

La cellula L intestinale come target di terapia

Salvatore Piro, Lorian G. Mascali, Francesca Urbano, Francesco Purrello

Dipartimento di Biomedicina Clinica e Molecolare, Università di Catania

Per anni la fisiopatologia del diabete mellito ha avuto come protagonista assoluta l'insulina. Oggi questa visione deve in parte essere modificata, grazie anche all'impulso dato alla ricerca scientifica dalla possibilità di poter utilizzare nella pratica clinica una nuova classe di farmaci, le incretine. Oltre all'insulino-resistenza o al deficit di secrezione insulinica, alterazioni di glucagone, *glucagon-like peptide* (GLP)-1 e *glucose-dependent insulintropic peptide* (GIP) svolgono un ruolo chiave nella patogenesi della malattia, rappresentando punti di studio per la comprensione del delicato equilibrio ormonale che caratterizza il diabete tipo 2 (DMT2).

In particolare, sebbene l'individuazione di ormoni prodotti dall'intestino in grado di influenzare i livelli di glucosio nel sangue risalga al 1932, è solo nel 1978 e nel 1987, rispettivamente, che venivano identificati la cellula L intestinale come entità specifica e l'effetto incretinico glucosio-dipendente nell'uomo (1, 2). Infine, nel 2005 è stato possibile disporre di farmaci attivi sull'asse delle incretine: analoghi del GLP-1 agonisti del suo recettore o inibitori dell'enzima dipeptidil-peptidasi (DPP)-4, responsabile della rapida degrada-

zione di GLP-1 e GIP. Questi farmaci si sono dimostrati validi nella terapia del DMT2 e la loro efficacia sta spingendo a una migliore comprensione della complessità di questo asse per sfruttarne in pieno le potenzialità terapeutiche.

Introduzione

Nell'uomo i livelli plasmatici di insulina sono più elevati dopo un carico orale di glucosio, se paragonati a quelli che vengono raggiunti dopo un carico endovenosa che riproduca gli stessi livelli di glicemia (3). Questo fenomeno è conosciuto come "effetto incretinico" ed è stimato essere causa di circa il 70% della secrezione insulinica dopo un pasto (4). I pazienti con DMT2 presentano una riduzione dell'effetto incretinico (3). I meccanismi molecolari responsabili di questa alterazione non sono noti, così come non si conosce se si tratta di alterazioni trasmesse geneticamente o se secondarie a difetti acquisiti.

L'effetto incretinico è principalmente dovuto a due ormoni, il GLP-1 e il GIP secreti in risposta ai nutrienti del pasto e in grado di potenziare la secrezione insulinica glucosio-indotta (2).

Il GIP è stato il primo ormone di questa classe a essere descritto; è un ormone di 42 aminoacidi rilasciato dalle cellule K dell'intestino, maggiormente presenti nel duodeno (5). Il GLP-1 è un ormone secreto dalle cellule L intestinali, prodotto dal gene del proglucagone tramite l'azione della proconvertasi PC 1/3 (6). I meccanismi che regolano la secrezione di GLP-1 non sono del tutto noti e vengono studiati attivamente in questi anni. Dati presenti in letteratura mostrano come la perdita dell'effetto incretinico in pazienti con diabete potrebbe essere secondaria alle alterazioni glicemiche o all'insulino-resistenza, lasciando quindi presagire che questo fenomeno potrebbe essere reversibile (7). Negli ultimi anni Knop e collaboratori hanno dimo-

FAD ECM "il Diabete"

Questa rassegna fa parte di un **percorso di formazione a distanza** accreditato a livello nazionale e disponibile gratuitamente nell'aula virtuale della SID (<http://sidfad.accmec.org>).

Per partecipare al corso occorre:

1. Leggere la rassegna (disponibile anche on-line)
2. Registrarsi all'aula e iscriversi al corso "il Diabete"
3. Rispondere on-line ai quiz di verifica e compilare il questionario di valutazione dell'evento FAD.

Una volta eseguito con successo il test di valutazione e compilato il questionario di valutazione dell'evento, sarà cura della Segreteria ECM della SID far pervenire l'attestato ECM del corso ai diretti interessati nei tempi e nelle modalità stabiliti dalla regolamentazione vigente.

Per ulteriori informazioni: <http://sidfad.accmec.org>

strato come in soggetti sani, non predisposti al DMT2, un'alterazione dell'effetto incretinico poteva essere rilevata sottoponendo questi pazienti a un breve periodo di ridotta tolleranza al glucosio o anche ricreando uno stato di insulino-resistenza (8, 9). Queste evidenze pongono le basi per lo studio delle cellule L intestinali come possibili target terapeutici e come componenti importanti nella patogenesi del DMT2.

La cellula L intestinale

Le cellule L sono presenti lungo le pareti dell'epitelio intestinale con una densità crescente verso il tratto distale dell'ileo e del colon (10). La collocazione nell'intestino permette a queste cellule di essere in contatto diretto con il lume intestinale (10) e di risentire del passaggio dei nutrienti lungo il tratto gastrointestinale.

Le cellule L fanno parte di un più ampio sistema entero-endocrino capace di secernere molti ormoni, tra cui la colecistochinina, la serotonina e la secretina. Nonostante le cellule endocrine siano state classificate sulla base del rispettivo prodotto ormonale, è ormai evidente che molte cellule sono capaci di secernere più di un ormone. In particolare, le cellule L, oltre al ben noto GLP-1, producono GLP-2 e il peptide YY. In risposta al pasto l'andamento della secrezione del GLP-1 mostra un profilo bifasico: una prima fase precoce che si verifica subito dopo l'ingestione di cibo e che perdura per 15–30 minuti, seguita da una fase ritardata persistente per 1–2 ore (11). Il picco di secrezione precoce sembra essere mediato da stimoli nervosi e in particolare dall'azione del nervo vago, mentre la secrezione tardiva risente direttamente della stimolazione diretta delle cellule L da parte dei nutrienti (12–14).

Inoltre, sebbene la bassa densità di cellule L nei tratti prossimali dell'intestino avesse fatto inizialmente ipotizzare che la fase precoce della secrezione fosse solo indirettamente indotta da segnali nervosi o fattori ormonali, è oggi universalmente riconosciuto che la piccola percentuale di cellule L presenti a livello del duodeno sia sufficiente per provocare il rilascio precoce di GLP-1 in risposta al cibo (15).

L'emivita del GLP-1 attivo in circolo è molto breve (circa 2 minuti) e infatti, una volta secreto, l'ormone viene rapidamente inattivato ad opera delle DPP-4 (16) enzimi presenti sulla superficie delle cellule endoteliali ed epiteliali che attuano lo specifico clivaggio di dipeptidi dalla porzione N-terminale del GLP-1 (17).

Come risultato è stato stimato che solo il 10–15% della forma attiva secreta passa nel sistema circolatorio generale e risulta capace di influenzare gli altri organi. La cellula L intestinale viene attivata dall'aumento delle concentrazioni intra-intestinali di glucosio e di altri nutrienti presenti in un pasto. Il glucosio viene internalizzato dalla cellula, fosforilato ad opera della glucochinasi e metabolizzato nel mitocondrio per la produzione di ATP. Questo meccanismo sembra essere molto simile a quello evidenziato nella β -cellula pancreatica. Una notevole importanza pare rivestire anche una serie di recettori associati a proteine G (GPR), ai quali si legano sostanze come gli acidi grassi liberi (FFA) o gli acidi biliari, entrambi stimolatori fisiologici della secrezione di GLP-1 (18, 19). Sia l'aumento delle concentrazioni intracellulari di glucosio sia l'incremento dei livelli intracellulari di AMP ciclico (cAMP) portano a un aumento delle concentrazioni intracellulari di calcio e alla secrezione di GLP-1. Oltre ai nutrienti come glucosio, aminoacidi e FFA, anche l'insulina sembra capace di stimolare la secrezione di GLP-1 da parte delle cellule L intestinali (20) attraverso l'attivazione del sistema di fosforilazioni a catena iniziate a livello di IRS-1, PI3K e AKT. Il segnale insulinico nelle cellule L intestinali pare svolgere un importante ruolo di modulazione dei segnali che portano alla secrezione del GLP-1. È stato osservato, infatti, che in alcune condizioni sperimentali l'esposizione cronica ad alte dosi di insulina era in grado di indurre insulino-resistenza specifica in una linea cellulare murina (GLUtag), in una linea di cellule L umane (NCI-H716) e in cellule intestinali fetali di ratto. Mediante questo meccanismo era possibile alterare la secrezione di GLP-1 (20).

Una volta rilasciato in risposta al pasto, soprattutto se ricco in carboidrati, il GLP-1 esercita diverse azioni a livello pancreatico: stimola la secrezione di insulina in maniera strettamente dipendente dalle concentrazioni di glucosio (risultando quindi incapace di provocare ipoglicemia), inibisce in modo diretto e indiretto la secrezione di glucagone e favorisce i processi di differenziamento e di proliferazione delle β -cellule pancreatiche (ad oggi questo fenomeno è stato evidenziato in modelli animali e non vi sono dimostrazioni dirette che un simile effetto si manifesti *in vivo* anche nell'uomo) (21).

Il GLP-1 svolge anche una serie di attività a livello extra-pancreatico: rallentamento dello svuotamento gastrico, regolazione dell'appetito, riduzione del peso corporeo (mediata da una diminuzione dell'apporto

calorico e da effetti diretti e indiretti a livello dell'apparato gastrointestinale e del sistema nervoso centrale), vasodilatazione endotelio-mediata e miglioramento della funzione contrattile cardiaca nella cardiopatia (22).

Mentre le cellule L del tratto prossimale dell'intestino sembrano essere maggiormente responsabili dell'effetto incretinico, quelle del tratto distale sembrano invece essere correlate agli effetti su appetito e motilità intestinale.

Caratteristiche e peculiarità di funzione delle cellule L intestinali

Le cellule L intestinali sono del tipo *open-type*, dotate di lunghi e sottili processi citoplasmatici che protrudono verso il lume intestinale (10). Tale particola-

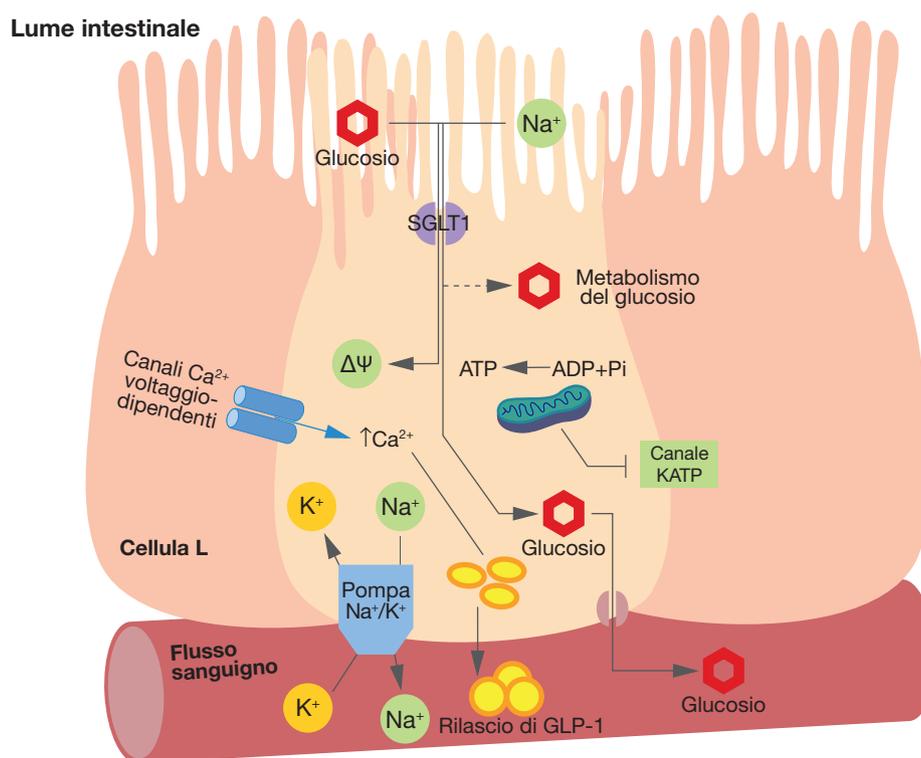
re morfologia permette loro di entrare in contatto diretto con i nutrienti presenti nel lume intestinale.

Evidenze riguardanti la capacità di tali cellule di essere esse stesse "sensibili" ai nutrienti provengono da molteplici studi condotti principalmente su tre linee cellulari: le GLUTag e le STC-1 di origine murina e le NCI-H716 di origine umana.

È ancora oggetto di controversie il sistema in cui gli zuccheri presenti all'interno del lume intestinale provochino la secrezione di GLP-1 da parte delle cellule L (Figura 1). Studi preliminari effettuati sulla linea GLUTag hanno messo in evidenza la capacità del glucosio di determinare eventi elettrofisiologici che causano il rilascio di GLP-1, previo aumento del Ca^{2+} citoplasmatico (19).

Gribble e collaboratori nel 2003 hanno identificato un nuovo meccanismo responsabile del rilevamento del glucosio da parte delle cellule L. In esperimenti condotti sulla linea cellulare GLUTag gli autori hanno avuto

Figura 1 Modello rappresentativo dei sistemi glucosensori nella cellula L intestinale



Il glucosio tramite SGLT1 viene trasportato dalla superficie luminale dell'epitelio intestinale, utilizzando il gradiente di sodio; l'aumento del sodio intracellulare genera una depolarizzazione della membrana e un successivo rilascio di GLP-1. Inoltre il metabolismo glucidico provoca incremento del rapporto ATP/ADP determinando nell'ordine, chiusura dei canali K^+_{ATP} , depolarizzazione della membrana plasmatica, aumento del Ca^{2+} intracellulare, e successiva secrezione dell'ormone

modo di osservare come gli zuccheri inneschino una depolarizzazione della membrana, con successiva secrezione di GLP-1 mediante l'azione elettrogenica del trasportatore sodio-glucosio SGLT (*sodium glucose-linked transporter*)-1 (23).

SGLT1 è il principale trasportatore responsabile dell'assorbimento del glucosio dalla superficie luminale dell'epitelio intestinale e utilizza il gradiente di sodio presente tra l'interno e l'esterno della cellula per spostare Na^+ (secondo gradiente) e glucosio (contro gradiente) all'interno della cellula. L'aumento del sodio intracellulare risulta capace di generare poi una corrente interna sufficiente a provocare una depolarizzazione della membrana, con successivo rilascio dell'ormone (23). Inoltre, l'esistenza di tale fenomeno risulta supportata da altre osservazioni in cui l'utilizzo della fluorizina, noto inibitore dell'assorbimento del glucosio, era in grado di bloccare la secrezione di GLP-1 in presenza di sodio nel comparto luminale (24).

Oltre al co-trasportatore SGLT1, le cellule L possiedono sulla superficie esterna anche canali per il potassio ATP-sensibili (K^+_{ATP}). Sembra che questi canali possano rivestire un ruolo importante per la secrezione del GLP-1, così come per l'insulina nelle β -cellule pancreatiche.

È infatti noto come nelle β -cellule il metabolismo glucidico provochi l'incremento delle concentrazioni di ATP e la caduta del MgADP e che questi due fenomeni determinino, nell'ordine, chiusura dei canali K^+_{ATP} , aumento del Ca^{2+} intracellulare e stimolazione della secrezione insulinica (25). Recenti studi hanno evidenziato livelli di espressione delle subunità Kir6.2 e SUR1, noti recettori per le sulfoniluree, a livello dei canali K^+_{ATP} delle cellule L intestinali. Attività elettriche funzionali dipendenti dai canali K^+_{ATP} sono state inoltre rilevate in cellule L provenienti da colture primarie di colon (19, 26, 27). La presenza di canali K^+_{ATP} a livello delle cellule L intestinali apporterebbe spunti di riflessione sul possibile funzionamento delle cellule L intestinali ed eventuali approcci farmacologici per la modulazione della secrezione di GLP-1. Nonostante le chiare evidenze riguardanti l'esistenza e la funzionalità dei canali K^+_{ATP} nella linea cellulare GLUTag, il ruolo di tali canali nella secrezione di GLP-1 *in vivo* rimane controverso. Deboli sono, infatti, le prove che le sulfoniluree, capaci di stimolare la secrezione insulinica inibendo l'attività dei canali K^+_{ATP} , possano in egual modo scatenare la secrezione di GLP-1 dalle cellule L intestinali.

Invece, sulla base di queste osservazioni risulta possibile ipotizzare che la glucochinasi (GCK) possa pilo-

tare le attività a monte delle vie correlate al metabolismo glucidico all'interno della cellula, come le attività dipendenti dai canali K^+_{ATP} .

Analisi immunoistochimiche e di espressione hanno peraltro confermato la presenza di alti livelli di GCK a livello delle cellule L intestinali.

Inoltre, Murphy e collaboratori hanno constatato come pazienti portatori di mutazioni inattivanti della GCK non esibivano minori livelli di GLP-1 dopo ingestione di glucosio (28).

Queste osservazioni mostrano come la presenza di GCK e dei canali K^+_{ATP} nelle cellule L intestinali non sembrerebbe essere determinante nel causare il picco di secrezione di GLP-1 in risposta al carico di glucosio. Tuttavia, la comprensione della loro funzione, del loro meccanismo di attivazione e del loro contributo specifico nel metabolismo del glucosio potrebbe apportare conoscenze nella fisiopatologia dell'asse delle incretine.

Rivestono invece un ruolo importante per le cellule L intestinali i recettori accoppiati a proteine G presenti sulla superficie di queste cellule. Questi recettori, della famiglia del recettore per il GLP-1, sono considerati componenti importanti delle vie di segnalazione tipiche delle cellule L e in particolar modo sembrano responsabili della risposta regolatoria all'azione di ormoni e neurotrasmettitori, nonché di numerosi metaboliti come gli acidi grassi, gli aminoacidi e alcuni sali biliari.

Le vie di segnalazione a valle di tali recettori comprendono l'attivazione di diverse proteine G, descritte come G_s , G_q e G_i sulla base delle diverse sequenze aminoacidiche della subunità α . Ciascuna di queste proteine è stata dimostrata essere presente in linee cellulari entero-endocrine.

Recettori accoppiati a proteine G_s

È stato ampiamente documentato in letteratura come l'attivazione dei recettori accoppiati a proteine G_s , causando innalzamento di cAMP intracellulare, costituisca un potente stimolo al rilascio di GLP-1 in modelli sia *in vivo* sia *in vitro* (29-31). cAMP, attivando molteplici effettori a valle - e tra questi la proteina chinasi A (PKA) - è in grado di controllare alcuni canali ionici responsabili della secrezione del GLP-1. Inoltre, lo stimolo secretorio di cAMP influenza l'attivazione di potenziali di membrana legati alle vie regolate dal glucosio e dall'insulina (30).

È stato osservato in modelli *in vitro* come l'utilizzo

di attivatori dell'enzima adenilato-ciclastasi (come la forskolina) o di inibitori dell'attività fosfodiesterasica (come l'IBMX) sia capace di aumentare i livelli intracellulari di cAMP e di Ca^{2+} e di modulare la secrezione di GLP-1. cAMP agirebbe dunque di concerto con il glucosio nell'indurre la liberazione di GLP-1 dalle cellule L intestinali (26).

In questa famiglia di recettori bisogna citare in particolare il recettore GPR119. Questo componente è noto per essere attivato da lipidi-amidi ed esperimenti effettuati su topi *knockout* per questo recettore evidenziavano ridotti livelli post-prandiali di GLP-1 (18). Un altro recettore appartenente a questa famiglia è il TGR5, attivabile dal legame con gli acidi biliari. Anche questo recettore sembra avere un ruolo importante nella secrezione di GLP-1 e verrà trattato più avanti nell'ambito delle applicazioni terapeutiche.

Recettori accoppiati a proteine G_q e a proteine G_i

Nonostante la similitudine di struttura, le subunità regolatrici conferiscono a questi recettori funzioni peculiari e risposte diverse agli stimoli presenti nell'intestino. Per quanto riguarda la sub-unità regolatrice G_q i recettori che la possiedono, una volta attivati, inducono attivazione della proteina chinasi C (PKC), con conseguente rilascio di Ca^{2+} dalle riserve intracellulari. Anche questi meccanismi determinano modulazione della secrezione di GLP-1.

Diversi studi hanno evidenziato come la bombesina e il *gastrin-releasing peptide* (GRP), nonché agonisti muscarinici, siano capaci di stimolare il rilascio di GLP-1 mediante vie dipendenti dall'attivazione di recettori accoppiati a queste proteine G (13, 31, 32).

GPR40 e GPR120 costituiscono elementi di questa classe recettoriale. Essi vengono attivati da acidi grassi a catena lunga e sono implicati nel sistema lipido-sensorio delle linee cellulari entero-endocrine (33, 34).

In studi condotti su topi *GPR40-null* sono stati riscontrati valori inappropriatamente bassi di GLP-1 quando sottoposti a una dieta ricca in grassi (34), mentre livelli elevati dell'ormone sono stati rilevati in ratti dopo somministrazione di acido α -linolenico, noto attivatore di GPR120 (35). Molecole come la somatostatina invece, quando legate a tali recettori, attivando le sub-unità G_i risultano in grado di inibire la secrezione di GLP-1 indotta dal cibo (36). Liberata localmente

dalle cellule D intestinali, è possibile che la somatostatina fornisca uno strumento di controllo del rilascio di GLP-1 e della secrezione coordinata in funzione degli elementi presenti nel cibo.

Cellule L come target di terapia

Negli ultimi anni l'interesse scientifico e terapeutico per la gestione del DMT2 è stato rivolto verso lo sviluppo di terapie mirate a incrementare i livelli di incretine plasmatiche, cercando di ripristinare le azioni di questi ormoni a livello dell'isola pancreatica e dell'organismo in generale. La migliore comprensione delle azioni fisiologiche delle incretine e la documentata azione anche a livello extra-pancreatico hanno aperto nuovi campi di ricerca non solo per il DMT2, ma anche per il diabete mellito tipo 1 (DMT1) e per le complicanze ad essi correlate.

È noto che l'effetto incretinico, responsabile di più del 50% del rilascio di insulina in risposta al glucosio e al cibo, risulta essere significativamente ridotto in pazienti con DMT2 (3) e la causa di tale alterazione non è del tutto conosciuta. Non è noto, inoltre, se la perdita di tale fenomeno sia intrinseca al diabete o se condizioni associate alla patologia, tra cui l'obesità *per se*, possano determinare il malfunzionamento delle cellule L intestinali (26). È risaputo tuttavia che le cellule L intestinali nel diabete sono disfunzionali e che la produzione di GLP-1 è alterata (37).

Le terapie attualmente in uso non mirano al ripristino della funzione delle cellule L e a un aumento della loro produzione di GLP-1 ma, piuttosto, tramite un trattamento con farmaci analoghi/agonisti del GLP-1 o inibitori delle DPP-4 si ottengono concentrazioni plasmatiche di GLP-1 ben superiori e per un periodo più prolungato rispetto a quelle fisiologiche (38).

La ricerca di potenziali strategie per il trattamento del DMT2 potrebbe avere invece come target terapeutico le cellule L intestinali al fine di modularne intrinsecamente la risposta secretoria mirando, quindi, alla produzione endogena, piuttosto che al ripristino dei livelli circolanti.

Perché questo potrebbe essere un vantaggio? I sostenitori di questa strategia puntano la loro attenzione sul fatto che in fisiologia il GLP-1 viene secreto e degradato velocemente vicino al luogo di produzione. Le concentrazioni locali sono molto più alte di quelle periferiche e questo potrebbe essere molto importante per il funzionamento fisiologico dell'ormone. Il GLP-1 pro-

dotto localmente potrebbe agire su recettori presenti nelle terminazioni neurali localizzate in vicinanza delle cellule L e questa azione potrebbe essere cruciale per ottenere tutti gli effetti biologici dell'ormone.

Tale ipotesi di intervento è oggi supportata da diversi studi che riportano come con la produzione di GLP-1 endogeno si possa ricavare un maggiore beneficio rispetto alle terapie "sostitutive" poiché potenzialmente più fisiologica (38).

Inoltre, sembra che proprio l'incremento del rilascio fisiologico di GLP-1 sia alla base del successo di certe forme di chirurgia bariatrica attuate in soggetti diabetici nei quali sono stati riscontrati un migliore compenso glicemico, nonché una riduzione dell'appetito e del peso corporeo (39).

È noto come la rapida liberazione di GLP-1 da parte delle cellule L dopo ingestione di cibo può essere regolata sia dall'innervazione afferente dal nervo vago (12, 13) sia dai nutrienti provenienti dalla dieta. Inoltre, ulteriori studi hanno indicato come possibili siti d'interesse alcuni recettori "orfani" associati alle proteine G. Tali recettori, orfani di funzioni note piuttosto che di ligandi naturali, hanno aperto nuovi settori di ricerca nel campo della fisiologia delle cellule L intestinali. Per esempio, negli ultimi anni si è evidenziato che il recettore TGR5, attivato fisiologicamente dagli acidi biliari, è stato capace di migliorare la sensibilità all'insulina (40) e i livelli di glicemia post-prandiale (41). Si è dimostrato che un altro recettore, il GPR119, è stato in grado di incrementare i livelli plasmatici di GLP-1 e di aumentare i livelli di insulina circolanti (42). GPR40 invece, grazie al legame con acidi grassi liberi, risulta capace di modulare il rilascio di incretine.

Considerando che questi recettori sono presenti a livello delle cellule L intestinali, è immaginabile come essi stessi possano rappresentare aree di interesse per lo studio della fisiopatologia del DMT2 e come le cellule L intestinali possano costituire target di terapie mirate non solo per l'aumento dei livelli di incretine circolanti, ma anche come possibili campi di intervento farmacologico per il ripristino disfunzionale in corso di diabete.

Acidi biliari e TGR5

TGR5 (conosciuto anche come GPR131, M-BAR o GPBAR1), recettore di membrana mediatore del segnale cellulare degli acidi biliari (BA), è stato identificato recentemente come possibile nuovo target terapeutico

per la regolazione dell'omeostasi del glucosio e del metabolismo energetico.

TGR5 appartiene alla superfamiglia delle GPCR simili alla rodopsina ed è in grado di trasdurre il segnale tramite attivazione di una proteina G. In letteratura sono stati individuati omologhi di TGR5 in diverse specie, a partire dai vertebrati acquatici; questo indica un ruolo importante di tale recettore poiché mantenuto altamente conservato durante l'evoluzione (43). TGR5 sembra inoltre essere espresso ubiquitariamente, sebbene in quantità differente, nell'intestino, nel fegato, nel tessuto adiposo bruno e nella milza (44).

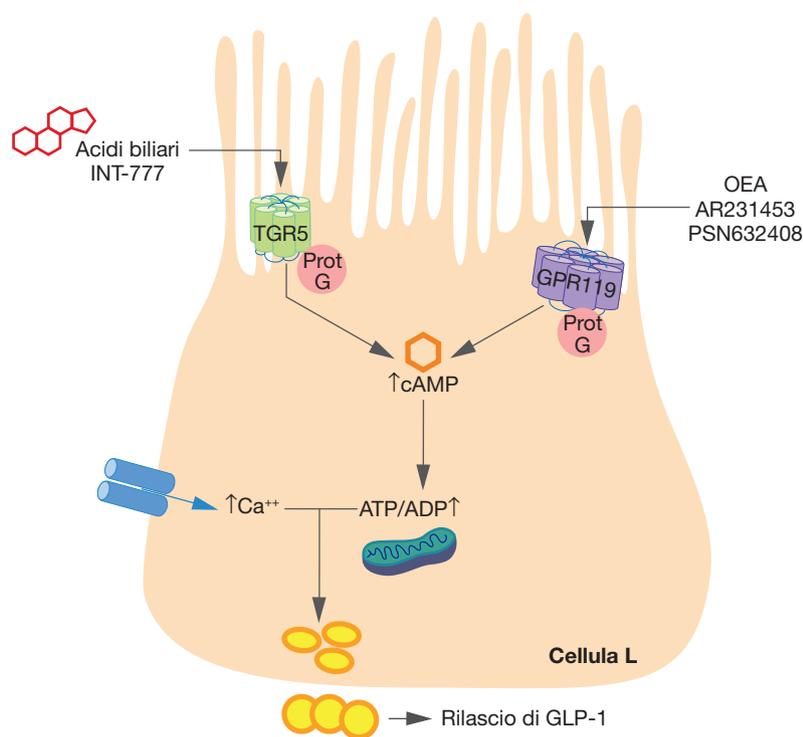
Come ampiamente discusso in letteratura, l'attivazione di TGR5 avviene prevalentemente ad opera degli acidi biliari, molecole anfipatiche che facilitano l'assorbimento dei lipidi anche nell'uomo. Il livello di espressione del recettore varia nei diversi tessuti e riveste importanti funzioni non solo per il metabolismo e la sintesi degli acidi biliari, ma anche perché capace di regolare il metabolismo lipidico, l'omeostasi del glucosio e il consumo energetico (45).

Studi *in vitro* hanno dimostrato che l'attivazione di TGR5, tramite attivazione di una proteina G, causa aumento intracellulare di cAMP (46) con conseguente incremento dei livelli intracellulari di ATP/ADP e di Ca²⁺ intracellulare e successiva induzione del rilascio del GLP-1 (Figura 2) (47).

Queste osservazioni potrebbero spiegare alcuni degli effetti dovuti all'aumento dei livelli di BA circolanti, come il miglioramento della sensibilità all'insulina (40) e il controllo glicemico (41).

Esistono alcuni studi che hanno valutato l'azione e la funzione di TGR5 in modelli animali. Per esempio, nel 2009 Thomas e collaboratori (47) hanno effettuato esperimenti di perdita e acquisizione della funzione di TGR5 in modelli murini, sia attraverso trattamento farmacologico sia tramite l'induzione di mutazioni genetiche, al fine di comprendere meglio la funzione fisiologica di tale recettore e il legame con la secrezione di GLP-1. Questi studi hanno mostrato come il segnale mediato da TGR5 sia in grado di modulare il rilascio intestinale di GLP-1, migliorando in questi topi obesi sia la tolleranza ai carboidrati sia la funzionalità epatica e pancreatica (47).

Gli stessi autori hanno inoltre dimostrato come INT-777, uno specifico agonista sintetico di TGR5, era capace di indurre il rilascio di GLP-1 da parte delle cellule entero-endocrine mediante l'incremento del rapporto ATP/ADP intracellulare e la mobilitazione del Ca²⁺ intracellulare (Figura 2) (47).

Figura 2 **Modello rappresentativo del rilascio di GLP-1 mediato dall'attivazione dei recettori GPR**

L'attivazione del recettore TGR5 (ad opera degli acidi biliari, o di analoghi (INT-777) e del recettore GPR119 (ad opera di OEA o di agonisti) induce l'attivazione di proteine G e il successivo incremento dei livelli di cAMP; questo aumento determina l'incremento del rapporto ATP/ADP intracellulare, l'aumento del Ca²⁺ intracellulare e la successiva induzione del rilascio del GLP-1

Questi risultati mostrano per la prima volta che il segnale mediato da TGR5 gioca un ruolo critico nella regolazione della secrezione intestinale di GLP-1 e suggeriscono come gli acidi biliari e questo recettore possano rappresentare un possibile target farmacologico per le cellule L intestinali. Quindi, gli acidi biliari e i recettori ad essi correlati costituiscono un nuovo eventuale campo di studio per la comprensione della cellula L intestinale. Possibili derivati degli acidi biliari (agonisti e/o derivati sintetici) potrebbero essere nuovi possibili interventi farmacologici dei prossimi anni.

Agonisti di GPR119

Il recettore GPR119 è un altro mediatore appartenente alla classe di recettori associati a proteine G, attivato da nutrienti presenti nella dieta e in particolare da lipidi. Fredriksson nel 2003 lo individuava come appartenente alla grande famiglia dei "recettori orfani" (48).

Successivamente Soga e collaboratori ne identificavano la presenza nelle cellule β -pancreatiche (49) e in seguito Chu e collaboratori (50) riscontravano l'espressione anche a livello delle cellule L intestinali.

Oggi è noto che l'oleoiletanolamide (OEA), derivato lipidico dell'acido oleico, rappresenta un ligando specifico per GPR119 ed è stato associato alla regolazione della sazietà (51).

Lauffer nel 2009 (42) dimostrò per la prima volta come l'OEA fosse in grado di stimolare la secrezione di GLP-1 da parte delle cellule L intestinali in linee cellulari sia umane sia murine, oltre che in cellule in coltura primaria. Inoltre, attraverso la somministrazione diretta a livello del lume intestinale di ratto, è stata confermata l'azione secretagogica dell'OEA anche *in vivo*. Questi dati, uniti all'analisi contemporanea delle cellule β -pancreatiche, mostravano come la somministrazione per via orale di tale derivato risultava capace da sola di indurre la secrezione di GLP-1 senza influenzare il rilascio di insulina.

Come è noto, le cellule L secernono GLP-1 come risposta alla diretta stimolazione da parte dei grassi (14, 52). In particolare, gli acidi grassi monoinsaturi a catena lunga, come ad esempio l'acido oleico, costituiscono i principali stimolatori della secrezione di GLP-1, sia *in vivo* sia *in vitro*, agendo attraverso meccanismi che richiedono la presenza della proteina chinasi C (PKC) ζ (14).

Inoltre, altri lavori hanno dimostrato come l'utilizzo di agonisti di GPR119 (AR231453, PSN632408) sia in grado di aumentare la tolleranza al glucosio per via orale, inducendo un significativo incremento di cAMP e aumentando quindi i livelli di GLP-1 attivo (42, 50).

Questi dati suggeriscono che anche GPR119 rappresenta quindi un possibile target terapeutico per la modulazione funzionale delle cellule L intestinali.

Metformina

In letteratura è stato riportato come la metformina sia capace di provocare la liberazione di GLP-1 in roditori normali, diabetici e con assenza di DPP-4 (53, 54), così come nell'uomo con o senza DMT2 (55). La metformina, quindi, potrebbe costituire anche un possibile elemento di modulazione delle cellule L intestinali.

I dati disponibili hanno mostrato che *in vivo* la metformina inibisce l'attività delle DPP-4 in modelli sia umani sia murini, portando alla conclusione che tale farmaco agisce in maniera DPP-4-dipendente (56). Inoltre, Mulherin e collaboratori (57) hanno anche dimostrato come la somministrazione di metformina fosse in grado di indurre il rilascio di GLP-1 anche in seguito a trattamento con inibitori delle DPP-4. Secondo le ipotesi di questi autori, l'azione della metformina sul rilascio di GLP-1 avviene mediante l'attivazione di recettori muscarinici di tipo M3 presenti a livello delle cellule L e anche mediante recettori GPRC associati a proteine di tipo G. Tutto ciò solleva possibili nuovi campi di intervento per il trattamento delle disfunzioni delle cellule L e nuove possibili evidenze positive della metformina per la cura del diabete.

Conclusioni

Negli ultimi anni l'avvento delle incretine nella pratica clinica ha modificato le strategie terapeutiche per la gestione del DMT2 e la migliore comprensione del ruolo di GLP-1, GIP e di altri ormoni gastro-intestinali

ha aumentato le nostre conoscenze sulle basi fisiopatologiche del diabete. Il successo di questa classe di farmaci è decretato dal sempre maggior numero di pazienti che ricorrono a queste terapie e dal numero crescente di nuovi farmaci di questa classe che le aziende farmaceutiche continuano a sviluppare. D'altra parte, però, il successo di questi farmaci non deve distrarci dall'osservare criticamente alcuni limiti nel loro razionale di impiego: ad esempio, i livelli certamente non fisiologici di GLP-1 circolante che accompagnano queste terapie, in particolare quelle con analoghi o agonisti recettoriali. Con questi metodi di somministrazione si ottengono livelli sovralfisiologici di GLP-1 che non riproducono la normale fisiologia del sistema e non tengono conto, inoltre, della produzione locale di GLP-1 e della funzione fisiologica della cellula L intestinale.

La comprensione dei meccanismi molecolari di funzione delle cellule L intestinali potrebbe invece aprire orizzonti del tutto nuovi. Tanto più la ricerca scientifica dimostrerà l'importanza della produzione locale di GLP-1 e delle sue azioni paracrine, tanto più si renderà necessario considerare la cellula L intestinale un'importante e determinante target per una terapia mirata a ripristinare pattern secretori alterati nella malattia diabetica.

Bibliografia

1. Buffa R, Capella C, Fontana P, et al. Types of endocrine cells in the human colon and rectum. *Cell and tissue research* 192: 227-240, 1978.
2. Kreyman B, Williams G, Ghatei MA, Bloom SR. Glucagon-like peptide-1 7-36: A physiological incretin in man. *Lancet* ii: 1300-1304, 1987.
3. Nauck M, Stockmann F, Ebert R, Creutzfeldt W. Reduced incretin effect in type 2 (non-insulin-dependent) diabetes. *Diabetologia* 29: 46-52, 1986.
4. Baggio LL, Drucker DJ. Biology of incretins: GLP-1 and GIP. *Gastroenterology* 2007, 132: 2131-2157.
5. Buffa R, Polak JM, Pearse AG, et al. Identification of the intestinal cell storing gastric inhibitory peptide. *Histochemistry* 43: 249-255, 1975.
6. Ugleholdt R, Zhu X, Deacon CF, et al. Impaired intestinal proglucagon processing in mice lacking prohormone convertase 1. *Endocrinology* 145: 1349-1355, 2004.
7. Knop FK, Vilsboll T, Hojberg PV, et al. Reduced incretin effect in type 2 diabetes: Cause or consequence of the diabetic state? *Diabetes* 56: 1951-1959, 2007.
8. Hansen KB, Vilsboll T, Bagger JI, et al. Increased postprandial GIP and glucagon responses, but unaltered GLP-1 response after intervention with steroid hormone, relative physical inactivity,

- and high-calorie diet in healthy subjects. *J Clin Endocrinol Metab* 96: 447–453, 2011.
9. Hansen KB, Vilsboll T, Bagger JI, et al. Reduced glucose tolerance and insulin resistance induced by steroid treatment, relative physical inactivity, and high-calorie diet impairs the incretin effect in healthy subjects. *J Clin Endocrinol Metab* 95: 3309–3317, 2010.
 10. Eissele R, Goke R, Willemer S, et al. Glucagon-like peptide-1 cells in the gastrointestinal tract and pancreas of rat, pig and man. *Eur J Clin Invest* 22: 283–291, 1992.
 11. Nauck MA, Vardarli I, Deacon CF, et al. Secretion of glucagon-like peptide-1 (GLP-1) in type 2 diabetes: What is up, what is down? *Diabetologia* 54: 10–18, 2011.
 12. Rocca AS, Brubaker PL. Role of the vagus nerve in mediating proximal nutrient-induced glucagon-like peptide-1 secretion. *Endocrinology* 140: 1687–1694, 1999.
 13. Anini Y, Hansotia T, Brubaker PL. Muscarinic receptors control postprandial release of glucagon-like peptide-1: In vivo and in vitro studies in rats. *Endocrinology* 143: 2420–2426, 2002.
 14. Iakoubov R, Izzo A, Yeung A, et al. Protein kinase Czeta is required for oleic acid-induced secretion of glucagon-like peptide-1 by intestinal endocrine L cells. *Endocrinology* 148: 1089–1098, 2007.
 15. Theodorakis MJ, Carlson O, Michopoulos S, et al. Human duodenal enteroendocrine cells: Source of both incretin peptides, GLP-1 and GIP. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 290: E550–E559, 2006.
 16. Deacon CF, Nauck MA, Toft-Nielsen M, et al. Both subcutaneously and intravenously administered glucagon-like peptide I are rapidly degraded from the NH₂-terminus in type II diabetic patients and in healthy subjects. *Diabetes* 44: 1126–1131, 1995.
 17. Hansen L, Deacon CF, Orskov C, Holst JJ. Glucagon-like peptide-1-(7-36)amide is transformed to glucagon-like peptide-1-(9-36)amide by dipeptidyl peptidase IV in the capillaries supplying the L cells of the porcine intestine. *Endocrinology* 140: 5356–5363, 1999.
 18. Parker HE, Reimann F, Gribble FM. Molecular mechanisms underlying nutrient-stimulated incretin secretion. *Expert Rev Mol Med* 12: e1, 2010.
 19. Reimann F, Gribble FM. Glucose-sensing in glucagon-like peptide-1-secreting cells. *Diabetes* 51: 2757–2763, 2002.
 20. Lim GE, Huang GJ, Flora N, et al. Insulin regulates glucagon-like peptide-1 secretion from the enteroendocrine L cell. *Endocrinology* 150: 580–591, 2009.
 21. Xu G, Kaneto H, Lopez-Avalos MD, et al. GLP-1/exendin-4 facilitates beta-cell neogenesis in rat and human pancreatic ducts. *Diabetes Res Clin Pract* 73: 107–110, 2006.
 22. McIntosh CH, Widenmaier S, Kim SJ. Pleiotropic actions of the incretin hormones. *Vitam Horm* 84: 21–79, 2010.
 23. Gribble FM, Williams L, Simpson AK, Reimann F. A novel glucose-sensing mechanism contributing to glucagon-like peptide-1 secretion from the GLUTag cell line. *Diabetes* 52: 1147–1154, 2003.
 24. Sykes S, Morgan LM, English J, Marks V. Evidence for preferential stimulation of gastric inhibitory polypeptide secretion in the rat by actively transported carbohydrates and their analogues. *J Endocrinol* 85: 201–207, 1980.
 25. Rorsman P. The pancreatic beta-cell as a fuel sensor: An electrophysiologist's viewpoint. *Diabetologia* 40: 487–495, 1997.
 26. Reimann F, Habib AM, Tolhurst G, et al. Glucose sensing in L cells: A primary cell study. *Cell Metab* 8: 532–539, 2008.
 27. Nielsen LB, Ploug KB, Swift P, et al. Co-localisation of the Kir6.2/SUR1 channel complex with glucagon-like peptide-1 and glucose-dependent insulinotropic polypeptide expression in human ileal cells and implications for glycaemic control in new onset type 1 diabetes. *Eur J Endocrinol* 156: 663–671.
 28. Miki T, Minami K, Shinozaki H, et al. Distinct effects of glucose-dependent insulinotropic polypeptide and glucagon-like peptide-1 on insulin secretion and gut motility. *Diabetes* 54: 1056–1063, 2005.
 29. Reimer RA, Darimont C, Gremlich S, et al. A human cellular model for studying the regulation of glucagon-like peptide-1 secretion. *Endocrinology* 142: 4522–4528, 2001.
 30. Simpson AK, Ward PS, Wong KY, et al. Cyclic AMP triggers glucagon-like peptide-1 secretion from the GLUTag enteroendocrine cell line. *Diabetologia* 50: 2181–2189, 2007.
 31. Brubaker PL. Control of glucagon-like immunoreactive peptide secretion from fetal rat intestinal cultures. *Endocrinology* 123: 220–226, 1988.
 32. Roberge JN, Gronau KA, Brubaker PL. Gastrin-releasing peptide is a novel mediator of proximal nutrient-induced proglucagon-derived peptide secretion from the distal gut. *Endocrinology* 1996, 137: 2383–2388.
 33. Hirasawa A, Tsumaya K, Awaji T, et al. Free fatty acids regulate gut incretin glucagon-like peptide-1 secretion through GPR120. *Nature Medicine* 11: 90–94, 2005.
 34. Edfalk S, Steneberg P, Edlund H. Gpr40 is expressed in enteroendocrine cells and mediates free fatty acid stimulation of incretin secretion. *Diabetes* 57: 2280–2287, 2008.
 35. Tanaka T, Yano T, Adachi T, et al. Cloning and characterization of the rat free fatty acid receptor GPR120: In vivo effect of the natural ligand on GLP-1 secretion and proliferation of pancreatic beta cells. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* 377: 515–522, 2008.
 36. Hansen L, Hartmann B, Bisgaard T, et al. Somatostatin restrains the secretion of glucagon-like peptide-1 and -2 from isolated perfused porcine ileum. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 278: E1010–E1018, 2000.
 37. Xu G, Kaneto H, Laybutt DR, et al. Downregulation of GLP-1 and GIP receptor expression by hyperglycemia: Possible contribution to impaired incretin effects in diabetes. *Diabetes* 56: 1551–1558, 2007.
 38. Holst JJ, Deacon CF. Glucagon-like peptide-1 mediates the therapeutic actions of DPP-IV inhibitors. *Diabetologia* 48: 612–615, 2005.
 39. Rodieux F, Giusti V, D'Alessio DA, et al. Effects of gastric bypass and gastric banding on glucose kinetics and gut hormone release. *Obesity (Silver Spring)* 16: 298–305, 2008.
 40. Shaham O, Wei R, Wang TJ, et al. Metabolic profiling of the human response to a glucose challenge reveals distinct axes of insulin sensitivity. *Mol Syst Biol* 4: 214, 2008.
 41. Patti ME, Houten SM, Bianco AC, et al. Serum bile acids are higher in humans with prior gastric bypass: Potential contribution to improved glucose and lipid metabolism. *Obesity (Silver Spring)* 17: 1671–1677, 2009.
 42. Lauffer LM, Iakoubov R, Brubaker PL. GPR119 is essential for oleoylethanolamide-induced glucagon-like peptide-1 secretion

- from the intestinal enteroendocrine L-cell. *Diabetes* 58: 1058–1066, 2009.
43. Chen X, Lou G, Meng Z, Huang W. TGR5: A novel target for weight maintenance and glucose metabolism. *Exp Diabetes Res* 2011: 853501, 2011.
 44. Maruyama T, Miyamoto Y, Nakamura T, et al. Identification of membrane-type receptor for bile acids (M-BAR). *Biochem Biophys Res Commun* 298: 714–719, 2002.
 45. Pols TW, Noriega LG, Nomura M, et al. The bile acid membrane receptor TGR5 as an emerging target in metabolism and inflammation. *J Hepatol* 54: 1263–1272, 2011.
 46. le Roux CW, Aylwin SJ, Batterham RL, et al. Gut hormone profiles following bariatric surgery favor an anorectic state, facilitate weight loss, and improve metabolic parameters. *Ann Surg* 243: 108–114, 2006.
 47. Thomas C, Gioiello A, Noriega L, et al. TGR5-mediated bile acid sensing controls glucose homeostasis. *Cell Metab* 10: 167–177, 2009.
 48. Fredriksson R, Hoglund PJ, Gloriam DE, et al. Seven evolutionarily conserved human rhodopsin G protein-coupled receptors lacking close relatives. *FEBS Lett* 554: 381–388, 2003.
 49. Soga T, Ohishi T, Matsui T, et al. Lysophosphatidylcholine enhances glucose-dependent insulin secretion via an orphan G-protein-coupled receptor. *Biochem Biophys Res Commun* 326: 744–751, 2005.
 50. Chu ZL, Carroll C, Alfonso J, et al. A role for intestinal endocrine cell-expressed G protein-coupled receptor 119 in glycemic control by enhancing glucagon-like peptide-1 and glucose-dependent insulinotropic peptide release. *Endocrinology* 149: 2038–2047, 2008.
 51. Astarita G, Di Giacomo B, Gaetani S, et al. Pharmacological characterization of hydrolysis-resistant analogs of oleoylethanolamide with potent anorexiatic properties. *J Pharmacol Exp Ther* 318: 563–570, 2006.
 52. Rocca AS, LaGreca J, Kalitsky J, Brubaker PL. Monounsaturated fatty acid diets improve glycemic tolerance through increased secretion of glucagon-like peptide-1. *Endocrinology* 142: 1148–1155, 2001.
 53. Maida A, Lamont BJ, Cao X, Drucker DJ. Metformin regulates the incretin receptor axis via a pathway dependent on peroxisome proliferator-activated receptor-alpha in mice. *Diabetologia* 54: 339–349, 2011.
 54. Yasuda N, Inoue T, Nagakura T, et al. Enhanced secretion of glucagon-like peptide 1 by biguanide compounds. *Biochem Biophys Res Commun* 298: 779–784, 2002.
 55. Mannucci E, Tesi F, Bardini G, et al. Effects of metformin on glucagon-like peptide-1 levels in obese patients with and without Type 2 diabetes. *Diabetes Nutr Metab* 17: 336–342, 2004.
 56. Lindsay JR, Duffy NA, McKillop AM, et al. Inhibition of dipeptidyl peptidase IV activity by oral metformin in Type 2 diabetes. *Diabet Med* 22: 654–657, 2005.
 57. Mulherin AJ, Oh AH, Kim H, et al. Mechanisms underlying metformin-induced secretion of glucagon-like Peptide-1 from the intestinal L cell. *Endocrinology* 152: 4610–4619, 2011.

