementare la fosforilazione di TACE, favorendo la sua localizzazione a livello della membrana plasmatica (17–19) in cui taglia il TNF-α e altri substrati, come Pref-1 (20). L'attività di TACE è limitata in presenza dell'inibitore TIMP3: un'acuta riduzione di TIMP3 a livello del muscolo scheletrico è in grado di determinare un fenotipo diabetico solamente in presenza di un secondo difetto dell'azione insulinica (8). Un *wide scan* genomico in modelli di diabete ha confermato che esiste una variante del promotore associata a una riduzione dell'espressione di *Timp3* (21). Inoltre, TIMP3 è sottoregolato nell'invecchiamento, in associazione con altri fattori, causando infiammazione. Al contrario, la restrizione calorica, che ha effetti anti-infiammatori e insulino-sensibilizzanti, aumenta l'espressione di TIMP3 (22). Il nostro gruppo ha riscontrato che in cellule muscolari lisce l'espressione di TIMP3 è regolata attraverso l'attivazione del promotore della sirtuina (SirT1), una deacetilasi che mima la restrizione calorica (23). Altri gruppi hanno dimostrato che il fattore di trascrizione

Figura 3 **Effetto di TIMP3/TACE sul metabolismo glicidico**



***A.** In presenza di TIMP3, il TNF-α resta immobilizzato sulla membrana, con poche o nessuna interazione con il suo recettore; il recettore per l'insulina è in grado di attivare la via metabolica Irs1/AKT che regola il trasporto di glucosio nel muscolo. **B.** In assenza di TIMP3, TACE può liberare mediante proteolisi di membrana il suo substrato TNF, generando dei segnali che via chinasi infiammatorie come JNK provocano un blocco di Irs1, impedendo al segnale insulinico di trasportare il glucosio*

FoxO1 potrebbe influire negativamente sull'espressione di TIMP3. Poiché TIMP3 si trova a valle di SirT1 e FoxO1, sta emergendo un suo ruolo come fattore favorente la sensibilità insulinica. Nel tessuto muscoloscheletrico di pazienti con insulino-resistenza e diabete la concomitanza di lipotossicità e glucotossicità è in grado di ridurre i livelli di TIMP3, provocando un aumento dell'attività di TACE che correla con l'insulino-resistenza (8).

TIMP3 e TACE: regolazione dell'accumulo di macrofagi nel tessuto adiposo

L'espansione del tessuto adiposo nell'obesità, caratterizzato da un'alterata produzione di adipochine e da aumentati livelli dei marker biologici dell'infiammazione, è associata a un aumentato infiltrato di macrofagi, normalmente reclutati nei siti di danno tissutale (24). Molti studi hanno suggerito che la proteina MCP-1 sia un fattore chemiotattico, coinvolto nell'infiltrazione macrofagica nel tessuto adiposo, che contribuisce allo sviluppo delle complicanze correlate all'obesità (24). Oltre all'aumentato numero di macrofagi, l'obesità induce anche un cambio fenotipico della loro polarizzazione nel tessuto adiposo. Infatti, i macrofagi che migrano nel tessuto adiposo dei modelli sottoposti a dieta con alto contenuto di grassi sono differenti da quelli in normali condizioni dietetiche (24). L'obesità indotta dalla dieta conduce a un cambiamento nello stato di attivazione dei macrofagi del tessuto adiposo da uno stato polarizzato M2, che negli animali magri protegge gli adipociti dall'infiammazione, a uno stato proinfiammatorio M1 (25). Nell'uomo l'infiltrato macrofagico è correlato alla dimensione degli adipociti e al *body mass index* (BMI) ed è ridotto dopo la perdita di peso ottenuta con l'intervento chirurgico nei soggetti obesi con morbidità (26, 27). Inoltre, l'accumulo dei macrofagi contribuisce alle complicanze dell'obesità umana ed è associato alle lesioni epatiche fibro-infiammatorie, alla disfunzione arteriosa sistemica e all'insulino-resistenza (28). Il TNF-α è stato il primo fattore di derivazione adipocitaria studiato come possibile collegamento fra obesità, infiammazione e diabete. Il TNF-α è fortemente associato all'obesità e la sua espressione è aumentata nel tessuto adiposo di modelli murini di obesità e insulino-resistenza. Nell'uomo l'aumentata espressione di TNF-α è correlata con il BMI, la percentuale di grasso corporeo e l'iperinsulinemia, mentre il calo ponderale determina una diminuzione dei livelli di TNF-α (12–16). Esso è maggiormente espresso nel grasso viscerale rispetto al sottocutaneo ed è abbondantemente prodotto dalle cellule dello stroma vascolare (principalmente macrofagi), piuttosto che dagli adipociti. Questa citochina, inoltre, sembra avere un ruolo cruciale nella disregolazione delle adipochine: gli adipociti di soggetti obesi sovra-producono adipochine in risposta a uno stimolo con TNF-α. Studi condotti dal nostro gruppo supportano l'ipotesi che l'attività di TACE, controllata dal segnale di TIMP3, rappresenti un regolatore della sensibilità insulinica e dei pathway infiammatori, mediante l'aumentata sintesi di TNF-α solubile, agendo a monte di MCP-1 nel processo di reclutamento dei macrofagi (17, 18).

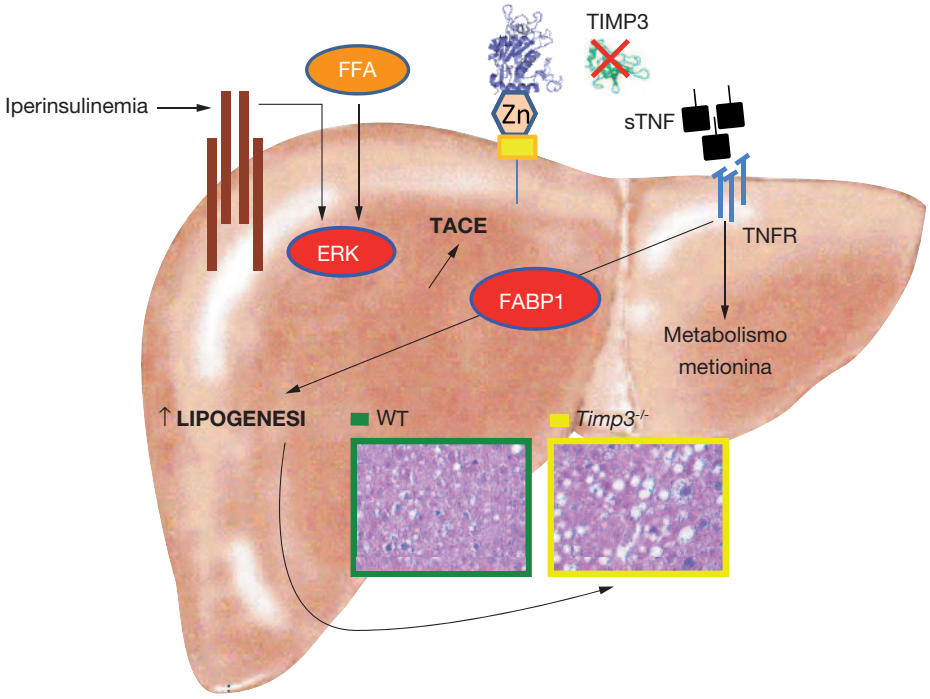
Il binomio TACE/TIMP3 potrebbe essere un meccanismo per l'integrazione di segnali metabolici e di stress in differenti tipi cellulari, fra cui gli adipociti. Il modello omozigote per la delezione di TACE ha un fenotipo magro, marcatamente ipermetabolico (29). Il drammatico aumento del metabolismo non è dovuto a un incremento dell'attività fisica, della temperatura corporea o della funzione tiroidea. I difetti di sviluppo osservati sono stati correlati a un alterato segnale del recettore del TNF e/o di *epidermal growth factor* (EGF), aprendo la prospettiva che l'omeostasi energetica possa essere legata a una di queste vie di segnale o a entrambe (29). Il modello aploinsufficiente di TACE ($Tace^{+/-}$) è allo stesso modo protetto contro le complicanze metaboliche dell'obesità indotta dalla dieta, incluse l'insulino-resistenza e il diabete; ciò suggerisce un coinvolgimento di TACE nel controllo metabolico in condizioni di dieta ad alto contenuto calorico (17). Quando sottoposto a dieta grassa, il modello $Tace^{+/-}$ è caratterizzato da un ridotto peso dei cuscinetti adiposi e da un incremento di piccoli adipociti; presenta inoltre un diminuito rilascio di TNF-α e di altri substrati di TACE, tra cui l'inibitore dell'adipogenesi Pref-1 (20). Questi dati suggeriscono che un'interferenza con il rilascio dei substrati di TACE possa determinare un effetto protettivo durante una dieta con alto contenuto calorico, in parte mediante un effetto positivo sulla plasticità del tessuto adiposo e in parte attraverso la modulazione di differenti segnali metabolici e infiammatori a valle. Inoltre, in condizioni di dieta obesogenica il doppio KO $Insr^{+/-}Timp3^{-/-}$ mostra un accelerato sviluppo delle complicanze dell'obesità. Infatti, la mancanza di TIMP3, in combinazione con una predisposizione gene-

tica e una dieta appropriata, promuove l'infiammazione nel tessuto adiposo, portando all'accumulo di macrofagi e all'attivazione di vie di segnale dell'infiammazione (18).

TACE nell'insulino-resistenza epatica e nella steatosi

Il contributo dell'insulino-resistenza allo sviluppo della steatosi epatica è dovuto in parte al ridotto controllo dell'immagazzinamento lipidico nel tessuto adiposo bianco e in parte all'alterato controllo della lipogenesi epatica e dell'ossidazione degli acidi grassi a livello mitocondriale (30). L'ulteriore evoluzione della steatosi epatica a fibrosi e steatoepatite implica l'attivazione delle cellule stellate epatiche e delle cellule di Kupffer da parte di fattori correlati all'insulino-resistenza (30). Il TNF-α è fra le citochine coinvolte nel collegamento fra la disponibilità di nutrienti e l'infiammazione e lo sviluppo di steatosi epatica (30) e pertanto la regolazione del suo rilascio dalla membrana plasmatica da parte del sistema TACE/TIMP3 rappresenta un passaggio chiave nella patogenesi della steatosi. Abbiamo recentemente dimostrato che la deficienza di TIMP3 accelera l'infiammazione epatica e la steatosi in presenza di insulino-resistenza secondaria a dieta e genetica, come nel modello *Insr*$^{+/-}$*Timp3*$^{-/-}$ (18). In particolar modo nel fegato questa sinergia determina un complesso fenotipo fortemente simile a una grave steatoepatite non alcolica caratterizzata da infiammazione periportale e globulare, rigonfiamento epatocellulare e fibrosi perisinusoidale. Questo fenotipo è associato a un'aumentata espressione di marker tipici dell'infiammazione e della steatosi, come MCP-1, F4/80, FABP-1, SOCS3 e SCD1. Inoltre, la regolazione di elementi chiave nella via di traduzione del segnale insulinico, come Akt e i suoi effettori a valle FoxO1 e FoxA2, è alterata nel fegato del modello *Insr*$^{+/-}$*Timp3*$^{-/-}$ sottoposto a dieta grassa. L'infiammazione scompensata è confermata, inoltre, dall'attivazione dei processi infiammatori e fibrotici mediati da JNK, IKK e recettori per EGF e dall'aumentata traslocazione del fattore di trascrizione NFκB nel nucleo. La fosforilazione di AMPK è inoltre ridotta nel fegato dei KO *Insr*$^{+/-}$*Timp3*$^{-/-}$ sottoposti a dieta grassa, condizione che potrebbe spiegare l'aumentato contenuto lipidico epatico mediante la diminuzione dell'ossidazione degli acidi grassi. L'analisi dell'espressione genica rivela che alcuni dei geni significativamente sovra- o sotto-regolati nel fegato dei KO *Insr*$^{+/-}$*Timp3*$^{-/-}$ sottoposti a dieta grassa sono coinvolti nel controllo del metabolismo degli acidi grassi, del metabolismo glucidico e dell'infiammazione (18). È ancora poco chiaro come la tossicità metabolica possa dare inizio alla cascata infiammatoria. Recentemente abbiamo analizzato il contributo dell'attivazione epatica di TACE nello sviluppo della steatosi epatica, studiando modelli cellulari e murini mediante la tecnologia di proteomica (31). In un modello cellulare *in vitro* (epatociti SV40-trasformati) l'attività di TACE è significativamente aumentata da stimoli correlati alla disfunzione metabolica, come il sovraccarico degli acidi grassi liberi (acido palmitico), l'infiammazione di basso grado (LPS), l'iperglicemia e l'iperinsulinemia. L'attivazione di TACE, inoltre, altera l'azione insulinica, così come riduce l'abilità dell'ormone di regolare la via Akt/FoxO1/GSK3, fondamentale nel controllo della gluconeogenesi e della lipogenesi (31). Un'attivazione incontrollata e prolungata di TACE contribuisce alla degenerazione epatica indotta dal sovraccarico lipidico, come dimostrato dal modello *Timp3*$^{-/-}$ sottoposto a dieta grassa per 20 settimane. L'analisi istologica dei fegati murini mostra una steatosi macrovescicolare e una degenerazione globulare rispetto ai WT. Questo fenotipo può essere spiegato in parte dall'aumentata espressione dei fattori di trascrizione coinvolti nella lipogenesi (come LXRα e ChREBP1) e dei loro substrati FAS e SCD1. Usando un approccio di *shotgun proteomics*, sono state identificate proteine differentemente espresse nei WT e nei *Timp3*$^{-/-}$ sottoposti a dieta grassa; tra queste, il trasportatore di acidi grassi FABP-1 è risultato essere sensibilmente aumentato nel deficit di TIMP3. Un insieme di proteine sotto-regolate nel deficit di TIMP3 è correlato al metabolismo della metionina, via metabolica già associata alla steatosi nei modelli preclinici (**Figura 4**) (31). Fra queste proteine vi è ADK, che è implicata nella protezione contro la steatosi epatica mediante la regolazione dei livelli di adenosina (32). Anche MAT1A e GNMT sono meno espressi nei *Timp3*$^{-/-}$ sottoposti a dieta grassa rispetto ai controlli WT. Dati ottenuti negli animali *knock-out* sono concordanti con questi risultati. Infatti, la deficienza di MAT1A o GNMT determina una steatosi macrovescicolare e un'aumentata espressione di segnali proliferativi nel fegato e nell'epatocarcinoma (32). Al contrario, i livelli di FABP1 sono maggiori nei *Timp3*$^{-/-}$ sot-

Figura 4 **Effetto di TIMP3/TACE sul tessuto epatico**



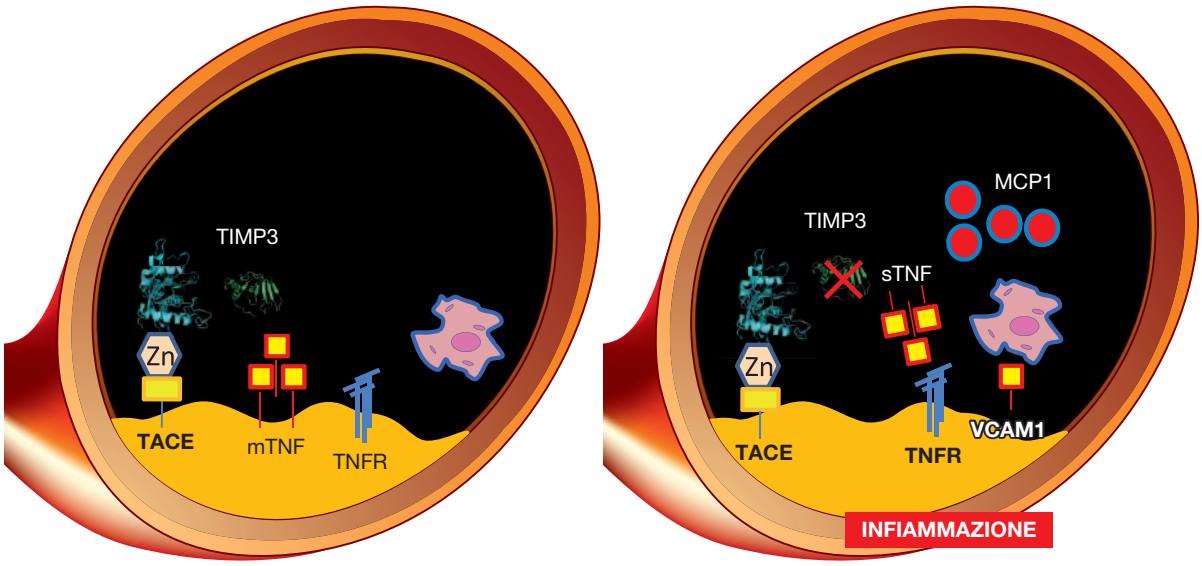
L'iperinsulinemia e gli acidi grassi liberi possono attivare TACE mediante le chinasi ERK e i radicali liberi dell'ossigeno (ROS). In concomitanza di una riduzione di TIMP3, questo provoca liberazione di TNF, che attraverso TNFR attiva segnali infiammatori che disturbano a vari livelli il metabolismo glico-lipidico. Tra i vari effetti si ha un aumento della lipogenesi e un'alterazione del metabolismo della metionina. Il fenotipo risultante in un modello privo di TIMP3, sottoposto a un regime calorico che causa iperinsulinemia e aumento di acidi grassi liberi, è una severa steatoepatite

toposti a dieta grassa rispetto ai controlli WT; il modello *knock-out* per questa proteina è protetto dalla steatosi epatica indotta dal sovraccarico di nutrienti, in accordo con l'ipotesi che l'aumentata espressione di FABP1, come riscontrata nei *Timp3*$^{-/-}$, possa contribuire a un fenotipo opposto (33).

TIMP3 e TACE nell'infiammazione vascolare

Il ruolo di TIMP3 come controllore dell'attivazione di metalloproteasi della famiglia MMP e della famiglia ADAM ne fa un attore importante nel controllo dell'infiammazione in ambito vascolare, uno degli aspetti cruciali della patogenesi dell'aterosclerosi. È importante notare che diversi substrati di TACE sono stati identificati nel circolo sanguigno di pazienti con patologie cardiovascolari e vengono utilizzati come biomarcatori di attivazione endoteliale; tra questi ritroviamo le molecole di adesione VCAM1 e ICAM1, la L-selectina, la fractalchina e il TNFR1 (34). La componente solubile di queste proteine rappresenta la quota liberata nello spazio extracellulare in seguito al taglio indotto da TACE delle forme trans-membrana delle proteine. Alcune citochine, oltre al TNF-α, sono attivate mediante taglio proteolitico indotto da TACE, quali CXCL16, CX3CL1, CD40L e altre (9). Attraverso il meccanismo della proteolisi di membrana, TACE può indurre processi infiammatori o anche proliferativi-fibrotici, a seconda che siano rilasciate citochine o ligandi di EGFR. In base al contesto, la sovrattivazione di TACE può contribuire ad aumentare il contenuto infiammatorio all'interno delle placche o a incrementare la proliferazione del muscolo liscio e quindi la crescita della placca stessa (Figura 5). Contemporaneamente, la carenza di TIMP3, oltre a innescare TACE, potrebbe favorire processi infiammatori attraverso un aumento dell'attivazione di MMP9 (9). Inoltre, TIMP3 è un regolatore dell'angiogenesi e la sua assenza impe-

Figura 5 **Effetto di TIMP3/TACE sul tessuto vascolare**



Il rilascio di TNF-α determinato dalla riduzione di TIMP3 causata da gluco- e lipotossicità, aumenta la produzione di molecole chemoattrattive come MCP-1 e di adesione come VCAM-1. Ciò permette ai monociti di aderire alla parete vascolare e infiltrare la placca aterosclerotica. Il quadro finale è un aumento dell'infiammazione intravascolare, evento importante nella patogenesi dell'aterosclerosi

disce la formazione di un processo angiogenico organizzato, provocando un aumento del numero di capillari che tuttavia non riescono ad assumere una struttura organizzata (9).

Nei modelli sperimentali preclinici di diabete e obesità abbiamo osservato che il deficit di TIMP3 aumenta l'espressione di MCP-1, VCAM1, ICAM1, RAGE e altri mediatori dell'infiammazione (8, 18). Inoltre, nel doppio KO *Insr*$^{+/-}$*Timp3*$^{-/-}$ si formano strie lipidiche assenti nei diversi ceppi di controllo (18).

Nei pazienti diabetici abbiamo riscontrato una riduzione dell'espressione di TIMP3 nel muscolo scheletrico e nelle placche aterosclerotiche, misurata mediante dosaggio del suo RNA, del livello di proteina e della sua distribuzione (19, 22). Questa riduzione si associa a una aumentata attività di TACE e di MMP9 nel paziente diabetico. La colorazione in immunoistochimica mostra che TIMP3 è prodotta in modo particolare dalle cellule muscolari lisce e dai macrofagi: queste cellule, oltre a quelle endoteliali, sono state utilizzate per esperimenti *in vitro* per lo studio della regolazione dell'espressione di TIMP3 (22). I dati dimostrano che l'espressione di TIMP3 in cellule muscolari lisce coronariche è ridotta da condizioni di alto glucosio (indipendentemente dall'effetto osmotico) e dall'inibizione della deacetilasi SirT1, un enzima coinvolto nella modulazione positiva dell'efficienza energetica e della longevità (35). I nostri dati *in vitro* dimostrano che SirT1 regola direttamente la trascrizione di TIMP3. Inoltre, in un campione di placche aterosclerotiche i livelli di TIMP3 correlano positivamente con quelli di SirT1, anche in ragione dello stato metabolico (19).

Conclusioni

Il nostro recente lavoro si è focalizzato sul ruolo della diade TACE-TIMP3 nella regolazione dell'attività del TNF-α nei principali tessuti metabolici. I nostri dati suggeriscono che TIMP3 è ridotto e TACE è attivato in modo crescente nelle malattie metaboliche. Ciò contribuisce al progressivo deterioramento dell'omeostasi metabolica mediante la regolazione di diverse vie di segnale: l'infiltrazione macrofagica del tessuto adiposo, la riduzione della captazione di glucosio nel muscolo scheletrico, l'aumentata lipogenesi nel fegato e lo stato infiammatorio e fibrotico della placca aterosclerotica. L'alterata regolazione delle molteplici vie metaboliche favorisce la progressione dell'insulino-resistenza da un difetto subclinico a una sindrome

eterogenea, con la comparsa di patologie complesse come il DMT2, la steatoepatite non alcolica e l'aterosclerosi.

Bibliografia

1. Federici M, Lauro R. Review article: Diabetes and atherosclerosis--running on a common road. Aliment Pharmacol Ther 22 (Suppl 2): 11–15, 2005.
2. Goede P, Lund-Andersen H, Parving HH, et al. Effect of a multifactorial intervention on mortality in type 2 diabetes. N Engl J Med 358: 580–591, 2008.
3. Holman RR, Paul SK, Bethel MA, et al. 10-year follow-up of intensive glucose control in type 2 diabetes. N Engl J Med 359: 1577–1589, 2008.
4. Bartnik M, Rydén L, Ferrari R, Malmberg K, Pyörälä K, Simoons M, Standl E, Soler-Soler J, Ohrvik J; Euro Heart Survey Investigators. The prevalence of abnormal glucose regulation in patients with coronary artery disease across Europe: The Euro Heart Survey on diabetes and the heart. Eur Heart J 25: 1880–1890, 2004.
5. Rizza S, Clementi F, Porzio O, et al. Adiponectin isoforms are not associated with the severity of coronary atherosclerosis but with undiagnosed diabetes in patients affected by stable CAD. Nutr Metab Cardiovasc Dis 19: 54–60, 2009.
6. Hofmann SM, Zhou L, Perez-Tilve D, et al. Adipocyte LDL receptor-related protein-1 expression modulates postprandial lipid transport and glucose homeostasis in mice. J Clin Invest 17: 3271–3282, 2007.
7. Rizza S, Cardellini M, Martelli E, et al. Occult impaired glucose regulation in patients with atherosclerosis is associated to the number of affected vascular districts and inflammation. Atherosclerosis in press 2010 doi:10.1016/j.atherosclerosis.2010.05.017
8. Federici M, Hribal ML, Menghini R, et al. Timp3 deficiency in insulin receptor-haploinsufficient mice promotes diabetes and vascular inflammation via increased TNF-alpha. J Clin Invest 115: 3494–3505, 2005.
9. Murphy G, Murthy A, Khokha R. Clipping, shedding and RIPping keep immunity on cue. Trends Immunol 29: 75–82, 2008.
10. Mohammed FF, Smookler DS, Taylor SE, et al. Abnormal TNF activity in Timp3-/- mice leads to chronic hepatic inflammation and failure of liver regeneration. Nat Genet 36: 969–977, 2004.
11. Chavey C, Mari B, Monthouel MN, et al. Matrix metalloproteinases are differently expressed in adipose tissue during obesity and modulate adipocyte differentiation. J Biol Chem 278: 11888–11896, 2003.
12. Hotamisligil G, Shargill N, Spiegelman BM. Adipose expression of tumor necrosis factor-alpha: Direct role in obesity-linked insulin resistance. Science 259: 87–91, 1993.
13. Maury E, Noel L, Detry R, et al. In vitro hyper-responsiveness to TNF-{alpha} contributes to adipokine dysregulation in omental adipocytes of obese subjects. J Clin Endocrinol Metab 94: 1393–1400, 2009.
14. Rui L, Aguirre V, Kim JK, et al. Insulin/IGF-1 and TNF-alpha stimulate phosphorylation of IRS-1 at inhibitory Ser307 via distinct pathways. J Clin Invest 107: 181–189, 2001.
15. Steinberg GR, Michell BJ, van Denderen BJ, et al. Tumor necrosis factor alpha-induced skeletal muscle insulin resistance involves suppression of AMP-kinase signaling. Cell Metab 4: 465–474, 2006.
16. Austin RL, Rune A, Bouzakri K, et al. siRNA-mediated reduction of inhibitor of nuclear factor-kappaB kinase prevents tumor necrosis factor-alpha-induced insulin resistance in human skeletal muscle. Diabetes 57: 2066–2073, 2008.
17. Serino M, Menghini R, Fiorentino L, et al. Mice heterozygous for tumor necrosis factor-alpha converting enzyme are protected from obesity-induced insulin resistance and diabetes. Diabetes 56: 2541–2546, 2007.
18. Menghini R, Menini S, Amoruso R, et al. Tissue inhibitor of metalloproteinase 3 deficiency causes hepatic steatosis and adipose tissue inflammation in mice. Gastroenterology 136: 663–672, 2009.
19. Monroy A, Kamath S, Chavez AO, et al. Impaired regulation of the TNF-alpha converting enzyme/tissue inhibitor of metalloproteinase 3 proteolytic system in skeletal muscle of obese type 2 diabetic patients: A new mechanism of insulin resistance in humans. Diabetologia 52: 2169–2181, 2009.
20. Wang Y, Sul HS. Ectodomain shedding of preadipocyte factor 1 (pref-1) by tumor necrosis factor alpha converting enzyme (TACE) and inhibition of adipocyte differentiation. Mol Cell Biol 26: 5421–5435, 2006.
21. Su Z, Tsaih SW, Szatkiewicz J, et al. Candidate genes for plasma triglyceride, FFA, and glucose revealed from an intercross between inbred mouse strains NZB/B1NJ and NZW/LacJ. J Lipid Res 49: 1500–1510, 2008.
22. Cardellini M, Menghini R, Martelli E, et al. TIMP3 is reduced in atherosclerotic plaques from subjects with type 2 diabetes and increased by SirT1. Diabetes 58: 2396–2401, 2009.
23. Swindell WR. Genes and gene expression modules associated with caloric restriction and aging in the laboratory mouse. BMC Genomics 10: 585, 2009.
24. Gustafson B, Hammarstedt A, Andersson CX, et al. Inflamed adipose tissue: A culprit underlying the metabolic syndrome and atherosclerosis. Arterioscler Thromb Vasc Biol 27: 2276–2283, 2007.
25. Lumeng CN, Bodzin JL, Saltiel AR. Obesity induces a phenotypic switch in adipose tissue macrophage polarization. J Clin Invest 117: 175–184, 2007.
26. Weisberg SP, McCann D, Desai M, et al. Obesity is associated with macrophage accumulation in adipose tissue. J Clin Invest 112: 1796–1808, 2003.
27. Cancello R, Henegar C, Viguerie N, 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 54: 2277–2286, 2005.
28. Cancello R, Tordjman J, Poitou C, et al. Increased infiltration of macrophages in omental adipose tissue is associated with marked hepatic lesions in morbid human obesity. Diabetes 55: 1554–1561, 2006.
29. Gelling RW, Yan W, Al-Noori S, et al. Deficiency of TNF-alpha converting enzyme (TACE/ADAM17) causes a lean, hypermeta-

bolic phenotype in mice. Endocrinology 149: 6053–6064, 2008.
30. Postic C, Girard J. Contribution of de novo fatty acid synthesis to hepatic steatosis and insulin resistance: Lessons from genetically engineered mice. J Clin Invest 118: 829–838, 2008.
31. Fiorentino L, Vivanti A, Cavalera M, et al. Increased tumor necrosis factor alpha-converting enzyme activity induces insulin resistance and hepatosteatosis in mice. Hepatology 51: 103–110, 2010.
32. Mato JM, Martínez-Chantar ML, Lu SC. Methionine metabolism and liver disease. Annu Rev Nutr 28: 273–293, 2008.
33. Newberry EP, Xie Y, Kennedy SM, et al. Protection against Western diet-induced obesity and hepatic steatosis in liver fatty acid-binding protein knockout mice. Hepatology 44: 1191–1205, 2006.
34. Ludwig A, Weber C. Transmembrane chemokines: Versatile "special agents" in vascular inflammation. Thromb Haemost 97: 694–703, 2007.
35. Menghini R, Casagrande V, Cardellini M, et al. MicroRNA 217 modulates endothelial cell senescence via silent information regulator 1. Circulation 120: 1524–1532, 2009.