



UNIVERSITÀ POLITECNICA DELLE MARCHE
FACOLTÀ DI MEDICINA E CHIRURGIA

Corso di Laurea in Tecniche Sanitarie di Laboratorio
Biomedico

**EFFETTO DELL'IPERGLICEMIA SULLA
POLARIZZAZIONE DEL FENOTIPO DEI
MACROFAGI**

Relatore: Chiar.ma

**Prof.ssa OLIVIERI
FABIOLA**

Tesi di Laurea di:

LEONI GIULIA

Correlatore: Dott.ssa

MATACCHIONE GIULIA

A.A. 2018/2019

INDICE

INTRODUZIONE	3
1.1.Diabete	3
1.2.L'insulina	4
1.3.Il Glucagone.....	7
1.4.Diabete mellito di tipo 2	8
2.1.Infiammazione	10
2.2.Mediatori dell'infiammazione	12
2.2.1.Citochine pro-infiammatorie.....	13
2.2.2.Citochine anti-infiammatorie	17
2.3.Chemochine	19
2.4.La senescenza cellulare.....	20
2.5.Inflamm-aging.....	25
2.6.Legame tra diabete e senescenza cellulare.....	29
SCOPO DELLA TESI	34
MATERIALI E METODI	35
1.Modelli cellulari.....	35
2.Saggio β -galattosidasi	36
3.Analisi lunghezza telomeri	37
4.Estrazione RNA	39
5.Retrotrascrizione microRNA(miRNA).....	41
6.Real-Time PCR.....	43
7.Analisi espressione RNA messaggeri	46
8.Western Blot	48
8.1.Estrazione proteine	48
8.2.Quantizzazione proteine	50
8.3.Elettroforesi su gel di poliacrilammide	51
8.4.Trasferimento su membrana di nitrocellulosa(trasferimento semidry)	54
8.5.Rilevazione proteine	55
8.6.Visualizzazione membrana.....	56
RISULTATI	57
1.Differenziamento delle cellule THP-1 in macrofagi.....	57

2. Analisi del fenotipo dei macrofagi.....	58
3. Trattamento dei macrofagi con iperglicemia	60
4. Valutazione della senescenza sui macrofagi.....	61
5. Analisi del fenotipo dei macrofagi indotti a senescenza con iperglicemia(HgSM).....	63
6. Analisi del Western Blot.....	65
CONCLUSIONI	67
BIBLIOGRAFIA	69

INTRODUZIONE

1.1.Diabete

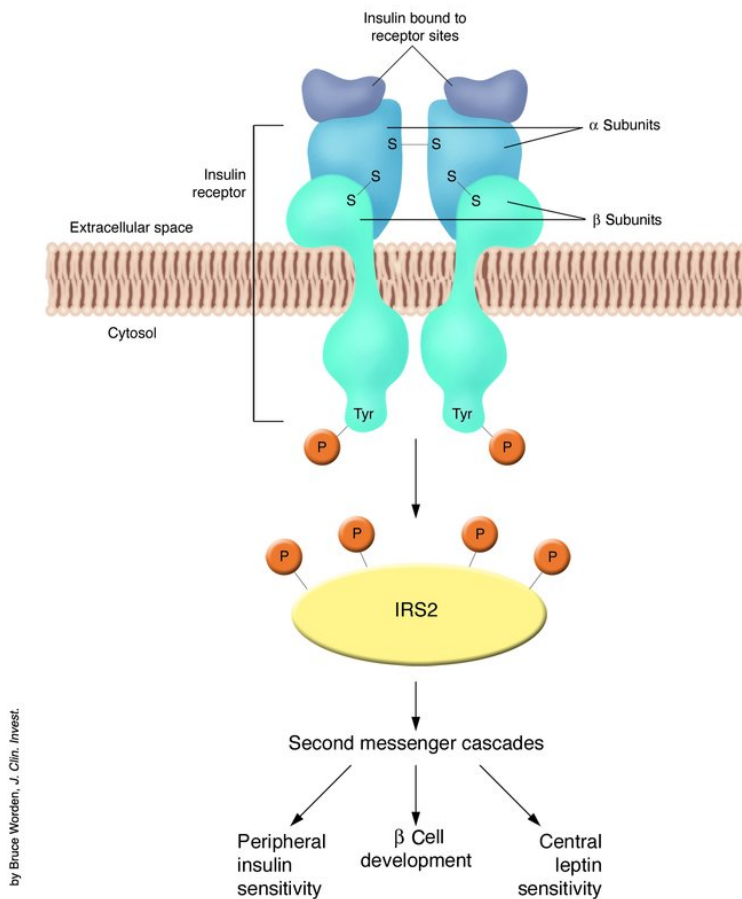
Sotto il termine di diabete mellito (DM) sono comprese diverse malattie aventi tutte come comune denominatore l'iperglicemia persistente a digiuno, cioè l'aumento della concentrazione ematica di glucosio, associata a poliuria (emissione di una maggiore quantità di urina) ed a glicosuria (presenza di glucosio nell'urina) quando la glicemia supera il valore di 180mg/dl.

Le due forme principali di diabete mellito sono:

- Il diabete mellito di tipo 1, definito anche insulino-dipendente (IDDM=Insulin Dependent Diabetes Mellitus). In passato veniva chiamato anche diabete giovanile a causa del suo esordio in età precoce. Si tratta di una patologia autoimmune, con distruzione delle cellule produttrici di insulina.
- Il diabete mellito di tipo 2, definito anche insulino-indipendente (NIDDM=Non Insulin Dependent Diabetes Mellitus). Questa forma di diabete esordisce in genere in età adulta; è causato da insulino-resistenza, ossia da alterazioni della trasduzione del segnale insulinico.

Il mantenimento della glicemia entro i limiti fisiologici di 70-100 mg/dl è regolato da due ormoni pancreatici: l'insulina e il glucagone(1).

Una volta secreta nel sangue l'insulina agisce sulla maggior parte delle cellule dell'organismo e in particolare a livello di epatociti, di cellule del muscolo scheletrico e di adipociti, grazie al suo legame con specifici recettori tirosinchinasici transmembrana. Il recettore dell'insulina è una glicoproteina, costituita da due sub-unità α e da due sub-unità β , unite da ponti disolfuro a formare un tetramero. Le sub-unità α sono localizzate all'esterno della cellula, sono ricche in cisteina e contengono nell'estremità amino-terminale il dominio che lega l'insulina. Le sub-unità β attraversano a tutto spessore la membrana plasmatica della cellula, poiché sono delle proteine integrali, e finiscono con l'estremità carbossi-terminale nel citoplasma(2)(fig.2).



by Bruce Worden, J. Clin. Invest.

Figura 2. Struttura del recettore dell'insulina e suo funzionamento. L'insulina quando si lega al suo recettore provoca l'attivazione dei residui tirosin-chinasici localizzati nella sub-unità β del recettore; l'autofosforilazione di questi residui provoca a sua volta la fosforilazione delle IRSs, una famiglia di proteine, di cui fa parte anche IRS2, che fungono da substrato per il recettore dell'insulina e la cui fosforilazione innesca delle cascate di secondi messaggeri che controllano la sensibilità dell'insulina a livello dei tessuti periferici dell'organismo, la crescita delle cellule β del pancreas e la sensibilità alla leptina a livello centrale(3).

La capacità dell'insulina di regolare i livelli di glicemia nel nostro organismo è dovuta all'attivazione di molteplici segnali all'interno delle cellule, in particolar modo in quelle adipose e del muscolo scheletrico. L'insulina si lega al suo recettore e attiva un primo segnale, responsabile della traslocazione dei trasportatori del glucosio (GLUT) sulla membrana plasmatica. Una volta posizionati, questi trasportatori costituiscono dei veri e propri canali, i quali consentono l'ingresso del glucosio nella cellula. Successivamente l'insulina attiva un secondo segnale, che porta alla trasformazione del glucosio in glicogeno attraverso l'azione di diversi enzimi. Infine l'ormone attiva un terzo segnale che regola gli effetti della trascrizione genica e i livelli degli RNA messengeri dei GLUT, influenzando la loro biosintesi. I principali mediatori di queste cascate intracellulari innescate dall'insulina sono la MAPK (Mitogen-Activated Protein Kinase) e la PI3K (Fosfoinositide 3-chinasi)(4)(5).

La maggior parte delle cellule del nostro organismo sono insulino-dipendenti, ovvero necessitano della presenza dell'insulina per far sì che il glucosio attraversi la loro membrana plasmatica; fanno eccezione le emazie ed i neuroni, i quali internalizzano il glucosio indipendentemente dalla presenza o meno dell'insulina e per questo vengono chiamati insulino-indipendenti(1).

Gli effetti principali dell'insulina a livello del metabolismo glucidico, lipidico e proteico sono:

- stimolazione del passaggio del glucosio dal sangue alle cellule insulino-dipendenti , con conseguente riduzione della glicemia
- stimolazione degli epatociti e delle cellule muscolari alla sintesi di glicogeno(glicogenogenesi) ed alla conservazione di quest'ultimo, il quale funge da deposito da cui l'organismo ricava energia in caso di necessità
- inibizione della scissione di glicogeno in monomeri di glucosio (glicogenolisi)
- stimolazione degli epatociti alla lipogenesi, dal glucosio ottengo acidi grassi, e del trasporto degli acidi grassi sotto forma di trigliceridi negli adipociti, che li immagazzinano

- inibizione della neoglicogenesi, ovvero della formazione di glucosio a partire da amminoacidi glicogenetici e da lipidi
- stimolazione della sintesi di acidi grassi e del deposito dei lipidi nelle cellule adipose
- riduzione nell'utilizzo dei grassi; al loro posto si utilizza il glucosio
- stimolazione del fegato alla produzione di trigliceridi
- inibizione della lipolisi (scissione dei trigliceridi in acidi grassi liberi e glicerolo) e della chetogenesi (formazione dei corpi chetonici a partire dall'acetil-coenzima A)
- aumento della permeabilità cellulare a diversi amminoacidi e ioni
- stimolazione della sintesi proteica e arricchimento della riserva cellulare in amminoacidi a causa dell'inibizione della proteolisi (catabolismo proteico)(1).

1.3. Il Glucagone

Il glucagone è un ormone pancreatico, secreto dalle cellule α delle isole di Langerhans. Quest'ormone è un polipeptide con peso molecolare di 3485 Da, la cui secrezione è inibita dal glucosio e stimolata dagli amminoacidi glicogenetici. Gli effetti del glucagone sono iperglicemizzanti ed in contrasto con quelli dell'insulina. Il glucagone, infatti, stimola la glicogenolisi, la neoglicogenesi, la lipolisi e la gluconeogenesi, favorendo il rilascio di glucosio nel sangue(1).

1.4. Diabete mellito di tipo 2

Il diabete mellito di tipo 2 è una sindrome eterogenea caratterizzata da una disfunzione delle cellule β delle isole di Langerhans del pancreas e da una riduzione della sensibilità all'insulina da parte dei tessuti insulino-dipendenti, quest'ultimo fenomeno prende il nome di insulino-resistenza. L'insulino-resistenza è l'incapacità dell'insulina di stimolare l'assorbimento del glucosio da parte delle cellule insulino-dipendenti. Inizialmente il nostro organismo mette in atto una serie di meccanismi per far sì che le cellule pancreatiche producano una maggior quantità di insulina, per cercare di mantenere i livelli di glucosio nel sangue entro valori fisiologici. Quando i meccanismi di compenso non sono più efficaci si sviluppa il diabete di tipo 2.

Le cause di questa malattia sono molteplici e comprendono sia fattori genetici che fattori ambientali come dieta, esercizio fisico ed età. In questa malattia è presente un'alterazione nella secrezione e nell'azione dell'insulina, ciò comporta un progressivo aumento dei livelli di glucosio nel sangue.

Il diabete di tipo 2 colpisce prevalentemente soggetti obesi, in particolare quelli con depositi di grasso a livello del tessuto adiposo viscerale e intra-addominale.

Il tessuto adiposo e la sua distribuzione giocano un ruolo molto importante nella patogenesi e nello sviluppo di questa malattia; in particolare gli acidi grassi non esterificati (NEFA) influenzano il metabolismo glucidico, stimolando la secrezione di insulina. La presenza di un'eccessiva massa grassa a livello addominale provoca un aumento nel rilascio dei NEFA, che determina una riduzione della sensibilità all'insulina a livello del tessuto muscolare e a livello del tessuto epatico. Di conseguenza nel fegato viene stimolata la gluconeogenesi, ovvero il rilascio di glucosio nel sangue, si riduce l'estrazione di insulina e si ha un aumento nella produzione delle VLDL (very low density lipoprotein); nel tessuto muscolare scheletrico si ha una riduzione nell'ossidazione del glucosio e si riducono i depositi di glucosio sottoforma di glicogeno. Il ruolo del tessuto adiposo nello sviluppo di questa malattia è molto importante per altri due motivi: l'accumulo di grasso ectopico in tessuti insulino-dipendenti può causare insulino-resistenza; il tessuto adiposo secerne molte adipocitochine o adipochine, alcune delle quali influenzano il metabolismo glucidico e lipidico. L'adiponectina, una proteina sintetizzata

esclusivamente dal tessuto adiposo, è un importante modulatore dell'azione dell'insulina ed al contrario delle altre citochine (leptina, resistina, TNF- α) secrete dal tessuto adiposo è presente in bassa quantità nei soggetti affetti da obesità. Esiste una relazione positiva tra alti livelli di adiponectina nel sangue e sensibilità all'insulina, pertanto bassi livelli di questa citochina possono contribuire allo sviluppo di un'insulino-resistenza a livello periferico.

L'insulino-resistenza è provocata anche da:

- un aumento dei livelli di glucagone in circolo, il quale stimola la gluconeogenesi e il rilascio di glucosio dal fegato, in condizioni di deficit di insulina.
- Una riduzione nel numero dei capillari muscolari e nella vasodilatazione indotta dall'insulina, che provoca un aumento nella distanza tra capillari e cellule muscolari, di conseguenza viene alterato sia il processo di diffusione dell'insulina sia la sua azione

Nel diabete mellito di tipo 2 è presente anche una disfunzione delle cellule β del pancreas. La sovralimentazione e/o l'obesità comportano la comparsa dell'insulino-resistenza e in questa situazione, le cellule β del pancreas aumentano di volume e sono stimolate a secernere una maggior quantità di insulina per cercare di compensare questo fenomeno. In seguito gli adipociti secernono una maggior quantità di acidi grassi liberi (FFAs) e diverse citochine infiammatorie, le quali progressivamente causano un'alterazione della funzione delle cellule β . Questo processo prende il nome di lipotossicità delle cellule β . A questo punto si ha la comparsa del diabete e l'iperglicemia provoca un peggioramento delle funzioni delle cellule β , ovvero la biosintesi di insulina e la sua secrezione, e una riduzione del loro volume. Questo fenomeno prende il nome di “ β -cell glucose toxicity”, ad indicare l'attività tossica svolta da un eccesso di glucosio nei confronti delle cellule β del pancreas.

Una condizione cronica di iperglicemia, quindi, inibisce la sintesi e la secrezione dell'insulina ed inoltre aumenta lo stress ossidativo e causa una ridotta espressione e un ridotto legame al promotore dell'insulina da parte di due importanti fattori trascrizionali pancreatici, il PDX-1 e il MafA. Il PDX-1 concorre allo sviluppo

pancreatico, alla differenziazione delle cellule β e al mantenimento della loro funzione; il MafA attiva la trascrizione del gene che codifica per l'insulina(6).

2.1.Infiammazione

L'infiammazione o flogosi è un meccanismo di difesa aspecifico ed innato messo in atto dall'organismo in seguito all'azione dannosa svolta da un qualsiasi agente patogeno, il cui scopo è quello di eliminare la causa iniziale del danno cellulare o tissutale e favorire la riparazione della ferita. L'infiammazione è, solitamente, un processo che si sviluppa a livello locale e consiste in una sequenza dinamica di fenomeni, coordinati tra di loro, in successione temporale ben definita, spazialmente limitati e le cui caratteristiche sono relativamente costanti, pur variando in alcune manifestazioni a seconda della sede in cui si svolge, della natura dell'agente eziologico che l'ha scatenata e dell'intensità del danno da questo provocato. Quando l'infiammazione non rimane localizzata si ha una reazione sistemica, caratterizzata dalla comparsa di febbre, malessere, modificazioni ematologiche e funzionali in base alla sede del processo. Gli agenti eziologici scatenanti l'infiammazione possono essere di diverso tipo:

- Fisici (radiazioni, corrente elettrica)
- Traumi meccanici (ferite, contusioni)
- Chimici (acidi, alcali)
- Infezioni (batteri e loro tossine, virus, miceti, protozoi, parassiti)
- Necrosi tissutale (causata da infarto, embolia, emorragia, ipossia)
- Complessi immuni o reazioni autoimmunitarie
- Tumori maligni e loro metastasi(1).

È fondamentale che il processo flogistico sia proporzionato allo stress indotto dall'agente che l'ha provocato e che si risolva in tempi e modalità adeguate, altrimenti c'è il rischio dello sviluppo di patologie autoimmuni e associate alla cronicità dell'evento(7).

L'infiammazione può essere classificata in acuta e cronica in base alla durata nel tempo. L'infiammazione acuta è una risposta immediata ad un agente lesivo, dura qualche ora/giorno ed è caratterizzata da un inizio brusco e da una rapida

successione di eventi, rappresentati da fenomeni angioflogistici, responsabili della comparsa dei sintomi cardinali. I sintomi cardinali dell'infiammazione furono descritti per la prima volta dallo storico romano Cornelio Celso nel I secolo d.C. e comprendono: calor (aumento della temperatura locale), rubor (arrossamento), tumor (gonfiore), dolor (sensazione di dolore), functio laesa (alterazione delle capacità funzionali). Questi rappresentano, dal punto di vista clinico, i fenomeni che si succedono nell'infiammazione: si ha un'iniziale dilatazione dei capillari, che provoca un aumento del flusso ematico, responsabile dei sintomi calor e rubor; in seguito il flusso ematico rallenta fino ad arrivare ad una condizione di stasi, a cui segue la fuoriuscita attraverso la parete capillare di liquido e leucociti che si accumulano nella matrice connettivale, responsabili del tumor; la zona colpita è caratterizzata da una forte sensazione di dolore (dolor) e da una alterazione delle proprie funzioni (functio laesa). In questa situazione, una volta rimossa la causa del danno, si ha la riparazione del tessuto danneggiato. L'infiammazione cronica dura invece mesi/anni, può avere origine da un'infiammazione acuta non risolta o "de novo". Nella flogosi cronica coesistono l'infiammazione attiva, la distruzione tissutale e il tentativo di riparazione. Durante la sua evoluzione presenta dei periodi di acutizzazione e viene definita, anche, istoflogosi a causa dell'intenso coinvolgimento dei tessuti, dove si osservano infiltrazioni di linfociti e monociti piuttosto che fenomeni di angioflogosi, che sono più contenuti o del tutto assenti.

2.2. Mediatori dell'inflammatione

L'inflammatione sorge quando le cellule dell'immunit  innata individuano un'infezione o un danno tissutale;   caratterizzata da fenomeni specifici che si susseguono secondo uno schema temporale preciso e che per avvenire hanno bisogno dell'intervento di alcune sostanze, i mediatori dell'inflammatione. Il sistema sensoriale delle cellule deputate all'inflammatione   costituito da un insieme di recettori, definiti Pattern Recognition Receptors (PRRs), che vengono attivati sia da segnali endogeni di pericolo, Danger-associated molecular patterns (DAMPs), sia da segnali esogeni, Pathogen-associated molecular patterns (PAMPs)(7)(8).

I PRRs sono un gruppo di molecole eterogenee dal punto di vista strutturale, espresse principalmente da cellule del sistema immunitario, tra cui macrofagi, monociti, mastociti, cellule NK e neutrofilo. I PRRs si dividono in:

- ✓ Recettori espressi sulla membrana plasmatica, dei quali i pi  importanti sono i Toll-like receptors (TLRs) e i recettori lectinici di tipo C (CLRs)
- ✓ Recettori presenti nel citoplasma, tra cui i NOD-like receptors (NLRs) e i RIG-like helicase receptors (RLRs)
- ✓ PRRs solubili, secreti dalle cellule e presenti nel sangue e nei fluidi dell'organismo, come i componenti del complemento, pentrassine, collectine, galectina(1)

I mediatori dell'inflammatione sono delle sostanze chimiche, che possono amplificare il processo flogistico (quelli infiammatori) o portare alla sua risoluzione (quelli anti-infiammatori). La loro funzione   quella di stimolare il rilascio di altri mediatori da parte delle cellule bersaglio con effetto di amplificazione, modulazione o regolazione dei fenomeni tipici del processo infiammatorio. Possono essere classificati come:

- ✓ Mediatori di origine plasmatica: di questo gruppo fanno parte anche il sistema del complemento, il sistema delle chinine e il sistema fibrinolitico-coagulativo. Questi mediatori si formano nel plasma, dove sono presenti i loro precursori inattivi, che vengono idrolizzati come conseguenza dell'attivazione del fattore XII di Hageman, una proteina plasmatica che si attiva durante il processo flogistico, in seguito al suo contatto con la membrana delle proteine attivate e

con il collagene presente nella membrana basale delle cellule endoteliali, che sono esposte in seguito al danno subito dall'endotelio dei vasi

- ✓ Mediatori di origine cellulare: i mediatori facenti parte di questo gruppo vengono sintetizzati a livello cellulare e si dividono a loro volta in due sottogruppi, quelli "preformati" e quelli di "sintesi". Dei mediatori preformati fanno parte l'istamina, la serotonina e gli enzimi lisosomiali, che si trovano all'interno di granuli intracellulari e vengono rilasciati al momento opportuno. Fanno parte dei mediatori di sintesi, che vengono sintetizzati "de novo", le prostaglandine, i leucotrieni, il PAF (Platelet-Activating Factor), l'ossido nitrico e le citochine(9)

2.2.1.Citochine pro-infiammatorie

Le citochine formano un grande gruppo di molecole proteiche, sintetizzate e secrete, in seguito alla ricezione di determinati segnali, da tutte le cellule dell'organismo e in particolare da tutte quelle cellule che partecipano alla reazione infiammatoria ed immunitaria. Le citochine sono delle molecole trasportatrici di segnali; interagendo con i recettori di membrana espressi dalle cellule bersaglio o in determinate fasi di maturazione o dopo stimolazione, provocano la trasduzione di un segnale che, attraverso varie vie e vari fattori di trascrizione, regola la trascrizione di geni che codificano per proteine, che sono responsabili di importanti funzioni cellulari. Gli effetti sulle cellule target possono essere sia di tipo stimolatorio che inibitorio. Le citochine agiscono non solo localmente con meccanismo autocrino, cioè rispettivamente sulle stesse cellule che le hanno secrete, e paracrino, cioè su cellule adiacenti che vengono raggiunte per contatto o tramite il liquido interstiziale, ma anche con meccanismo endocrino, a distanza, venendo trasportate dal sangue dal sito di rilascio fino alla zona dove sono presenti le cellule che espongono sulla loro membrana plasmatica i recettori con cui possono interagire. Diverse citochine sono definite interleuchine perché inizialmente vennero identificate nei leucociti e ritenute capaci di trasferire segnali solo a queste cellule. Il numero che contrassegna ogni interleuchina (IL) indica la cronologia della scoperta(1). Le citochine che derivano da cellule mononucleate, che svolgono attività fagocitica, e da cellule presentanti l'antigene (APCs) inducono la comparsa di un infiltrato cellulare e di un danno nei tessuti interessati durante il processo infiammatorio. Le cellule

presentanti l'antigene (APCs) legano antigeni di varia natura, che, dopo essere stati processati, vengono presentati ai linfociti T-helper, questo è uno dei due meccanismi tramite cui si ha la produzione di citochine. L'altro meccanismo prevede la produzione di queste sostanze da parte dei monociti, che sono stimolati in seguito al legame dei PRRs, recettori tipici dell'immunità innata, con componenti specifiche dei patogeni, non presenti sulle cellule dei mammiferi. Le citochine prodotte dai monociti comprendono il fattore di necrosi tumorale (TNF) e molte interleuchine (IL-1,IL-6,IL-8,IL-18,IL-15,IL-12,IL-23); l'IL-8 è classificata, anche, come una chemochina con il nome di CXCL8, ed è secreta come altre chemochine anche da alcune cellule presentanti l'antigene (APCs)(10).

Fattore di necrosi tumorale(TNF)

Il fattore di necrosi tumorale (TNF) comprende due proteine omologhe, una derivante dai fagociti mononucleati (TNF- α) e l'altra dai linfociti (TNF- β). La forma attiva di entrambe le citochine è un omotrimerico. Il TNF- α oltre che dai fagociti mononucleati, può essere secreto anche dai neutrofili, dai linfociti attivati, dalle cellule natural killer (NK), dalle cellule endoteliali e dai mastociti. I monociti sono indotti a produrre TNF, generalmente, in seguito al legame di TLR2 e TLR4 con il lipopolisaccaride (LPS), presente sulla parete batterica. I toll-like receptors (TLRs) sono una famiglia di recettori, facente parte dei pattern recognition receptors (PRRs), che riconoscono delle sostanze presenti sulla superficie dei patogeni ma non su quella delle cellule dei mammiferi, e sono in grado di scatenare le risposte tipiche dell'immunità innata, tra cui la produzione di citochine da parte delle cellule fagocitiche mononucleate. Il TNF- α viene prodotto inizialmente come proteina trans-membrana e da questa forma legata alla membrana diventa una citochina solubile omotrimerica grazie al taglio proteolitico effettuato da una metalloproteasi, detta enzima convertitore il TNF- α (TACE). Il TNF- β , conosciuto anche come linfotossina- α , può essere sintetizzato e processato come una tipica proteina secretoria ma solitamente è legato alla superficie cellulare e forma degli eterotrimeri con un terzo membro di questa famiglia, legato alla membrana, il LT- β (linfotossina- β o TNF-C). Il TNF- α e il TNF- β si legano entrambi agli stessi due recettori, il TNFR I (p55) e il TNFR II (p75), e proprio per questo motivo hanno effetti simili, anche se non identici. Gli effetti principali dei TNFs sono:

- Induzione di una risposta immunitaria anti-tumorale, tramite l'azione citotossica svolta contro le cellule cancerose e la stimolazione delle risposte immunitarie atte ad arrestare la progressione del tumore e ad eliminarlo
- Stimolazione dell'espressione delle molecole di adesione, come la E-selectina, la molecola di adesione intracellulare (ICAM)-1 e la molecola di adesione cellulare vascolare (VCAM)-1, in seguito al legame con le cellule endoteliali. Questo fenomeno consente l'uscita dei granulociti verso le sedi colpite dall'infiammazione
- Potente attivazione dei neutrofili, modulando l'adesione, la chemiotassi, la degranolazione e lo scoppio respiratorio

Il TNF ha molti effetti collaterali, è responsabile della potente cachessia che compare nello sviluppo delle infezioni croniche e dei tumori. Inoltre, il TNF causa perdite vascolari, ha effetti inotropi negativi ed è il principale mediatore endogeno di shock tossico e sepsi(10).

Interleuchina 1(IL-1)

La famiglia dell'interleuchina 1 (IL-1) comprende al suo interno quattro peptidi, l'IL-1 α , l'IL-1 β , il recettore antagonista dell'IL-1 (IL-1ra) e l'IL-18. L'IL-1 α e l'IL-1 β presentano pressoché la stessa attività biologica e insieme all'IL-1ra si legano con affinità simile ai due recettori dell'IL-1 (IL-1Rs). I recettori di tipo 1 trasducono gli effetti biologici tipici dell'IL-1, mentre i recettori di tipo 2, espressi dai linfociti B, dai neutrofili e dalle cellule del midollo osseo, provocano effetti opposti e hanno un dominio intracellulare alquanto piccolo. Il legame dell'IL-1 con i recettori di tipo 2 inattivi causa effetti anti-infiammatori e per questo sono anche chiamati "recettori esca". La capacità dell'IL-1ra di legarsi con i recettori di tipo 1, pro-infiammatori, senza provocare la trasduzione di alcun segnale biologico è alla base della sua natura di citochina antagonista. Viene secreta naturalmente durante i processi infiammatori e la sua produzione è sovra regolata da alcune citochine (IL-4, IL-6, IL-13) e dal TGF- β (Transforming growth factor- β). L'IL-1ra viene secreta per prevenire la comparsa degli effetti dannosi che l'IL-1 potrebbe avere per il nostro organismo durante l'infiammazione.

L'IL-1 è prodotta innanzitutto da cellule appartenenti alla linea fagocitica mononucleata, ma anche da cheratinociti, cellule sinoviali, cellule gliali, cellule

endoteliali, neutrofili, osteoblasti e molte altre cellule. La sua secrezione può essere stimolata da agenti di svariata natura, come l'endotossina batterica, gli antigeni, i microrganismi e altre citochine. L'IL-1 α , l'IL-1 β e l'IL-18 vengono sintetizzate come pro-citochine e trasformate in proteine secretorie attive mediante il taglio proteolitico ad opera dell'enzima convertitore dell'IL-1 (ICE) o caspasi 1. Gli effetti biologici svolti dall'IL-1 sono:

- La capacità di attivare i linfociti T migliorando la loro produzione di IL-2 e la loro espressione dei recettori dell'IL-2. In assenza di IL-1 si ha una ridotta risposta immunitaria o lo sviluppo di uno stato di tolleranza
- La capacità di aumentare la proliferazione dei linfociti B e la sintesi di immunoglobuline
- La capacità di interagire con il sistema nervoso centrale e provocare febbre, anoressia, sensazione di sonno e letargo; tutti sintomi tipici dell'infiammazione a livello sistemico
- L'interazione con gli epatociti, che provoca l'inibizione della produzione delle proteine costitutive (albumina) e stimola la produzione delle proteine di fase acuta (proteina amiloide, proteina C reattiva, proteine facenti parte del sistema del complemento)
- La stimolazione dell'adesione dei leucociti alle cellule endoteliali tramite la sovra regolazione della E-selectina, della molecola di adesione intracellulare (ICAM)-1 e della molecola di adesione cellulare vascolare (VCAM)-1
- Contribuisce all'ipotensione, tipica dello shock settico

Come si è visto l'IL-1 condivide molti effetti biologici con il TNF, tuttavia la distinzione più importante è che il TNF non ha effetti diretti sulla proliferazione dei linfociti mentre l'IL-1 si(10).

Interleuchina 6(IL-6)

L'IL-6 viene prodotta dai fagociti mononucleati, dai linfociti B e T, dai fibroblasti, dalle cellule endoteliali, dai cheratinociti, dagli epatociti e dalle cellule del midollo osseo. Questa citochina ha sia effetti pro-infiammatori che anti-infiammatori. L'IL-6 stimola la differenziazione dei linfociti B in plasmacellule mature e la secrezione di immunoglobuline e modula l'attivazione, la crescita e la differenziazione dei linfociti T; come l'IL-1 induce la piressia e la produzione delle proteine di fase

acuta da parte del fegato. Dall'altro lato, però, l'IL-6 inibisce la sintesi dell'IL-1 e del TNF e stimola la produzione dell'IL-1ra, compiendo così un'attività anti-infiammatoria(10)

2.2.2.Citochine anti-infiammatorie

Accanto alle citochine che stimolano lo sviluppo di un'inflammatione di tipo citotossico, umorale, cellulare o allergica ci sono molte altre citochine che hanno effetti anti-infiammatori, tra cui l'IL-1ra, il TGF- β e i membri della famiglia dell'IL-10(10).

Transforming growth factor- β (TGF- β)

Il TGF- β rappresenta una famiglia di peptidi che regolano la crescita cellulare ed hanno sia effetti inibitori che stimolatori su diversi tipi cellulari. Viene rilasciato dai condrociti, dagli osteociti, dai fibroblasti, dalle piastrine, dai monociti e da alcune cellule T. Il linfocita T, che produce il TGF- β , viene chiamato linfocita T-repressore (Tr1) o linfocita T-helper di tipo 3 (T_H3). Viene sintetizzato sottoforma di precursore inattivo e richiede il taglio proteolitico da parte di un enzima per essere attivato. Il TGF- β è molto importante in quanto induce la fibrosi, la formazione della matrice extracellulare, la riparazione delle ferite e il processo cicatriziale. Inoltre, inibisce la secrezione di immunoglobuline da parte dei linfociti B, l'azione citotossica svolta dai fagociti mononucleati e dalle cellule NK e la proliferazione di diversi tipi cellulari. La produzione di TGF- β da parte delle cellule T apoptotiche crea una situazione di immunosoppressione e questa è una spiegazione per l'assenza dello sviluppo di fenomeni infiammatori e autoimmuni come conseguenza della morte cellulare per apoptosi. Tuttavia, il TGF- β svolge azione chemiotattica nei confronti dei macrofagi e stimola lo switch isotipico α delle IgA da parte delle cellule B(10).

Interleuchine -10

L'IL-10 è prodotta dai linfociti T-helper di tipo 1 (T_H1) e 2 (T_H2), dai linfociti T citotossici, dai linfociti B, dai mastociti e dalle cellule fagocitiche mononucleate. L'IL-10 inibisce la produzione di IFN- γ e IL-2 da parte dei linfociti T_H1, di IL-4 e IL-5 da parte dei linfociti T_H2; riduce la produzione di IL-1 β , IL-6, IL-8, IL-12 e TNF- α da parte dei fagociti mononucleati e di IFN- γ e TNF- α da parte delle cellule NK. Inoltre, l'IL-10 inibisce l'espressione da parte dei monociti delle molecole MHC di classe 2, dell'ICAM-1, del CD23 e della B7. L'inibizione dell'espressione della B7 ha come conseguenza l'incapacità delle cellule presentanti l'antigene (APCs) di fornire il segnale necessario per l'attivazione dei linfociti T helper e la mancata produzione di citochine da parte dei linfociti T_H1 e T_H2. Al contrario, a livello dei linfociti B, stimola la proliferazione cellulare e la secrezione di immunoglobuline. Inoltre, favorisce lo switching isotipico a IgG4 e funge da cofattore di crescita per i linfociti T citotossici. In questo modo l'IL-10 inibisce l'azione delle citochine coinvolte nell'immunità cellulo-mediata e al contrario stimola l'azione di quelle coinvolte nell'immunità umorale e citotossica. TNF- α e altre citochine stimolano la secrezione di IL-10, suggerendo l'esistenza di un meccanismo omeostatico in base al quale uno stimolo infiammatorio induce la secrezione di TNF- α , che a sua volta stimola la secrezione di IL-10, che va a bloccare la sintesi di TNF- α (10).

2.3.Chemochine

Le chemochine sono delle proteine a basso peso molecolare (8-12 kD) in grado di indurre la chemiotassi in una varietà di cellule, comprese i neutrofili, i monociti, i linfociti, gli eosinofili, i cheratinociti e i fibroblasti. Sono circa 50, fanno parte della famiglia delle citochine e sono omologhe dal punto di vista strutturale. Vengono prodotte da diversi tipi di leucociti e da cellule di vari tessuti e svolgono la loro attività grazie al legame con i recettori accoppiati alle proteine G (GPCR); questi recettori sono formati da un dominio extracellulare che lega la chemochina e da 7 α -eliche transmembrana e sono associati ad una proteina G sul versante citoplasmatico. Le loro funzioni principali sono quelle di richiamare i leucociti, da cui esse sono prodotte, nel sito dell'infezione, di attivare le integrine e di modulare il traffico dei leucociti nell'organismo. Inizialmente le chemochine sono state descritte come molecole infiammatorie, prodotte nel sito sede d'infezione o come risposta ad uno stimolo pro-infiammatorio. Il compito delle chemochine infiammatorie è quello di reclutare i leucociti e attivarli per innescare una risposta immunitaria e iniziare la guarigione della ferita. Recentemente si è visto che ci sono altre chemochine che hanno una funzione omeostatica o costitutiva. La loro funzione è quella di regolare le risposte dell'immunità innata come il traffico dei linfociti, l'ematopoiesi, il campionamento dell'antigene nel tessuto linfoide secondario e la sorveglianza immunitaria. Le chemochine omeostatiche, generalmente, sono prodotte in specifici tessuti o organi, mentre le chemochine infiammatorie possono essere prodotte da molti tipi cellulari e in diverse sedi. Sono divise in 4 famiglie in base al numero e alla posizione dei residui di cisteina collocati nella regione ammino-terminale e responsabili della formazione dei ponti disolfuro, che determinano la struttura delle chemochine come monomeri, dimeri od oligomeri.

- La prima famiglia è costituita dalle chemochine CC, che contengono i residui di cisteina uno adiacente all'altro. Di questa famiglia fa parte la CCL2 o MIP-1, il cui compito è quello di reclutare diversi tipi di leucociti. I loro target principali sono i monociti e i linfociti
- La seconda famiglia è costituita dalle chemochine CXC, in cui i primi due residui di cisteina sono separati da un amminoacido qualsiasi. Di questa

famiglia fa parte la CXCL8 o IL-8, il cui compito è quello di reclutare i granulociti neutrofili, loro target principale

- La terza famiglia è costituita dalle chemochine C, che possiedono un solo residuo di cisteina e di cui si conosce la linfotattina o XCL1 (lymphocyte-specific chemotactic peptide)
- La quarta famiglia è costituita dalle chemochine CX₃C, in cui i due residui di cisteina sono separati da tre amminoacidi e di cui si conosce soltanto la fractalchina o CX₃CL1(10).

2.4. La senescenza cellulare

La senescenza cellulare è un processo che si caratterizza per l'arresto irreversibile del ciclo cellulare in seguito all'esposizione a diversi stimoli stressogeni come l'accorciamento dei telomeri, lo stress ossidativo, l'attivazione di oncogeni o un generico danno al DNA. Le cellule senescenti tendono ad accumularsi nei tessuti del nostro organismo con l'avanzare dell'età anagrafica, favorendo così lo sviluppo di molte malattie età-correlate come diabete, cancro, aterosclerosi e alzheimer. La senescenza cellulare è un fenomeno complesso: assolve funzioni positive, in quanto favorisce la riparazione delle ferite, lo sviluppo embrionale e contrasta la trasformazione tumorale.

Le cellule senescenti acquisiscono una serie di alterazioni strutturali e funzionali: morfologia alterata, con tendenza all'appiattimento; compromissione dell'integrità nucleare a causa della perdita della laminina B, che provoca la fuoriuscita di frammenti cromatinici dal comparto nucleare nel citoplasma (cytoplasmatic chromatin fragments (CCFs)); aumentato contenuto lisosomiale, messo in evidenza da un'elevata attività dell'enzima β-galattosidasi (SA-β-Gal); attivazione di p16^{Ink4a}; presenza di mitocondri non funzionanti che producono alti livelli di ROS; modificazioni nella composizione della membrana plasmatica.

Uno degli aspetti che lega la senescenza cellulare alle patologie età-associate è il fatto che le cellule senescenti acquisiscono un fenotipo secretorio, con effetti paracrini e/o autocrini. Questo fenotipo secretorio prende il nome di senescence-associated secretory phenotypes (SASP) ed è caratterizzato dalla secrezione di numerose

citochine pro-infiammatorie, chemochine, fattori di crescita e proteasi. Le molecole secrete da queste cellule variano in base al tipo cellulare e alla loro localizzazione, come varia il ruolo svolto dalle cellule senescenti a seconda del tessuto o dell'organo in cui si trovano(11).

Le cause della senescenza cellulare

Come riportato sopra, le cause della senescenza cellulare in vivo e in vitro sono molteplici. La diminuzione della capacità proliferativa delle cellule in vivo, fino all'arresto totale del loro ciclo cellulare, è conseguenza soprattutto dell'accorciamento telomerico. I telomeri sono delle sequenze ripetute, TTAGGG, che si trovano alle estremità dei cromosomi, associate con numerose proteine. Il loro compito è quello di proteggere i cromosomi da eventuali fenomeni di degradazione e ricombinazione degli stessi. Ad ogni replicazione i telomeri si accorciano progressivamente poiché la DNA polimerasi non è in grado di replicare per intero le porzioni terminali delle molecole di DNA lineare. I telomeri formano una struttura a t-loop, che viene resa stabile grazie al legame con diverse proteine, che prendono il nome di complesso "shelterin". Ad ogni divisione cellulare, l'accorciamento telomerico provoca la perdita dei componenti del complesso "shelterin" (TRF2 o POT1) e questo causa un'alterazione nella conformazione della struttura a t-loop, portando all'esposizione delle estremità telomeriche e all'attivazione della "DNA damage response (DDR)"(12).

Un fattore fondamentale, in grado di indurre la senescenza in vitro, fenomeno noto come stress-induced premature senescence (SIPS), è lo stress. L'esposizione a diversi tipi di stress acuti può indurre la senescenza. Tra gli stimoli più importanti si hanno: lo stress ossidativo, l'accumulo di acidi grassi, alti livelli di glucosio, mitogeni e nutrienti che aumentano l'attività di mTOR (protein-chinasi che fosforila serina e treonina e regola la crescita, la proliferazione, la motilità, la sopravvivenza, la sintesi proteica e la trascrizione cellulare), lo stress proteotossico e l'espressione inappropriata di oncogeni e oncosoppressori(13). A seconda dell'entità del danno subito le cellule o vanno incontro a morte programmata, apoptosi, o vanno incontro a senescenza, priva dell'accorciamento telomerico(14). I telomeri non sembrano essere coinvolti nel processo di senescenza prematura indotta da stress (SIPS). La SIPS, inizialmente, presenta un danno al DNA che

causa l'attivazione della DNA damage response (DDR). In questa condizione vengono attivati una serie di inibitori di chinasi ciclina-dipendenti, fattori pro-infiammatori e geni anti-apoptotici. In questo modo, la riparazione del DNA avviene entro 24 h, ma le regioni telomeriche rimangono danneggiate per mesi e possono provocare un DDR continuo(15)(12).

L'attivazione di geni anti-apoptotici permette alle cellule senescenti di sopravvivere alla morte programmata. I due meccanismi maggiormente coinvolti sono l'aumento di fattori anti-apoptotici, appartenenti alla famiglia di Bcl-2, come Bcl-XL, grazie all'attivazione costitutiva di cAMP e la riduzione della trascrizione di fattori pro-apoptotici, come Bax(16)(17).

Un'altra causa della senescenza è rappresentata dalla disfunzione mitocondriale. I mitocondri sono degli organuli cellulari che, oltre ad essere addetti alla respirazione cellulare, possiedono dei sensori dello stress per l'eliminazione delle specie reattive dell'ossigeno (ROS), che si formano durante la fosforilazione ossidativa. Durante l'invecchiamento i mitocondri vanno incontro a modificazioni morfologiche, causate dall'alterazione dei processi di fusione e fissione, e funzionali. Molto spesso questi organuli presentano un alterato potenziale di membrana, che causa il rilascio di enzimi mitocondriali, come la superossido dismutasi, la catalasi e la glutanione perossidasi, che comportano una riduzione nell'attività antiossidante, e di molecole antiossidanti come il glutanione e le vitamine C ed E. Tutto ciò causa una ridotta efficienza della fosforilazione ossidativa, con conseguente aumento delle specie reattive dell'ossigeno (ROS). L'aumento di radicali liberi all'interno dei mitocondri va a danneggiare fortemente molte delle sue componenti, tra cui il DNA mitocondriale (mtDNA), le proteine e i lipidi, inducendo la senescenza cellulare(18). Altro aspetto che viene alterato a livello mitocondriale con l'invecchiamento è la mitofagia, ovvero l'attività di autofagia svolta da questi organuli e fondamentale per l'eliminazione e la degradazione di componenti cellulari danneggiati e proteine mal ripiegate, tramite l'azione di diversi enzimi lisosomiali(19). Quando questo processo è alterato, si ha un accumulo di mitocondri disfunzionanti contenenti una grande quantità di ROS, i quali determinano danno ossidativo ed un aumento della permeabilità mitocondriale. Questa condizione può avere due esiti: apoptosi o attivazione, in assenza di un'infezione, del complesso enzimatico inflammasoma, dovuto al rilascio di varie

molecole tra cui l' mtDNA nel citoplasma. Si determina così un'infiammazione cronica di basso grado, che prende il nome di inflamm-aging, e una perdita della funzionalità cellulare, due condizioni che rappresentano degli importanti fattori di rischio per l'insorgenza delle malattie età-correlate(20).

Markers senescenza cellulare

La senescenza cellulare è regolata e mantenuta dall'azione di due fondamentali pathway oncosoppressori; queste vie coinvolgono le proteine p53/p21 e le proteine p16^{Ink4a}/proteina del retinoblastoma (pRb). La proteina p16 fa parte della famiglia delle CDKI, delle proteine in grado di inibire le chinasi ciclina-dipendenti e quindi di bloccare il ciclo cellulare, impedendo la mitosi. In particolare questa proteina blocca la progressione del ciclo cellulare dalla fase G1 alla fase S, inibendo le chinasi CDK4 e CDK6. Poiché la proteina p16 limita l'azione svolta dalla chinasi CDK4, che a sua volta è un inibitore della proteina del retinoblastoma, si ha un incremento dell'attività di quest'ultima proteina. La proteina del retinoblastoma blocca il ciclo cellulare delle cellule che presentano il DNA danneggiato, per fare ciò si lega al fattore di trascrizione E2F e inibisce la sua azione, facendo in modo che le cellule rimangano in fase G1. La proteina p53 è molto importante nella protezione del genoma cellulare poiché in presenza di un danno al DNA viene fosforilata da ATM, una fosfatidilinositolo 3-chinasi, e in questa forma funge da fattore di trascrizione. Una volta arrivata nel nucleo si lega alla proteina p21, inducendone la trascrizione e determinando il blocco del ciclo cellulare a causa dell'inibizione del complesso CDK4-CDK6/Ciclina D. Nelle cellule senescenti si ha un aumento dei livelli di espressione di queste 4 proteine, poiché spesso queste cellule presentano danni al loro DNA e di conseguenza si attivano le vie che coinvolgono i geni oncosoppressori(21).

Un altro marker molto utilizzato per mettere in evidenza la presenza di cellule senescenti è la β -galattosidasi associata alla senescenza (SA- β -Gal). In queste cellule si ha una maggiore attivazione di questo enzima. La β -galattosidasi, un'idrolasi lisosomiale, è attiva di solito a pH 4, ma nelle cellule senescenti spesso la si trova attiva a pH 6, e questo fenomeno può essere messo in evidenza con un semplice test biochimico(22).

Altri due aspetti tipici delle cellule senescenti sono la formazione di domini specializzati di eterocromatina, i quali aiutano a silenziare dei geni che favoriscono la proliferazione nelle cellule senescenti, noti come senescence-associated heterochromatin foci (SAFH), e i segnali continui di DNA damage response (DDR)(22).

SASP

Il fenotipo secretorio associato a senescenza (SASP) presenta un secretoma pro-infiammatorio, composto da diverse interleuchine (IL-1,IL-6), chemochine (IL-8, CCL2), fattori di crescita (FGF) e proteasi, come le metalloproteasi della matrice (MMP). La secrezione della maggior parte di queste molecole è indotta dall'attivazione dell'inflammasoma e del fattore di trascrizione NF-kB. Questo fenotipo può avere effetti positivi o negativi, a seconda del contesto.

Il fenotipo SASP è in grado di causare un'inflammation "sterile" cronica a livello locale o sistemico, chiamata inflamm-aging, di alterare l'architettura tissutale e di stimolare la crescita di cellule maligne adiacenti, quando è persistente o pronunciato. Mentre se è localizzato e transitorio, soprattutto nelle persone giovani, può risolvere un danno tissutale e avvisare le cellule adiacenti di un potenziale pericolo, promuovendo la rimozione e la distruzione, tramite l'azione del sistema immunitario, delle cellule danneggiate.

Le citochine e le chemochine pro-infiammatorie rilasciate dal fenotipo SASP reclutano le cellule del sistema immunitario, per favorire l'eliminazione delle cellule senescenti dalle aree in cui si sono accumulate. Contemporaneamente le metalloproteasi della matrice favoriscono l'ingresso delle cellule immunitarie nella sede interessata e i fattori di crescita stimolano la proliferazione delle cellule vicine, in modo che, una volta rimosse le cellule senescenti, queste vengano sostituite. Nei giovani questo meccanismo è ben regolato, i problemi sorgono con l'avanzare dell'età o in presenza di lesioni. Le cellule disfunzionali possono alterare le cellule circostanti in due modi:

- Tramite un effetto paracrino sulle cellule vicine, alterando la loro funzione e inducendo un fenotipo senescente, tramite l'alterazione del microambiente tissutale e dei fattori secreti dalle cellule senescenti

- Tramite la diffusione a livello sistemico, favorendo il deterioramento strutturale e funzionale e l'instaurarsi dell'inflamm-aging

Pertanto gli effetti del fenotipo SASP dipendono dall'equilibrio tra il tempo di permanenza delle cellule senescenti nella popolazione cellulare e il loro tasso di eliminazione da parte del sistema immunitario(18)(22)(23).

2.5.Inflamm-aging

Inflamm-aging è un termine coniato per descrivere la presenza di un'inflammatione sistemica di basso grado, cronica, presente nell'invecchiamento, in assenza di un'infezione evidente. Costituisce un grande fattore di rischio per la mortalità e morbilità negli anziani, poiché favorisce lo sviluppo di molte condizioni croniche e patologiche, come aterosclerosi, alzheimer, cancro e diabete di tipo 2. Quest'ultime malattie elencate sono tutte patologie associate all'età (Age related diseases-ARDs).

Il concetto di inflamm-aging è un'evoluzione della teoria del network dell'invecchiamento e della teoria del rimodellamento dell'invecchiamento. La prima teoria postula che l'invecchiamento è controllato in maniera indiretta da una rete di meccanismi difensivi che il nostro organismo mette in atto sia a livello cellulare che molecolare. La seconda teoria, che era nata con l'intenzione di spiegare il fenomeno dell'immunosenescenza, ridotta funzionalità del sistema immunitario soprattutto della componente acquisita, enuncia che l'invecchiamento è il risultato dell'adattamento del nostro corpo in seguito ai meccanismi messi in atto per combattere eventuali lesioni o danni che colpiscono il nostro organismo. L'aumento dell'attività dell'immunità innata che si osserva durante l'invecchiamento, con intensità variabile fra i vari individui, e che comporta un incremento dello stato infiammatorio sistemico, prende il nome di inflamm-aging.

Normalmente lo stato di infiammazione scompare quando vengono eliminati dal sistema immunitario i fattori pro-infiammatori coinvolti nelle infezioni e nelle lesioni tissutali, ciò porta ad una situazione di equilibrio, chiamata infiammazione risolutiva. Tuttavia, in presenza di alcuni fattori, come una stimolazione intensa e di basso grado e una risposta eccessiva e duratura nei tessuti sede dell'infezione,

l'inflammation non riesce a trasformarsi in una situazione di anti-infezione e di riparazione delle lesioni tissutali ma, continua e porta ad uno stato di inflammation non risolta. Questa situazione è una caratteristica tipica dell'inflamm-aging.

I meccanismi che contribuiscono a mantenere questo stato di inflammation cronica di basso grado sono molteplici(fig.3):

- L'esposizione a diversi stimoli stressogeni. Gli stress possono essere di tipo fisico (raggi UV, raggi gamma, calore), chimico (componenti del corpo e prodotti del metabolismo come radicali liberi e zuccheri ridotti) e biologico (virus, batteri)
- La presenza di stress ossidativo all'interno dell'organismo. Lo stress ossidativo è causato dall'eccessiva produzione di specie reattive dell'ossigeno (ROS) da parte di diversi enzimi (NADPH ossidasi, xantina ossidasi, ossido nitrico sintasi non accoppiata), dalla catena mitocondriale deputata al trasporto degli elettroni e come conseguenza di una ridotta capacità anti-ossidante
- La disfunzione mitocondriale. I mitocondri sono degli organuli intracellulari, la cui funzione principale è la produzione di ATP attraverso la fosforilazione ossidativa. La presenza di mutazioni a livello del DNA mitocondriale (mtDNA) provoca una produzione eccessiva di specie reattive dell'ossigeno (ROS), che contribuiscono al mantenimento di uno stato di inflammation cronica e di basso grado
- La deregolazione età-correlata del sistema immunitario. Durante l'invecchiamento il funzionamento dell'immunità adattativa diminuisce, mentre i meccanismi dell'immunità innata diventano molto più attivi, ciò porta ad una condizione di immunosenescenza. L'immunosenescenza è caratterizzata da una involuzione a livello del timo, che provoca una minor produzione di linfociti T vergini, un restringimento nel repertorio di queste cellule e un basso grado di inflammation cronica. Questo fenomeno è messo in luce da un aumento dei livelli sierici delle citochine pro-infiammatorie (IL-6, TNF- α) e delle proteine di fase acuta
- La presenza di infezioni croniche, come citomegalovirus, epatite C o HIV, le quali provocano un aumento dei livelli di IL-6 e TNF- α

- L'infiltrazione da parte dei macrofagi, che rilasciano citochine pro-infiammatorie, del tessuto adiposo
- Una dieta ricca in amidi raffinati, zucchero, acidi grassi saturi e, povera in omega-3, antiossidanti naturali e fibre derivanti da frutta, verdura e cereali integrali
- L'attivazione del sistema renina-angiotensina (RAS)
- Meccanismi epigenetici che modificano l'espressione di citochine, oncogeni e oncosoppressori
- La presenza dei prodotti finali di glicazione (AGEs), che provocano disfunzione a livello endoteliale
- L'invecchiamento delle cellule staminali
- La disfunzione nel processo autofagico, che permette il trasferimento delle sostanze di scarto ai lisosomi, dove vengono degradate(24)

L'infiammazione di basso grado presente nell'invecchiamento è sostenuta sia da fattori endogeni (stress ossidativo, danni al DNA ecc) sia da fattori esogeni (raggi UV, calore ecc). Un ruolo importante è svolto anche dallo stile di vita dell'individuo su cui influiscono elementi come la dieta, l'attività fisica e il tabagismo. Per fronteggiare gli effetti biologici provocati dai vari agenti stressogeni, il nostro organismo mette in atto meccanismi di vario tipo:

- Molecolari: meccanismi di riparazione del DNA, produzione di heat-shock proteins (HSP), turn-over di proteine e organelli, meccanismi anti-ossidanti e disintossicanti
- Cellulari: apoptosi e morte cellulare per autofagia, fagocitosi di cellule danneggiate, senescenza cellulare, sostituzione di cellule morte da progenitori derivati da cellule staminali
- Sistemici: risposte immunitarie e infiammatorie allo stress e attivazione del sistema neuroendocrino
- Comportamentali: corretto stile di vita che prevede dieta salutare e costante attività fisica(24)(25)

I macrofagi giocano un ruolo chiave nella risposta immunitaria attivando e mantenendo i processi infiammatori nel tempo. Partendo da queste considerazioni è stato coniato un nuovo termine, *macroph-aging*, ad indicare l'attivazione macrofagica

cronica che caratterizza l'invecchiamento. I macrofagi, diventano quindi essenziali, per l'induzione e il mantenimento dello stato infiammatorio, insieme all'espansione delle cellule della memoria, alla diminuzione delle cellule "naive", al restringimento del repertorio delle cellule T e alla riduzione dello spazio immunologico(26).

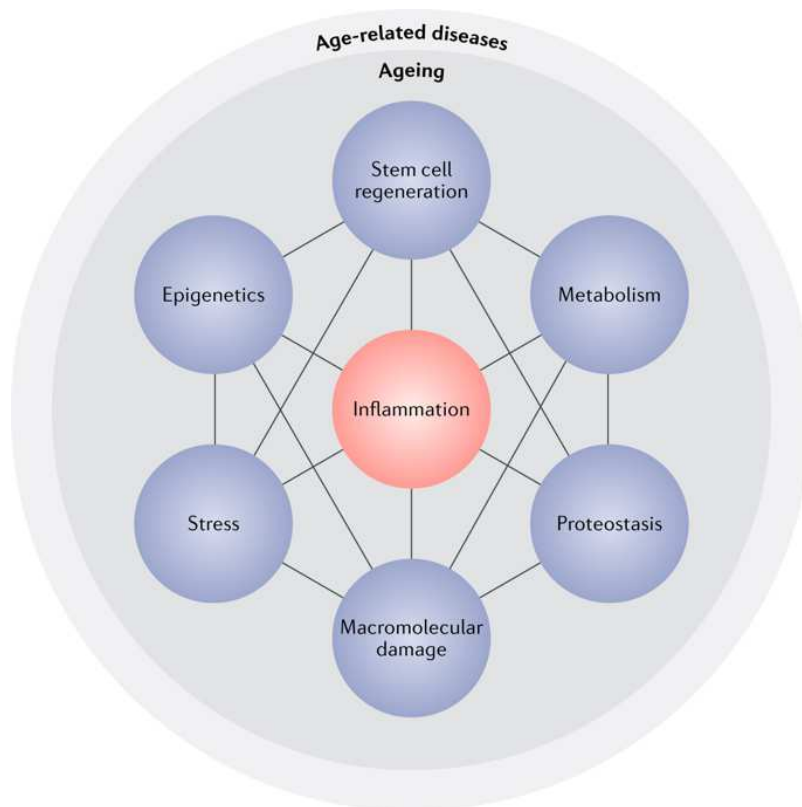


Figura 3. Processi che contribuiscono allo sviluppo e al mantenimento dell'inflamm-aging(27)

Una caratteristica tipica dell'inflamm-aging è la presenza nel circolo sanguigno di alcuni microRNA (miRNAs). I miRNAs fungono da messaggeri attivi, in grado di suscitare una risposta sistemica, e sono dei "sottoprodotti" aspecifici dell'attività cellulare e persino della morte cellulare. Queste molecole vengono ricercate perché possono fungere da biomarcatori per una serie di processi fisiopatologici, tra cui la risposta infiammatoria e le condizioni relative all'infiammazione. I miRNAs possono svolgere funzioni modulatorie, in quanto sono in grado di inibire o di attivare le vie infiammatorie. L'azione inibitoria è fondamentale per attivare dei meccanismi anti-infiammatori in grado di contrastare potenti segnali pro-infiammatori, come la via del fattore nucleare kappaB (NF-kB), per cercare di prevenire la distruzione cellulare e tissutale. L'azione anti-infiammatoria diventa importante durante l'invecchiamento, quando è presente un'infiammazione

sistemica e cronica di basso grado, sostenuta dal secretoma delle cellule senescenti e dalla progressiva attivazione delle cellule immunitarie nel tempo. Questo processo causa dei cambiamenti legati all'età, specialmente in età avanzata, in quei miRNAs circolanti che sono in grado di modulare lo stato infiammatorio e prendono il nome di inflamma-miRs. Alcuni di questi miRNAs circolanti sono degli importanti biomarcatori per le principali malattie età-correlate, tra cui il diabete di tipo 2. I prototipi dei miRNAs coinvolti nella regolazione dell'infiammazione sono il miR-155, il miR-146a e il miR-21(28).

2.6. Legame tra diabete e senescenza cellulare

Come altre malattie legate all'età, il diabete può essere causato e caratterizzato dagli stessi meccanismi di base tipici dell'invecchiamento e responsabili della disfunzione tissutale età-correlata, che includono la presenza di un'infiammazione cronica e di basso grado in assenza di patogeni (inflamm-aging), la disfunzione delle cellule staminali e dei progenitori, danni macromolecolari (danni al DNA) e la senescenza cellulare.

La senescenza cellulare, come descritto sopra, si caratterizza per l'arresto irreversibile della crescita cellulare in seguito all'esposizione a diversi stress cellulari e per l'acquisizione di un fenotipo specifico :

- Una forma appiattita in coltura
- L'eccessiva espressione di alcuni importanti proteine che inibiscono l'avanzamento del ciclo cellulare, quali la p21 e la p16
- L'accumulo di focolai correlati ad un danno al DNA (DNA Damage Foci-DDF)
- La produzione eccessiva di specie reattive dell'ossigeno (ROS)
- Il cambiamento dell'attività lisosomiale della β -galattosidasi da un pH ottimale di 4 ad un pH ottimale di 6

Le cellule senescenti sono incapaci di dividersi, ma sono metabolicamente attive e questo aspetto sfocia nella secrezione di citochine pro-infiammatorie, chemochine e fattori di crescita, che prendono il nome di SASP (Senescence-Associated Secretory Phenotype). Grazie all'attività svolta da questo particolare fenotipo tipico

dell'invecchiamento, anche poche cellule senescenti presenti all'interno di un tessuto possono provocare degli effetti sistemici.

La quantità di cellule senescenti è bassa negli individui giovani e va via via crescendo con l'età, interessando, in particolare, alcuni tessuti, come il tessuto adiposo, il tessuto muscolare scheletrico, il rene e la cute. Solitamente la presenza di cellule senescenti rappresenta un meccanismo di difesa contro l'insorgenza di tumori, ma la persistenza di un numero elevato di cellule senescenti può contribuire alla progressione tumorale a causa dell'infiammazione, della disfunzione tissutale e dei segnali di crescita indotti dal SASP, fenomeni tipici della senescenza cellulare. Inoltre le cellule senescenti tramite l'azione delle molecole da loro rilasciate possono indurre la senescenza anche nelle cellule vicine.

La senescenza cellulare è un fenomeno alquanto complesso, poiché è causato da diversi fattori (malattie età-correlate, stress ossidativo, ambiente ormonale, infezioni croniche, esposizione alle radiazioni e a determinate terapie, fattori di sviluppo) e proprio a causa della sua complessità ha effetti positivi, poiché contribuisce all'embriogenesi, alla riparazione delle ferite, allo sviluppo dell'individuo e all'inibizione tumorale, e negativi, poiché nelle malattie età-correlate, se presente in grande quantità, provoca un'alterazione nelle funzioni dei vari tessuti del nostro organismo. Proprio per questo la relazione tra diabete e senescenza cellulare è complessa. Da un lato, il microambiente, che si instaura durante lo sviluppo di questa patologia, stimola la produzione e l'accumulo delle cellule senescenti, dall'altro, la presenza delle cellule senescenti può contribuire alla disfunzione tissutale e alle complicanze osservate, in particolare, nel diabete di tipo 2(fig.4)

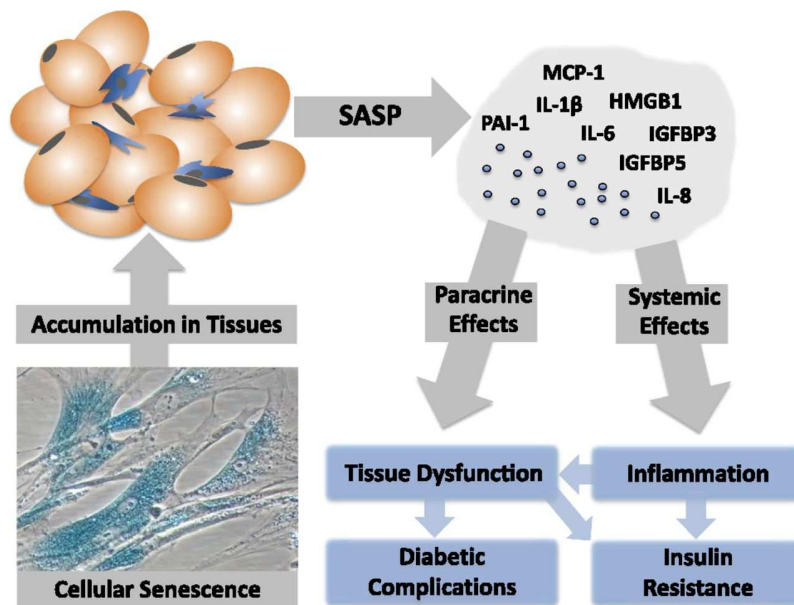


Figura 4. Legame tra senescenza cellulare e diabete. La figura mostra come le cellule senescenti quando si accumulano nei tessuti, grazie al loro fenotipo SASP, rilasciano diverse citochine e chemochine, le quali grazie ai loro effetti paracrini causano disfunzione tissutale, che porta alle complicanze tipiche del diabete, e grazie ai loro effetti sistemici causano infiammazione che provoca sia insulino-resistenza che disfunzione tissutale(29)

Il microambiente tipico del diabete promuove la progressione della senescenza cellulare tramite tre meccanismi: gli alti livelli di glucosio nel sangue; l'eccessiva sintesi di ceramidi e le alterazioni nella via di segnalazione ormone della crescita/IGF (Insulin-like GrowthFactor).

Gli alti livelli di glucosio nel sangue stimolano, in vitro, una senescenza prematura (Stress-Induced Premature Senescence-SISP) nelle cellule endoteliali, nelle cellule mesangiali del rene, nelle cellule staminali derivate dal tessuto adiposo e nei fibroblasti. Inoltre il glucosio stimola la formazione dei prodotti finali di glicazione avanzata (AGEs), che tramite il legame con i loro recettori (RAGE), inducono la senescenza prematura nelle cellule tubulari renali.

La sintesi eccessiva di ceramidi è tipica dell'obesità e del diabete ed è la maggior responsabile della lipotossicità, la quale provoca danno tissutale, il cui esempio tipico è l'apoptosi delle cellule β del pancreas. Il contenuto intracellulare di ceramidi promuove la senescenza cellulare, a causa dei cambiamenti nel metabolismo degli acidi grassi che si instaurano come conseguenza degli stimoli stressogeni, attraverso l'attivazione delle vie che coinvolgono la p53 e la p38. Si è

visto anche, che un biomarcatore del diabete, la 1-deossisfinganina, quando viene convertita nel corrispondente metabolita ceramide, la 1 deossi-diidrocераmide, provoca una ridotta secrezione di insulina da parte delle cellule β del pancreas e la comparsa della senescenza cellulare p21-indotta nelle isole pancreatiche.

Alterazioni nell'asse ormone della crescita/IGF (Insulin-like Growth Factor), accompagnate dalle diverse risposte dei tessuti target dei pazienti obesi e diabetici, promuovono la senescenza cellulare. Un ruolo importante è svolto dall'IGF-1, la cui esposizione cronica provoca la comparsa di una senescenza prematura p53-indotta. I livelli di IGF-1 variano nei soggetti diabetici in relazione all'iperinsulinemia e al livello di espressione dei membri della famiglia IGFBP, che comprende le proteine che legano i fattori di crescita dell'insulina (IGF). Come conseguenza della senescenza IGF-1 indotta si ha un aumento dell'attività della protein-chinasi B (Akt) nelle cellule senescenti. I livelli di IGFBP3, che promuove la propagazione della senescenza cellulare alle cellule vicine, sono regolati da una molecola rilasciata dal fenotipo SASP, la PAI-1. La PAI-1 è un inibitore delle serin-proteasi, che blocca l'attivatore tissutale del plasminogeno, la cui funzione è quella di clivare IGFBP3. Di conseguenza IGFBP3 provoca insulino-resistenza indipendentemente dal legame con gli IGF, questo è evidenziato dalla ridotta traslocazione del GLUT4 verso la membrana plasmatica e dalla ridotta fosforilazione della protein-chinasi B (Akt) in risposta all'insulina a livello degli adipociti. Anche un altro membro della famiglia IGFBP, l'IGFBP5, provoca la senescenza cellulare p53-indotta nelle cellule endoteliali e nei fibroblasti. Ovviamente il ruolo svolto dall'asse ormone della crescita/IGF, in questo frangente, nell'indurre la senescenza cellulare, è minore dell'apporto dato dal glucosio o da altri metaboliti.

La senescenza cellulare contribuisce alla patogenesi del diabete di tipo 2 tramite l'azione delle molecole rilasciate dal fenotipo SASP, tramite la disfunzione del tessuto adiposo e l'invecchiamento delle cellule β del pancreas.

Tra le molecole rilasciate dalle cellule senescenti, quelle che maggiormente favoriscono la progressione del diabete, sono l'IL-6 e l'IL-1 β , fattori predittivi del diabete, la chemochina MCP-1, che favorisce l'accumulo di macrofagi, e la PAI-1, i cui livelli sono aumentati nella circolazione e nei tessuti dei pazienti diabetici.

Tutte queste sostanze favoriscono la persistenza di un'inflammatione cronica, sterile e di basso grado, che è caratteristica sia del diabete sia dell'invecchiamento e contribuisce alla comparsa dell'insulino-resistenza.

Anche la disfunzione del tessuto adiposo è un fenomeno condiviso da diabete e invecchiamento, che provoca l'aumento delle cellule senescenti nel nostro organismo. L'adipogenesi è ridotta dalla presenza di pre-adipociti senescenti, che determinano la comparsa di una lipodistrofia età-correlata, responsabile di lipotossicità e infiammazione, e dalle citochine pro-infiammatorie rilasciate dal fenotipo SASP. L'adipogenesi influenza la forza della risposta all'insulina, poiché i suoi recettori e il trasportatore GLUT4 aumentano quando i pre-adipociti si differenziano e diventano adipociti maturi. I fattori di trascrizione PPAR- α e C/EBP α aumentano durante la differenziazione dei pre-adipociti e sono importanti in due fenomeni: nell'adipogenesi e nell'acquisizione della sensibilità all'insulina. La presenza di cellule senescenti nel tessuto adiposo, tramite il rilascio di molecole come la MCP-1, causa l'infiltrazione del tessuto da parte dei macrofagi, che induce l'infiammazione del tessuto adiposo, responsabile dell'insulino-resistenza nei diabetici. Il fenotipo SASP e la senescenza cellulare alterano, anche, il processo autofagico, responsabile della senescenza oncogene-indotta. Inoltre gli effetti della senescenza sul tessuto adiposo, riducono la sua capacità di accumulare riserve di grasso e portano alla liberazione di acidi grassi liberi, che, essendo tossici, causano disfunzione cellulare nel diabete. Il grasso si va ad accumulare nel fegato, nei muscoli e nel cuore, dove provoca insulino-resistenza e le complicanze tipiche del diabete. La lipotossicità contribuisce infine anche alla disfunzione delle cellule β , all'aterosclerosi, alla disfunzione renale e alla demenza.

La senescenza cellulare e il fenotipo SASP sono dei fattori importanti nello sviluppo delle complicanze tipiche del diabete: problemi cardiovascolari, disfunzione renale, retinopatia, alterazione delle isole pancreatiche, neuropatia, nefropatia, disfunzioni cognitive e infezioni(29).

SCOPO DELLA TESI

Come si evince da diversi studi esiste una stretta associazione tra le malattie età-correlate, tra cui il diabete, e uno stato di infiammazione cronica. I macrofagi sono degli attori fondamentali nello svolgimento del processo infiammatorio. In assenza di uno stimolo infiammatorio rimangono “quiescenti” e prendono il nome di M0; in presenza di molecole batteriche (LPS) o citochine infiammatorie (IFN- γ) si ha l’attivazione classica o infiammatoria dei macrofagi, che prendono il nome di M1, svolgono la fagocitosi e producono molecole infiammatorie (TNF- α , IL-1 β , IL-6); in presenza di molecole anti-infiammatorie (IL-4, IL-13, IL-10, TGF- β) si ha l’attivazione alternativa dei macrofagi, che prendono il nome di M2 e che rimuovono le cellule e i tessuti danneggiati e promuovono l’angiogenesi e il rimodellamento tissutale. Lo scopo del presente studio è quello di valutare gli effetti dell’iperglicemia nel modulare il fenotipo dei macrofagi. Partendo da cellule THP-1 (human monocytic cell line derived) si sono ottenuti dei macrofagi M0 grazie all’azione della PMA 100 ng/ml, successivamente ne è stata indotta la differenziazione in M1 e M2 grazie all’azione rispettivamente del LPS e dell’IL-4/IL-13; infine i macrofagi sono stati sottoposti ad una condizione di iperglicemia. In un secondo momento, grazie all’utilizzo di tecniche di biologia molecolare, si sono confrontati i livelli di espressione di diverse citochine e microRNA pro-infiammatori e anti-infiammatori tra i macrofagi normoglicemici e quelli iperglicemici. I risultati sono stati confermati dall’analisi delle proteine tramite la tecnica del Western Blotting.

MATERIALI E METODI

1. Modelli cellulari

Per lo sviluppo di questa tesi sono state allestite delle colture di THP-1. La linea THP-1 deriva da monociti isolati dal sangue periferico di un soggetto affetto da leucemia mieloide acuta (AML). Si tratta di una linea cellulare immortalizzata, che ha acquisito la capacità di proliferare in modo indefinito grazie a mutazioni casuali o modifiche apposite. Le cellule THP-1 sono utilizzate come modello per studiare i processi differenziativi dei monociti e dei macrofagi e per analizzare dei processi fisiologici tipici dei macrofagi.

Le THP-1 vengono coltivate in sospensione e il terreno utilizzato per l'allestimento delle colture è l'RPMI 1640 (Euro Clone), con il 10% di FBS (Siero Fetale Bovino), l'1% di Glutamina e l'1% di Penicillina e Streptomicina. Le cellule vengono coltivate in un incubatore in condizioni controllate: 37°C, 5% di CO₂ e 90% di umidità circa.

Per differenziare le THP-1 in macrofagi è stata utilizzata la PMA (phorbol 12-myristate 13-acetate) ad una concentrazione di 100 ng/ml. Lo stock iniziale di PMA è di 1 mg/ml, la sostanza viene poi diluita in RPMI 10% FBS. Le cellule vengono messe ad incubare per 24 h e dopo un giorno si possono ottenere delle THP-1 con un fenotipo M0.

Abbiamo proceduto a differenziare i macrofagi M0 in:

- Macrofagi con un fenotipo M1 (pro-infiammatori): aggiungo al terreno LPS(15 ng/ml) in RPMI 10% FBS per 48 h. Il lipopolisaccaride (LPS) è uno dei componenti della parete cellulare dei batteri gram-negativi e viene dunque usato come induttore pro-infiammatorio per eccellenza.
- Macrofagi con un fenotipo M2 (anti-infiammatori): aggiungo al terreno IL-4 (25 ng/ml) e IL-13 in RPMI 10% FBS per 48 h.
- Macrofagi con fenotipo indotto da iperglicemia (HgSM): iperglicemia = 60 mM. Per raggiungere questa concentrazione si aggiungono 0,2 g di glucosio in 20 ml di terreno (il terreno di partenza contiene 11 mM di glucosio). Il terreno viene filtrato con filtro da 0,2 µm. Per arrivare ad un fenotipo HgSM risospendo le cellule in RPMI 10% FBS e PMA e incubo per 24 h.

2.Saggio della β -galattosidasi

La β -galattosidasi è un enzima idrolitico che catalizza l'idrolisi dei residui terminali di β -D-galattosio nei polisaccaridi noti come β -galattosidi, tramite la rottura dei legami beta-glicosidici terminali. L'attività della beta-galattosidasi associata alla senescenza (SA-betagal), rilevabile ad un pH di 6, permette di identificare le cellule senescenti presenti in coltura(30). Per determinare l'attività dell'enzima è stato utilizzato il Senescence Detection Kit, che contiene:

- Fixative solution (1X)
- X-Gal (150 mg, liofilizzata)
- Staining solution (1X)
- Staining Supplement (100X)

Il Kit sfrutta la reazione enzimatica della β -galattosidasi che prevede l'idrolisi del substrato X-gal, con formazione di un prodotto di colore blu, visibile al microscopio ottico.

Il protocollo prevede:

- Rimozione del terreno e lavaggio delle cellule con 500 μ L di PBS (Phosphate-buffered saline), pH 7.4
- Fissaggio delle cellule o delle sezioni di tessuto congelate con 300 μ l di Fixative Solution per 10-15 minuti a temperatura ambiente
- Ricoprire una Falcon da 15 ml con un foglio di stagnola per impedire alla luce di alterare l'attività della X-gal (fotosensibile) presente nella mix
- Procedere con i calcoli per la preparazione della mix nella falcon. Per un 1 pozzetto di una piastra da 24 well:
 - a) Staining Solution 282 μ l
 - b) Staining Supplement 3 μ l
 - c) X-gal 15 μ l (20 mg/ml DMSO)
- Lavaggio delle cellule per due volte con un 500 μ l di PBS
- Aggiungere 300 μ l di Staining Solution Mix in ogni pozzetto
- Coprire la piastra con la stagnola e lasciare overnight in stufa a 37°C
- Procedere successivamente con la conta:

Per valutare la percentuale di cellule β -gal positive si procede con la conta al microscopio ottico. La conta deve essere fatta in maniera casuale, contando almeno 200 cellule per pozzetto, sommando le cellule blu (il colore è dato dalla presenza di un precipitato intracellulare insolubile) e cellule incolore. Al microscopio ottico, il colore blu e la presenza di un precipitato intracellulare insolubile indicano la positività delle cellule alla SA- β -gal; la percentuale delle cellule beta gal positive è stata determinata contando almeno 200 cellule per campione.

3. Analisi lunghezza telomeri

La valutazione della senescenza cellulare si effettua, anche, andando ad analizzare la lunghezza telomerica. I telomeri sono composti principalmente da DNA ripetuto (31). Abbiamo utilizzato un protocollo di amplificazione in Real Time PCR.

Metodica:

1. Preparare la scala di diluizioni del DNA genomico per costruire la retta di taratura, sapendo che la concentrazione del DNA è di 200 ng/ μ l. Il volume totale è di 100 μ l.

Concentrazioni	Volume DNA genomico	H₂O
6 ng/ μ l	3 μ l	97 μ l
3.5 ng/ μ l	58.3 μ l	41.7 μ l
2.08 ng/ μ l	59.5 μ l	40.5 μ l
1.23 ng/ μ l	59.1 μ l	40.9 μ l
0.73 ng/ μ l	59.3 μ l	40.7 μ l
0.43 ng/ μ l	58.9 μ l	41.1 μ l
0.25 ng/ μ l	58.1 μ l	41.9 μ l

Tabella 1. Questa tabella mostra i componenti necessari per costruire la retta di taratura necessaria per eseguire l'analisi della lunghezza dei telomeri

2. Dopo aver quantificato i campioni di DNA al Nanodrop si prepara una aliquota di campione con concentrazione pari a 3 ng/ μ l in un volume totale di 30 μ l
3. Preparare la Mix per la Real-Time PCR per i telomeri e per il normalizzatore, che è un gene in singola copia (36B4). Considerare che i campioni e il

calibratore, vanno analizzati in doppio, e deve essere considerato anche un pozzetto per il bianco.

MIX TELOMERI

Reagenti	Quantità
Tel 2	1.35 µl
Tel 1	0.4 µl
Sybr Green	7.5 µl
H ₂ O	0.75 µl

Tabella 2. Mix telomeri

MIX NORMALIZZATORE (36B4)

Reagenti	Quantità
Primer Forward	0.45 µl
Primer Reverse	0.45 µl
Sybr Green	7.5 µl
H ² O	1.6 µl

Tabella 3. Mix normalizzatore

4. Mettere nelle apposite eppendorf 10 µl di Mix e 5 µl di campione e caricare sul Rotor Gene.

4.Estrazione RNA

Per valutare il livello di espressione delle citochine, dei microRNA e degli RNA messaggeri, si è estratto l'RNA prima dalle sole cellule THP-1 differenziate e poi dalle THP-1 messe in co-coltura con le h-MADS. L'RNA totale estratto è stato isolato con un kit per la purificazione dell'RNA, che sfrutta una cromatografia su mini colonna a scambio ionico (Norgen Biotek, Thorold, ON, Canada).

Procedimento:

1. Sotto cappa fare un lavaggio con il PBS
 - a) Togliere il terreno con la pipetta elettrica
 - b) Aggiungere PBS
 - c) Mescolare facendo movimenti a croce
 - d) Rimuovere il PBS
2. Aggiungere 350 µl di buffer di lisi e tenerlo in posa meno di 5 minuti
3. Osservare al microscopio (se non sono visibili membrane cellulari significa che le cellule sono lisate)
4. Procedere con lavaggi energici per portare tutto sul fondo
5. Mettere in una eppendorf
6. Aggiungere 200 µl di etanolo 96-100% in ogni eppendorf
7. Trasferirsi sul bancone di lavoro dopo aver pulito il piano di lavoro e gli strumenti. È fondamentale effettuare una pulizia accurata e lavorare in sterilità per evitare la distruzione dell'RNA da parte delle RNAsi. Le ribonucleasi o RNAsi sono delle nucleasi che catalizzano l'idrolisi dell'acido ribonucleico, che viene così scisso in componenti più piccoli. Le RNAsi sono estremamente comuni e sono presenti anche sulle nostre mani, ecco perché è così importante lavorare in condizioni di assoluta sterilità.
8. Mescolare i campioni con il vortex e tenerli in ghiaccio
9. Prelevare un'aliquota di 600 µl dalle eppendorf e distribuirla nelle rispettive colonnine con filtro
10. Centrifugare un minuto a 7000 RPM (l'acido nucleico è stato raccolto nel filtro)
11. Procedere con 3 lavaggi successivi dispensando ogni volta 400 µl della soluzione di lavaggio (wash solution) e centrifugare ogni volta per 1 minuto a 11.000 RPM

12. Centrifugare ancora una volta per 2 minuti a 13.000 RPM per asciugare il filtro
13. Mettere un conetto pulito sotto la colonnina, nel quale poi andrà a finire il nostro acido nucleico
14. Mettere 50-40 μ l di soluzione di eluizione che stacca l'acido nucleico dal filtro. Spargere bene la soluzione di eluizione su tutto il filtro con la pipetta, in modo circolare
15. Centrifugare per 2 minuti a 2000 RPM per spargere bene la soluzione in tutto il filtro
16. Centrifugare ancora 1 minuto a 14.000 RPM per far scendere l'acido nucleico
17. Tenere i campioni ottenuti in ghiaccio e analizzarli al Nanodrop avendo così dei primi risultati. Con questo strumento andiamo a quantizzare e a valutare la purezza del nostro RNA estratto

Tale strumento sfrutta la capacità degli acidi nucleici di assorbire la luce UV, con un massimo di assorbimento ad una lunghezza d'onda di 260 nm, e permette di studiare inoltre la purezza dell'acido nucleico, utilizzando i rapporti di assorbanza. Il rapporto A260/230, indice di contaminazione da carboidrati e fenoli, dovrebbe presentare valore ottimale a 2,2; il rapporto A260/280, indice di contaminazione proteica, dovrebbe essere compreso tra 1,8 e 2.

18. I campioni possono essere conservati a -20°C per alcuni giorni o a -80°C per tempi più lunghi.

5.Retrotrascrizione microRNA(miRNA)

L'RNA isolato in precedenza deve essere retro-trascritto per ottenere molecole di cDNA. Per fare ciò si sfrutta l'azione di un'enzima, la trascrittasi inversa. La trascrittasi inversa è una DNA polimerasi RNA-dipendente che catalizza la sintesi di DNA usando come stampo una molecola di RNA. Questa polimerasi è presente in particolari tipi di virus con genoma a RNA, i retrovirus. Nel caso della formazione di cDNA, la presenza della coda di poli-A nel trascritto di mRNA può essere utilizzata per facilitare la reazione di retrotrascrizione attraverso l'utilizzo di un primer del tipo oligo(Dt) che si ibriderà alla coda di poli-A. La trascrittasi inversa estenderà questo primer utilizzando l'RNA messaggero come stampo, producendo così una copia di cDNA a singolo filamento. Il risultato è una molecola a doppio filamento, ibrido tra DNA e RNA. L'RNA verrà parzialmente degradato dalla RNasi A, una specifica RNasi in grado di degradare molecole a doppio filamento, che lascia il filamento di cDNA in una forma che è in larga parte a singolo filamento. Tali molecole a singolo filamento tendono a formare strutture secondarie ripiengendosi su se stesse, creando così una forcina all'estremità 3' che, assieme ai resti del filamento di RNA, sarà poi usata dalla DNA polimerasi I come primer del secondo filamento.

Il kit utilizzato è il TaqMan MicroRNA Reverse Transcription. Tutti i reagenti del kit si trovano nel frigo a -20°C e sono:

Mix	X1
dNTPs 100 mM→diluizione 1:10	1 µl
10X buffer	1 µl
Primers	2 µl
Reverse transcriptase	0.67 µl
RNA inhibitor→diluizione 1:10	1.26 µl
H ₂ O	0.73 µl
totale	6.66 µl

Tabella 4. Mix retro-trascrizione della TaqMan per i microRNA

Metodica:

- Prendere dal frigo e scongelare: primer specifici per la sequenza del MiR; dNTP 100 mM; trascrittasi inversa; buffer 10X; inibitori per l'RNasi; acqua
- Diluire i campioni se necessario 1:10 o 1:20
- Centrifugare i reagenti per portare le soluzioni sul fondo
- Alloggiare sul porta-provette tutte le eppendorf che servono per l'analisi
- Preparare la mix calcolando le aliquote tenendo in considerazione il numero dei campioni +1:
 - a) Diluire i dNTPs 100 mM 1:10
 - b) Diluire gli inibitori 1:10
 - c) Aggiungere il resto dei reagenti citati in precedenza
- Distribuire 3.34 μ l di campione per ogni eppendorf da 0.2 μ l
- Dispensare 6.66 μ l di mix
- Centrifugare le eppendorf e inserirle nel termociclatore automatico e selezionare il programma RT-MIX, che prevede l'esecuzione del seguente ciclo:
 - a) 16°C 30 minuti
 - b) 42°C 30 minuti
 - c) 85°C 5 minuti
 - d) 4°C overnight

6.Real-Time PCR

La Real-Time PCR (qPCR) è una PCR che permette di quantificare il cDNA presente nel campione durante l'amplificazione dello stesso. Ciò è possibile grazie all'utilizzo di sonde fluorescenti, complementari alla sequenza d'interesse, che emettono un segnale durante la reazione a catena della polimerasi. Tale segnale fluorescente viene trasformato in valore numerico da un software collegato al lettore ottico interno al termociclatore, e così rilevato. L'intensità di fluorescenza viene monitorata continuamente e risulta direttamente proporzionale al cDNA e, conseguentemente, all'RNA di partenza. Anche in questa fase, campioni e reagenti vanno mantenuti sempre in ghiaccio e manipolati con materiale dedicato. Importante è dividere gli ambienti del laboratorio per lo svolgimento delle diverse fasi, a partire dall'estrazione, retro-trascrizione, fino all'allestimento della Real-Time: tutto ciò per evitare qualsiasi contaminazione crociata. Inizialmente si procede con l'allestimento delle mix, anche in questo caso tante quanti sono i miRNA da analizzare. Ogni campione viene studiato in doppio; inoltre si considera sempre un volume superiore rispetto al numero di campioni per i possibili problemi di dispensazione. La mix per la Real-Time prevede un numero minore di reagenti rispetto alla retro-trascrizione.

H ₂ O	1.84 µl
Mix Real Time	5 µl
Sonda	0.5 µl

Tabella 5. Mix Real-Time PCR per i microRNA

La Mix Real-Time è fornita già pronta come 2X TaqMan Universal Master Mix; le sonde utilizzate sono di tipo TaqMan.

Una volta pronte, le mix vengono centrifugate e dispensate in strip costituite da quattro pozzetti da 0,1 µl. Anche in questo caso, il volume finale totale deve essere di 10 µl: si dispensano 7,34 µl di mix e 2,66 µl di campione retro-trascritto cDNA, fatto correre in doppio, come già detto. Le eppendorf vengono poi chiuse con appositi tappi: in questa fase è importante segnare il verso delle provette, per evitare di scambiare i campioni. A questo punto possono essere poste nella macchina Rotor-Gene Q

Qiagen, mantenendo la giusta posizione e bilanciando tutti i campioni, poiché la macchina funge anche da centrifuga. Si seleziona il seguente protocollo di amplificazione:

- 1) 95°C 10 minuti
- 2) 95°C 15 secondi
- 3) 60°C 1 minuto

Gli ultimi due passaggi vengono ripetuti per 40 cicli.

Le sonde TaqMan da aggiungere alla mix di Real-Time sono marcate con due fluorocromi, il reporter ed il quencher. Il reporter emette fluorescenza ed è legato all'estremità 5' dell'oligonucleotide; il quencher, legato all'estremità 3', spegne la rilevazione di fluorescenza emessa dal reporter quando si trova nelle sue vicinanze.

Quindi, finché la sonda è unita e i due fluorocromi vicini, non si avrà emissione di fluorescenza. Durante l'amplificazione la TaqMan si lega specificatamente alla sequenza complementare tra i siti dei primer forward e reverse.

Durante il processo di polimerizzazione, la DNA polimerasi, contenuta all'interno della Mix Real-Time, si lega al frammento di DNA da amplificare. Nel caso in cui si trovi ancorata al filamento di DNA d'interesse (e solo in tal caso), la sonda viene rotta con attività 5'→3' esonucleasica: in questo modo il quencher ed il reporter si separano e quest'ultimo è libero di emettere fluorescenza, che viene rilevata dalla macchina.

Ad ogni ciclo si avrà un aumento esponenziale della fluorescenza, direttamente proporzionale alla quantità di prodotto. L'aumento del segnale fluorescente si ha solo nei casi in cui la sequenza target sia complementare ed amplificata: così amplificazioni non specifiche non sono rilevate.

La corsa completa dura circa 80/90 minuti. È possibile valutare i risultati conclusivi a fine corsa oppure durante il processo di amplificazione stesso: la fluorescenza viene emessa in tempo reale e la macchina legge il segnale alla fine di ogni ciclo. Ogni campione è rappresentato da una curva di amplificazione con andamento sigmoide. I primi cicli, in cui non è misurabile la variazione nel segnale di fluorescenza, definiscono la linea base (baseline) della curva. Un aumento di fluorescenza oltre la linea base indica il rilevamento del prodotto in fase di accumulo. Un secondo parametro importante è la linea soglia (Threshold), parallela alla linea base. Questa deve tagliare le curve dei campioni nella loro fase di crescita esponenziale: viene

scelta dall'operatore e varia per ogni seduta. Infatti nella fase esponenziale è possibile misurare la quantità di amplificato, proporzionale al numero di cicli, con resa teorica al 100%.

Il Ct, ciclo soglia o threshold cycle, è il numero del ciclo in cui la curva di amplificazione del campione in fase esponenziale taglia la linea soglia ed è un indicatore fedele della quantità iniziale di RNA.

Si trova a circa 2/3 della retta e rappresenta il ciclo a cui si rileva una fluorescenza che supera il segnale di fondo.

Dopo la fase esponenziale si ha la fase di plateau, poiché il processo di amplificazione è limitato dalla quantità di primers, dall'attività dell'enzima e dal reannealing dei filamenti, e la resa diminuisce.

Valutando il valore dei Ct di ogni campione si ricava la concentrazione iniziale di RNA secondo una proporzionalità inversa.

Le curve di amplificazione di una Real-Time PCR possono essere rappresentate in scala lineare o in scala logaritmica .

Analisi Real Time PCR

Ottenuti i dati, si possono quantizzare in diversi modi. La quantizzazione assoluta si basa sulla costruzione di una curva standard di campioni a concentrazione nota saggiati nelle medesime condizioni dei campioni che cerchiamo. La curva mette in relazione i Ct con le copie iniziali di campione. Vengono in questo modo calcolate le concentrazioni iniziali di cDNA dei campioni sconosciuti tramite interpolazione dei loro Ct con la curva standard.

Nel nostro caso scegliamo una quantizzazione relativa. Si utilizzano normalizzatori, geni di riferimento, solitamente geni housekeeping, normalmente espressi in tutte le cellule in maniera costante: i valori di Ct dei miR d'interesse vengono confrontati con i Ct di questi geni. Durante la stessa corsa di Real-Time PCR, i miRNAs d'interesse ed il miRNA normalizzatore vengono amplificati nelle medesime condizioni.

Ad oggi non sono ancora stati descritti normalizzatori standardizzati per i miRNAs. Inoltre alcuni di questi controlli endogeni vengono comunque degradati attraverso meccanismi poco chiari. Per questo, con lo scopo di ottenere risultati accurati e riproducibili, l'espressione relativa dei miRNA d'interesse è effettuata utilizzando

un normalizzatore sintetico, esogeno, il miRNA che aggiungiamo dalle prime fasi dell'estrazione: il microRNA di *Caenorhabditis elegans*, il cel-mir-39.

Per normalizzare il Ct ottenuto a fine corsa si calcola il ΔCt : per ogni campione si sottrae al Ct del miR d'interesse quello del normalizzatore. Dal ΔCt si ricava l'espressione relativa (Relative Expression) $=2^{-\Delta Ct}$. Questo valore assegna un dato numerico adimensionale, ad indicare i livelli di espressione del microRNA d'interesse normalizzati in ogni campione. È possibile inoltre confrontare il valore di un campione con il valore di un campione di controllo, tramite il $\Delta\Delta Ct$ e calcolando il Fold Change (X-fold) $=2^{-\Delta\Delta Ct}$.

Ciò indica l'aumento o la diminuzione di espressione del miR nel campione rispetto a quello di controllo.

7. Analisi dell'espressione degli RNA messaggeri

Dopo aver isolato l'RNA devo retro-trascriverlo in cDNA e per fare ciò utilizzo il kit Takara Prime Script RT reagent Kit with gDNA Eraser. Il kit si trova nel frigo a -20°C . Il primo step prevede l'eliminazione del DNA presente nel campione tramite l'utilizzo di DNasi. La DNasi fa parte delle desossiribonucleasi, un gruppo di enzimi che degradano il DNA idrolizzando il suo legame fosfodiesterico e liberando oligonucleotidi e mononucleotidi.

Reagenti per il primo step:

Reagenti	Quantità
5X gDNA Eraser Buffer	2 μl
gDNA Eraser	1 μl
RNA	Volume per avere una concentrazione di campione pari a 500 ng
H ₂ O RNase free	Volume per arrivare a 10 μl
Totale	10 μl

Tabella 6. Mix eliminazione DNA

Dopo aver preparato la mix incubare a 42°C per 2 minuti. Procedere al secondo step, la retro-trascrizione. Tenendo i campioni sempre in ghiaccio, preparare la master mix, costituita da :

Reagenti	Quantità
5X Prime Script Buffer 2	4 µl
Prime Script RT Enzyme Mix I	1 µl
RT Primer Mix	1 µl
H ₂ O RNase free	4 µl

Tabella 7. Mix retrotrascrizione RNA messaggeri

A questo punto aggiungere i 10 µl della Master Mix ai 10 µl della soluzione di reazione ottenuta nel primo step e caricare il tutto sul termociclatore, dove si andrà a selezionare il programma adeguato, che prevede:

- 1) 25°C 10 minuti
- 2) 42°C 15 minuti
- 3) 85°C 5 minuti
- 4) 4°C

Ottenuto il c DNA si può eseguire la Real-Time PCR. Preparare la Mix, costituita da :

Reagenti	Quantità
TB Green	5 µl
Primer Forward	0.2 µl
Primer Reverse	0.2 µl
H ₂ O	2.6 µl

Tabella 8. Mix Real-Time PCR RNA messaggeri

Caricare nelle apposite eppendorf 8.5 µl di mix e 1.5 µl di cDNA. Caricare i campioni sul Rotor Gene Q 5plex HRM (Qiagen). Ogni reazione è condotta in duplicato includendo sempre un controllo negativo, cioè una reazione dove il cDNA viene sostituito da acqua. Come normalizzatore solitamente si utilizza la GAPDH, la quantificazione dell'RNA messaggero è condotta utilizzando il metodo 2- Δ Ct. Come sempre il tutto va allestito in ghiaccio, adottando le adeguate misure di sicurezza per evitare la contaminazione dei campioni da parte dell'operatore e di microrganismi esterni:

- eseguire la retro trascrizione e la Real-Time PCR in due ambienti separati

- pulire in maniera accurata le superfici di lavoro e gli strumenti che verranno utilizzati per allestire le soluzioni di lavoro (pipette, puntali ecc)
- indossare sempre i guanti e il camice e cambiarli tra un'operazione e l'altra

8. Western Blot

Infine in questo studio è stata valutata l'espressione di alcune proteine da parte delle THP-1; a questo scopo si è utilizzato il Western Blot, una metodica a più step e che richiede circa 3 giorni per la sua esecuzione. Il Western Blot è una tecnica biochimica che permette di identificare una determinata proteina in una miscela di proteine, mediante il riconoscimento da parte di anticorpi specifici. La miscela di proteine viene prima separata in base alle loro dimensioni o peso molecolare utilizzando un gel di poliacrilammide; successivamente le proteine vengono trasferite su un supporto, che è comunemente una membrana di nitrocellulosa, e quindi si procede al riconoscimento vero e proprio della proteina mediante l'utilizzo di un anticorpo specifico.

8.1. Estrazione Proteine

Preparare Buffer di lisi 1 ml (RIPA BUFFER):

TRIS-HCl 1M	50 μ l
NaCl 1M	150 μ l
SDS 10%	10 μ l
NP40(detergente)	10 μ l \rightarrow TRITON 100 μ l
Na deoxicolato	Va pesato 5mg(0,005g)
Cocktail inibitori 7X	143 μ l per 1 ml
H ₂ O distillata	Portare a volume 1 ml

Tabella 9. Mix RIPA Buffer per estrazione proteine

Note:

- a) NaCl: si parte da una soluzione 5M, per ottenere una soluzione 1M in 10 ml→formula diluizione→2 ml di NaCl, portare a volume con 8 ml di H₂O distillata
- b) SDS: serve a denaturare le proteine, renderle lineari, e conferire loro carica negativa→migrano in base al PM (peso molecolare)
- c) Cocktail inibitori: si parte da una soluzione 7X, per ottenere una soluzione 1X in 1000μl→143μl

Metodica:

- Pesare il sodio deossicolato con la bilancia utilizzando una eppendorf da 1,5ml
- Aggiungere nell'eppendorf Tris-HCl, NaCl, SDS e NP40
- Aggiungere H₂O per portare a volume (547μl→perché vanno sommati i volumi dei vari componenti, compreso il cocktail di inibitori, anche se non viene messo subito)
- A seconda delle dimensioni del pellet mettere una certa quantità di RIPA buffer (di solito non più di 50μl). Se i pellet sono piccoli utilizzare 30μl di buffer per ogni campione, se i campioni sono 10→300μl totali di buffer. N.B. Devono essere aggiunti ancora gli inibitori
- Fare la proporzione→ $143:1000\mu\text{l}=x:300\mu\text{l}\rightarrow x=42,8\mu\text{l}$ di inibitori. Perciò $300\mu\text{l}-42,8\mu\text{l}=257,2\mu\text{l}$ di RIPA buffer da prendere dall'eppendorf da 1,5 ml preparata
- Mettere 30μl di RIPA buffer nei campioni contenenti il pellet con le proteine
- Lasciare in ghiaccio per 30 minuti
- Accendere la centrifuga refrigerata e mettere in centrifuga per 20 minuti
- Prendere tante eppendorf quanti sono i campioni
- Prelevare il sovrantante e metterlo nelle eppendorf
- Conservare i campioni in ghiaccio

8.2. Quantizzazione Proteine

Per la quantizzazione delle proteine è stato utilizzato un metodo colorimetrico, “metodo Bradford”, che si basa sul fatto che il colorante Bradford, quando si lega alle proteine, vira dal colore marrone al blu.

- Tenere il colorante al buio e diluirlo 1:1 con acqua → mettere una parte di acqua e una parte di Bradford
- Costruire una retta di taratura con la BSA (Albumina di siero bovino) al 5% in PBS Tween → sciogliere 2,5g di BSA in 50ml di PBS Tween

0	1µl Bradford
1	999µl Bradford+1µl BSA
2	998µl Bradford+2µl BSA
4	996µl Bradford+4µl BSA
6	994µl Bradford+6µl BSA
8	992µl Bradford+8µl BSA

Tabella 10. Retta di taratura con BSA e Bradford per la quantizzazione delle proteine

- Mettere 1µl di campione e 999µl di Bradford nelle provette
- Caricare 200µl per ogni eppendorf su una piastra da 96 pozzetti, che verrà letta allo spettrofotometro → ogni campione va caricato in triplicato
- Lo spettrofotometro fornisce i valori di assorbanza di ogni campione e della curva di taratura e la loro media, la concentrazione in µg/µl e dice quanto volume di campione prendere per avere una concentrazione di proteine pari a 30µg → es: THP-1 : 4,32µl campione+18,18µl H₂O+7,5µl di Laemli per un volume totale di 30µl.
- Si ottiene un grafico che presenta sull'asse delle ascisse la concentrazione di BSA e su quello delle ordinate l'assorbanza. Se il valore del coefficiente di determinazione (R^2) si avvicina a 1 vuol dire che la relazione tra le due grandezze è lineare (fig.5)

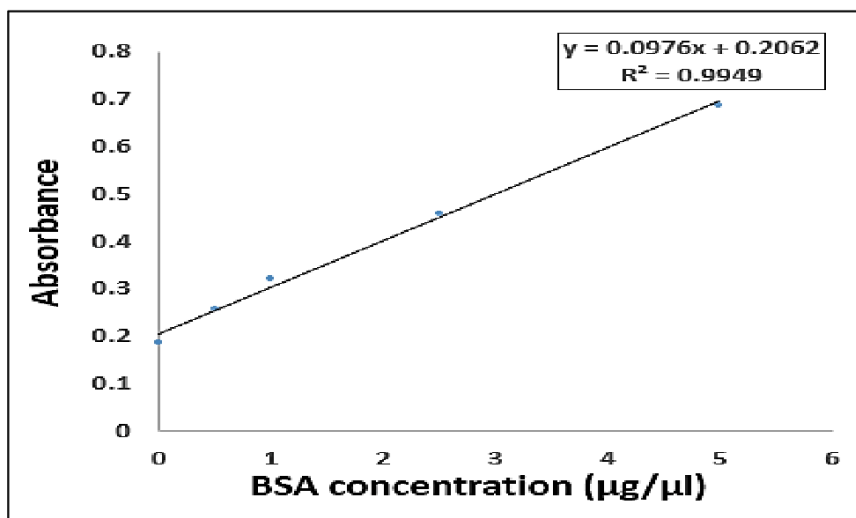


Figura 5. Grafico che mostra la relazione tra la concentrazione di BSA sull'asse delle ascisse e l'assorbanza sull'asse delle ordinate. In questo caso la relazione è lineare poiché il coefficiente di determinazione (R^2) è vicino a 1 (32).

8.3. Elettroforesi su Gel di Poliacrilammide

È necessario preparare l'apparato per la corsa:

- Lavare bene i vetri con alcool, assicurarsi che i vetri siano privi di pelucchi e di sporcizia osservandoli in controluce. Lavare con la carta imbevuta di alcool anche gli spacer
- Fissare i due vetri con in mezzo gli spacer sul supporto grigio, la parte trasparente è rivolta verso i ganci; prima di fissare i ganci assicurarsi che i vetri siano in linea e non ci siano spazi tra i vetri e gli spacer, in caso contrario il gel fuoriuscirebbe. Per far questo spingere i vetri verso il supporto. Stringere i ganci grigi. Infilare il supporto grigio su quello rosso, mettere i ganci neri e stringere.
- Testare la tenuta stagna del gel colandovi H₂O, con un pipettatore automatico

Preparazione separating buffer

Il separating buffer serve a separare le proteine durante la corsa. Preparare:

- Acrilamide 30%
- Separating buffer 5X
- APS 10%
- TEMED
- H₂O autoclavata

Il volume finale del gel è di 10ml (gel piccolo).

- Preparare il separating buffer in una falcon da 15ml e colarlo piano nel supporto del gel, per evitare la formazione di bolle (nella falcon devono rimanere circa 1-2ml)
- Versare circa 1ml di etanolo per livellare l'altezza del gel colandolo piano da un lato. Attendere che il gel solidifichi. Lasciare aperta la falcon per lasciar solidificare la soluzione (poi la falcon andrà buttata)

Preparazione dello stacking buffer

Lo stacking buffer serve a far entrare le proteine nel gel.

- Quando il gel con il separating buffer è solidificato togliere l'etanolo rovesciando il supporto, poi con il supporto a testa in giù assorbire con carta 3mm le gocce che scivolano giù
- Infilare il pettine inserendolo piano a partire da un lato. Assicurarsi che non ci siano bolle
- In una falcon da 15ml preparare 5 ml di stacking buffer, dispensando: H₂O distillata; stacking buffer 4X; acrilamide; APS; TEMED
- Dispensare la soluzione della falcon con il pipettatore automatico fino al bordo del vetro opaco, versando lentamente la soluzione da un lato. Assicurarsi che non ci siano bolle
- Attendere che il gel solidifichi. Lasciare la falcon aperta sotto cappa con il quantitativo rimanente; andrà poi buttata

Preparazione dei campioni

Per eseguire una corsa delle proteine, nel campione va caricato il Loading buffer (LB) Laemmli, che deve avere una concentrazione finale 1X. Questo buffer contiene un colorante, il blu di bromofenolo, per evidenziare la corsa delle proteine, e due agenti riducenti, SDS e beta-mercaptoetanololo, i quali servono a denaturare le proteine così da evidenziare eventuali epitopi nascosti e portare dunque tutte le proteine nella forma primaria o secondaria.

Il volume finale dei campioni da preparare è di 30 μ l; nei pozzetti che vengono utilizzati il volume massimo possibile è di 35 μ l. Al fine di avere un LB 1X, poiché si parte da un LB 4X, $4X \cdot X = 1X \cdot 30\mu\text{l}$; dunque per 30 μ l, si devono dispensare 7,5 μ l di LB. Per i campioni, sapendo la concentrazione, sulla base dei μ g di proteina massima che si possono prendere, stabilire i μ l di campione da analizzare. Al fine di avere in tutti i campioni lo stesso volume, aggiungere H₂O fino al volume di 30 μ l.

Dunque:

- Scongelare i campioni, l'LB e il marker
- Predisporre tante provette quanti sono i campioni
- Nominare le provette e dispensare nell'ordine H₂O, il campione e l'LB
- Incubare a 95°C nel thermomixer per 5 minuti precisi i campioni. Conservare il marker a temperatura ambiente durante questo lasso di tempo
- Al termine dell'incubazione spinnare i campioni con la centrifuga

Avvio della corsa su gel

- Quando il gel si è solidificato smontarlo dal supporto rosso, porre i due vetri più il supporto grigio su quello per la corsa, fissare con le pinze rosse e togliere il pettine
- Versare il running buffer nello spazio tra il gel e il supporto per la corsa e sulla vaschetta. Fare attenzione a non bagnare gli elettrodi. Il running buffer si trova concentrato 5X e lo devo diluire a 1X. Mettere sempre prima il running buffer e poi caricare i campioni
- Dispensare con la micro pipetta solo LB nei pozzetti che rimangono vuoti
- Caricare il marker a metà tra i campioni

- Verificare che ci sia sufficiente tampone sopra i pozzetti
- Chiudere con il tappo il tutto collegando gli elettrodi in modo corretto e impostare il voltaggio a 100. Avviare la corsa. Una volta che i campioni hanno superato lo stacking buffer impostare a 110 volt. La corsa richiede un tempo di 1,45h

8.4. Trasferimento su membrana di nitrocellulosa (trasferimento semidry)

Per il trasferimento su membrana serve un transfer buffer, costituito, se ne viene preparato 250ml da:

- a) Transfer buffer 5X → nella soluzione finale è 1X → $5X * X = 1X * 250ml$ → 50ml
- b) metanolo → 20% nella soluzione finale → 50ml
- c) 150ml di H₂O distillata per portare a volume

- Tagliare 4 fogli di carta 3mm 6,5X8,5
- Tagliare una membrana di nitrocellulosa 6,5X8,5
- Versare in due vaschette un po' di transfer buffer; in un vaschetta verranno bagnati i fogli di carta e la membrana, quindi questo buffer potrà essere poi riutilizzato (al termine del processo lo si riversa nel cilindro con il transfer gel), nell'altra sarà lavato il gel, questo buffer deve essere poi buttato
- Bagnare due fogli di carta nella prima vaschetta, scolare l'eccesso di liquido e disporlo sullo strumento nero per il trasferimento in posizione centrale se si ha solo una membrana
- Lavare la membrana nella prima vaschetta, scolare l'eccesso di liquido e disporla sopra la carta
- Togliere le pinze, riprendere i due vetrini, immergerlo nel transfer e togliere gli spacer e separare i due vetri aiutandosi con uno spacer, il gel rimane attaccato ad uno dei vetri
- Porre lo spacer sotto i pozzetti e inclinandolo a 45° tagliare di piatto e togliere i pozzetti

- Con lo spacer staccare il gel dal vetro e man mano che lo si tira via tenerlo ai lati con le mani e appoggiarlo sulla membrana
- Appoggiare sopra gli altri due fogli di carta bagnati di transfer e bagnare il tutto con il transfer
- Togliere le bolle rullando sopra ai fogli
- Chiudere lo strumento, appoggiarvi un peso; collegare la spina nera del coperchio alla base, collegare gli elettrodi e impostare l'amperaggio, pari al volume della membrana (6,5X8,5) per 0,8 (fattore di conversione). Il trasferimento si completa in circa 1h30'

8.5.Rilevazione delle proteine

1° giorno

- Quando il trasferimento è completato, riprendere la membrana, sciacquarla bene, metterla in una vaschetta e bagnarla con il ponceau, un colorante che evidenzia tutte le proteine. Sciacquare con abbondante H₂O deionizzata dopo qualche secondo, più volte
- Sciacquare con PBS Tween 1X, poi versare un po' di PBS Tween sulla vaschetta con la membrana e porre sull'agitatore per 10 minuti
- Preparare il latte
- Buttare il PBS e aggiungere nella vaschetta 5ml di latte (serve ad evitare legami aspecifici). Attendere 1h
- Diluire l'Ab primario 1:500 in latte (diluizione variabile in base all'Ab)
- Buttare il latte e sciacquare con PBS Tween 1X
- Versare nella vaschetta latte più Ab. Incubare overnight a 4°C dopo aver chiuso la vaschetta con coperchio o parafilm

2° giorno

- Recuperare il latte+Ab primario mettendolo nella falcon, lavare con PBS Tween 1X mettendone un po' sulla vaschetta, bagnarvi la membrana e buttarlo nel lavandino. Versare un po' di PBS Tween 1X nella vaschetta e attendere 10 minuti. Ripetere questo lavaggio per due volte (si fanno in totale tre lavaggi)

- Preparare la soluzione di latte sciogliendo 2,5g di latte in 50 ml di PBS Tween 1X. Sciogliere la soluzione sul vortex
- Preparare la soluzione di latte+Absecondario (conservato a 4°C) diluendo l'Ab nel latte
- Buttare il PBS Tween 1X, versare la soluzione dalla falcon con Ab secondario sulla membrana e attendere 40 minuti
- Trascorso questo tempo buttare il latte+Ab secondario. Sciacquare con un po' di PBS Tween 1X, ed effettuare 3 lavaggi con PBS Tween 1X, incubando ogni lavaggio per 10 minuti

Se non si intende procedere subito con i successivi passaggi, si può lasciare la membrana con PBS nella vaschetta chiusa a 4°C, o si può disporre la membrana direttamente su pellicola e conservare a 4°C

8.6. Visualizzazione membrana

- Bagnare la membrana con 1ml del Clarity Western ECL (Enhanced Chemiluminescence) Substrate della BioRad. Poiché l'Ab secondario è coniugato con la perossidasi di rafano per la sua rilevazione utilizzare come substrato il luminolo. In presenza di perossidasi e H₂O₂ il luminolo viene ossidato tramite una reazione di chemiluminescenza: si produce luce, la cui intensità può essere aumentata di 1000 volte con un intensificatore chimico.
- La membrana viene visualizzata tramite l'utilizzo di un trans illuminatore, l'UVITEC, che rileva la chemiluminescenza e quindi le proteine a cui si è legato l'Ab primario specifico e successivamente l'Ab secondario coniugato con la perossidasi. Il tempo di esposizione è inversamente proporzionale all'espressione della proteina.

RISULTATI

1. Differenziamento delle cellule THP-1 in macrofagi

Per la differenziazione della linea cellulare monocitica THP-1 (human monocytic cell line derived) in macrofagi è stata utilizzata la PMA (phorbol 12-myristate 13-acetate) ad una concentrazione di 100 ng/ml per 24 h. Si osserva come i monociti in sospensione vengono stimolati ad aderire sulla superficie del pozzetto (fig.6).

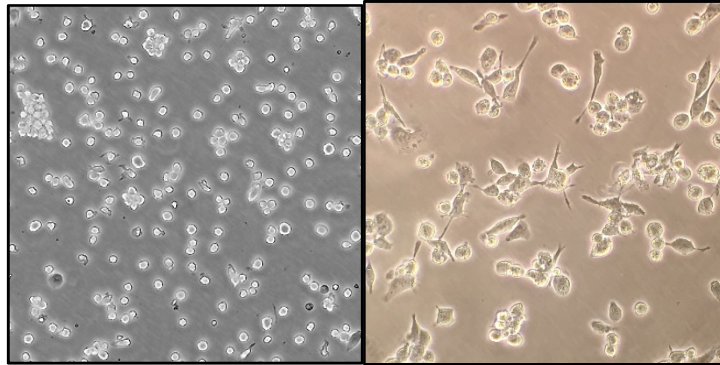


Figura 6. THP-1 differenziate dopo un'incubazione di 24h con la PMA 100 ng/ml.

I macrofagi adesi (M0) sono stati poi differenziati verso un fenotipo M1 (pro-infiammatorio) con LPS (lipopolisaccaride) ad una concentrazione di 25 ng/ml per 48h o verso un fenotipo M2 (anti-infiammatorio), grazie all'incubazione per 48h con IL-4 ed IL-13 ad una concentrazione di 25 ng/ml (fig.7).

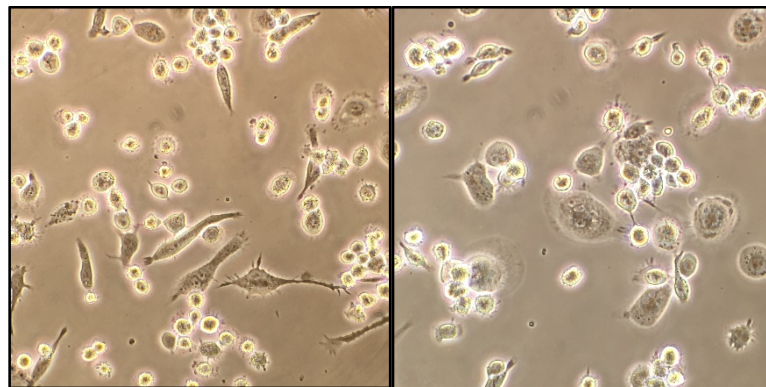


Figura 7. Macrofagi M0 differenziati in macrofagi M1 (pro-infiammatori) ed M2 (anti-infiammatori) dopo 48h di incubazione con ,rispettivamente, LPS 25 ng/ml e con IL-4/IL-13 25 ng/ml

2. Analisi del fenotipo dei macrofagi

Al fine di caratterizzare a livello molecolare i macrofagi differenziati è stata effettuata l'analisi in real-time PCR dei livelli di espressione di mRNA di citochine e molecole che intervengono nei processi infiammatori e di senescenza cellulare e degli inflammamiRs miR-21 e miR-146a e del miR-155(fig.8)(fig.9)(fig.10).

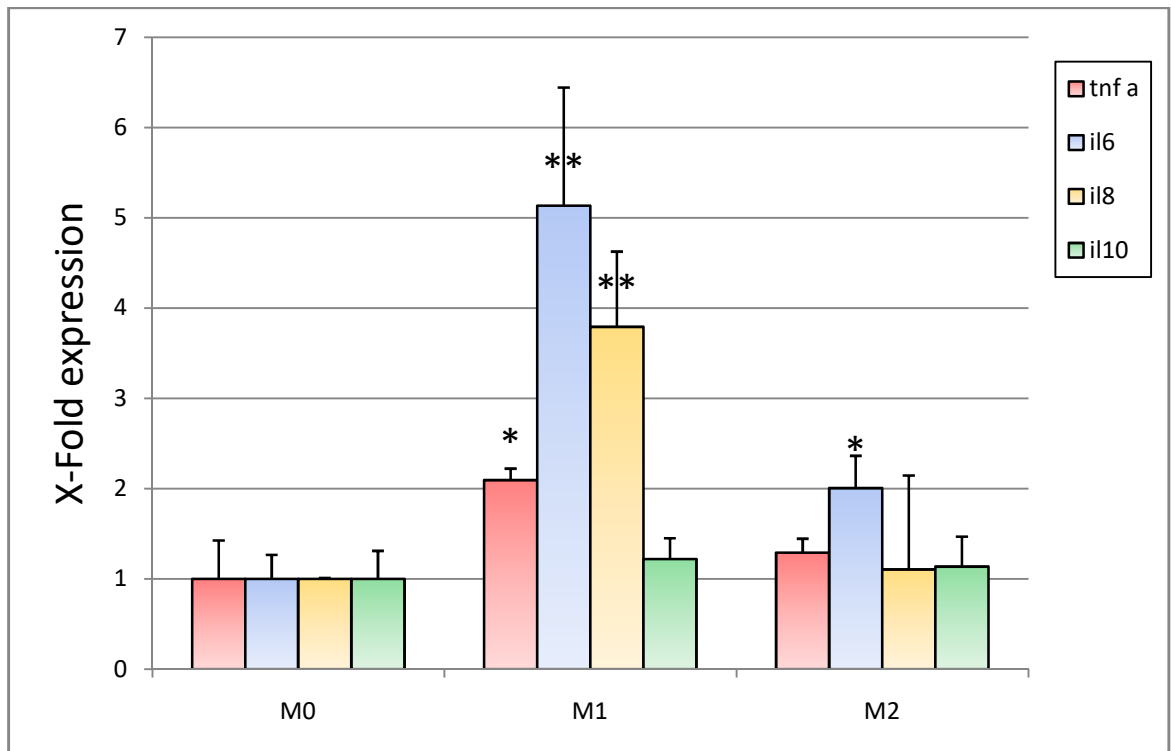


Figura 8. Il grafico mostra il livello di espressione di TNF- α , IL-6, IL-8 e IL-10 nei macrofagi M0, M1 ed M2

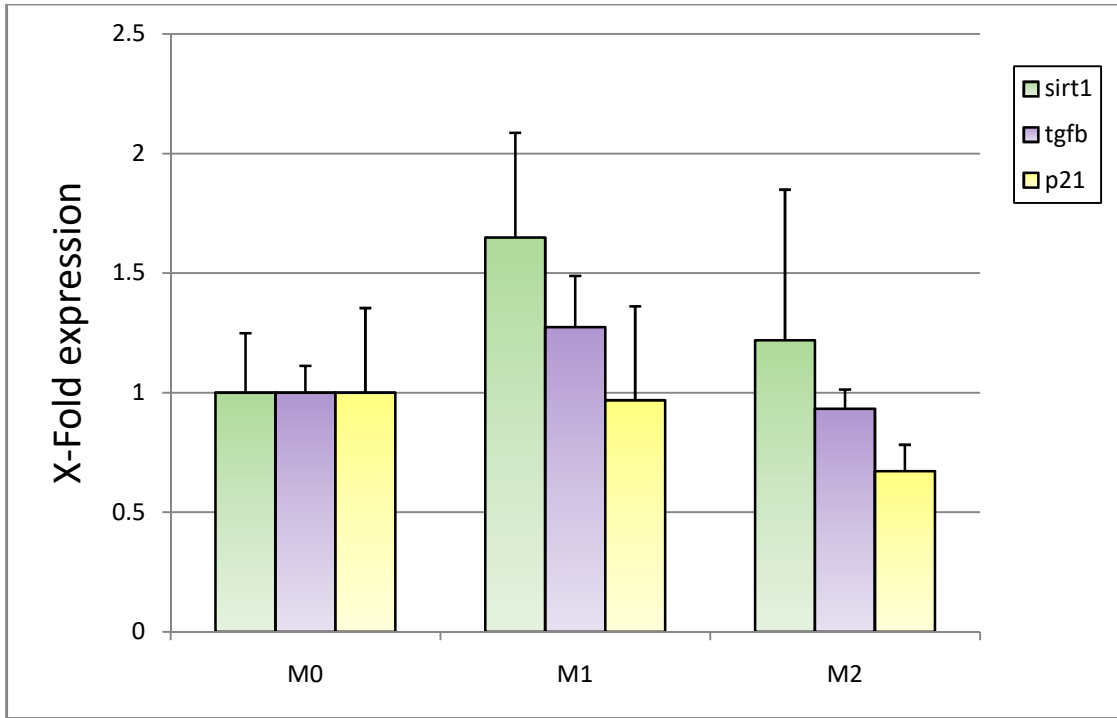


Figura 9. Il grafico mostra il livello di espressione nei macrofagi M0, M1 ed M2 di SIRT-1, TGF- β e p21.

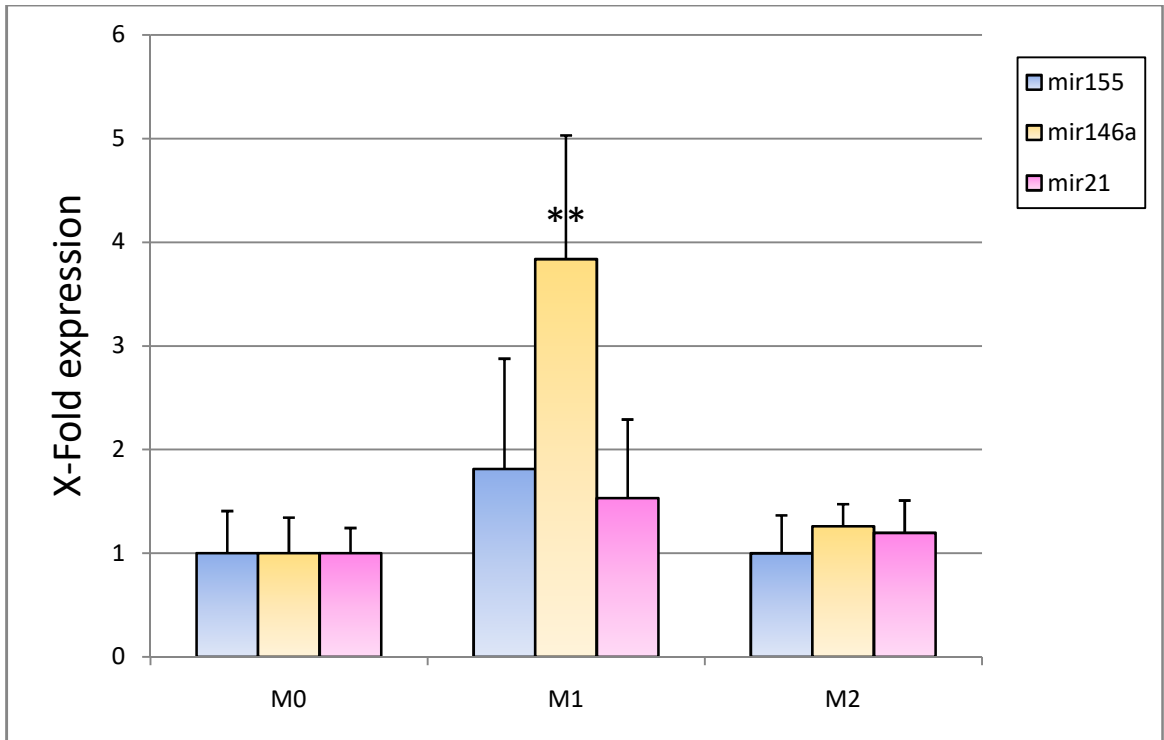


Figura 10. Il grafico mostra il livello di espressione nei macrofagi M0, M1 ed M2 di miR-155, miR-146a e miR-21.

Come si evince dalle figure 12,13 e 14 i macrofagi M1 esprimono IL-6, IL-8, TNF- α e il miR-146a in maniera significativamente maggiore rispetto agli M0 ed M2.

3.Trattamento dei macrofagi con iperglicemia

Con lo scopo di valutare se l'iperglicemia induce uno stato di senescenza cellulare nei macrofagi, i monociti THP-1 sono stati cresciuti in coltura con un'elevata concentrazione di glucosio (60nM) o in condizioni di normoglicemia (11nM) per una settimana.

Si è osservato come la proliferazione cellulare non sia significativamente variata in condizione di iperglicemia rispetto alla normoglicemia(fig.11).

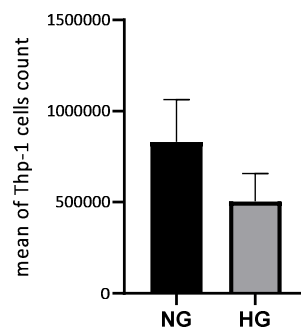


Figura 11. Il grafico riporta sull'asse delle ascisse le cellule in normoglicemia e quelle in iperglicemia e sull'asse delle ordinate il numero di cellule THP-1 proliferanti che sono state contate

4.Valutazione della senescenza sui macrofagi

Successivamente è stato eseguito il saggio della SA- β -Gal (β -galattosidasi associata alla senescenza) e l'analisi della lunghezza dei telomeri mediante real-time PCR. La percentuale di cellule beta-gal positive è risultata essere significativamente maggiore nei macrofagi trattati con iperglicemia rispetto alla condizione di normoglicemia(fig. 12).

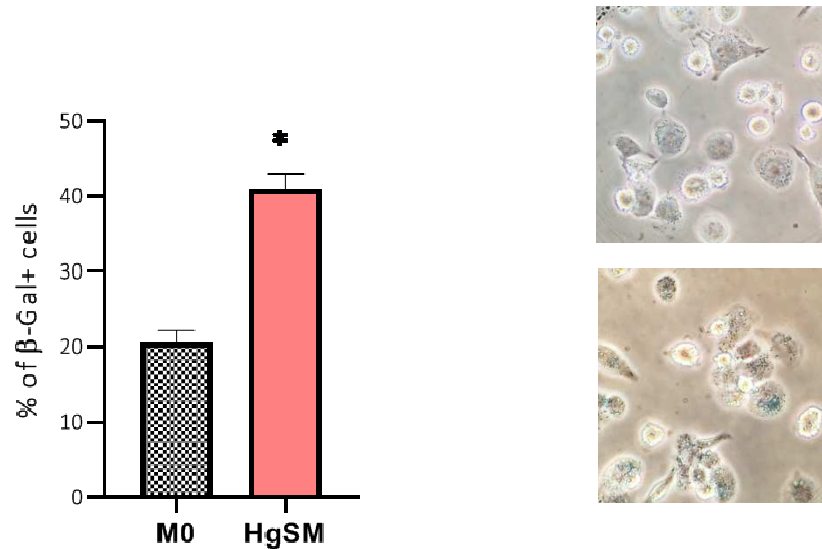


Figura 12. Le immagini mostrano lo stato di senescenza cellulare dei macrofagi sottoposti a iperglicemia. Lo stato di senescenza cellulare è messo in evidenza dalla presenza di un precipitato blu insolubile al loro interno, visibile al microscopio ottico, dovuto all'idrolisi del substrato X-Gal da parte dell'enzima β -galattosidasi. Il grafico riporta la differenza tra la percentuale di cellule positive alla β -galattosidasi presenti tra i macrofagi M0 e tra i macrofagi iperglicemici (HgSM).

Inoltre dall'analisi della lunghezza telomerica media si evince che un'elevata concentrazione di glucosio induce un accorciamento dei telomeri pari alla metà rispetto ai macrofagi M0, M1 e M2(fig.13).

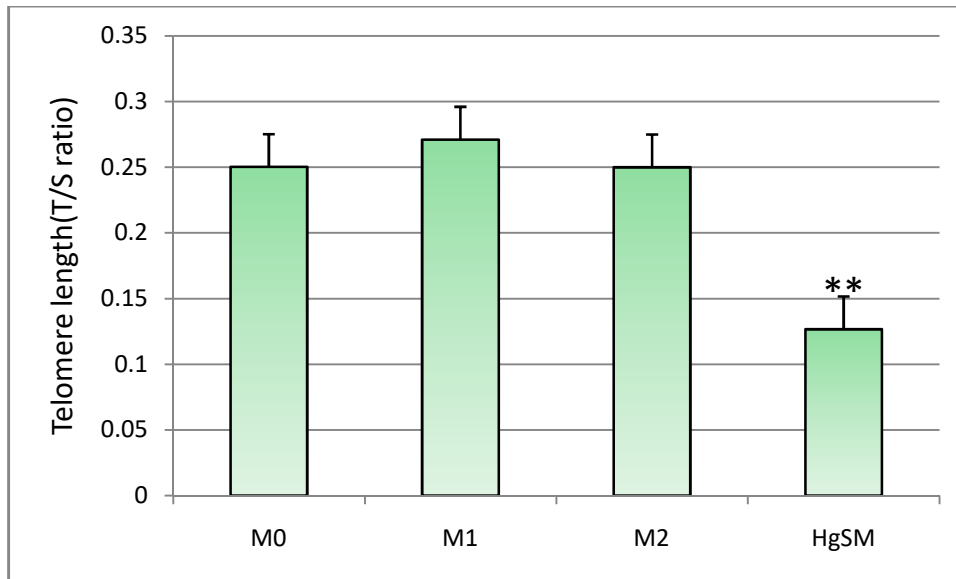


Figura 13. Il grafico confronta la lunghezza media dei telomeri nei macrofagi M0, M1, M2 e HgSM.. Sull'asse delle ordinate sono riportati i valori della lunghezza telomerica sottoforma di rapporto T/S tra l'intensità del segnale nella reazione di amplificazione del telomero rispetto a quella del gene a singola copia 36B4, codificante per una fosfoproteina ribosomiale acida.

5. Analisi del fenotipo dei macrofagi indotti a senescenza con iperglicemia (HgSM)

Per comprendere quale effetto induce l'iperglicemia sulla polarizzazione del fenotipo dei macrofagi è stata effettuata un'analisi di espressione genica con real-time PCR. Si sono valutati i livelli di espressione degli mRNA degli stessi geni analizzati per i macrofagi M0, M1 e M2 (fig.14)(fig.15)(fig.16).

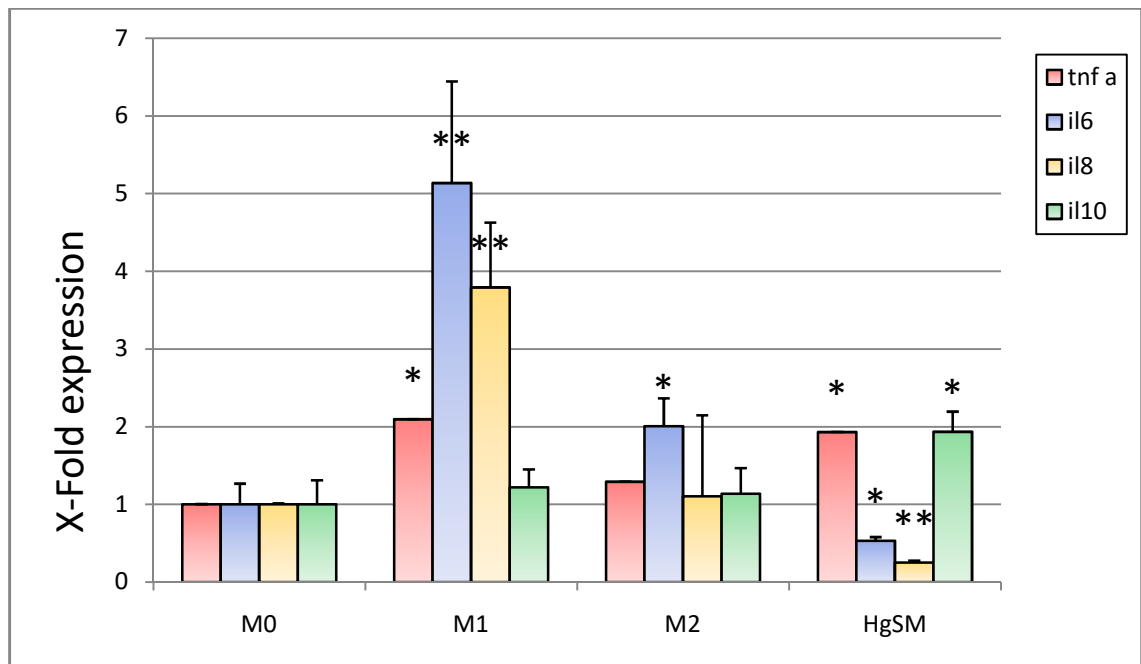


Figura 14. Il grafico mostra il livello di espressione di TNF- α , IL-6, IL-8 ed IL-10 nei macrofagi M0, M1, M2 e HgSM.

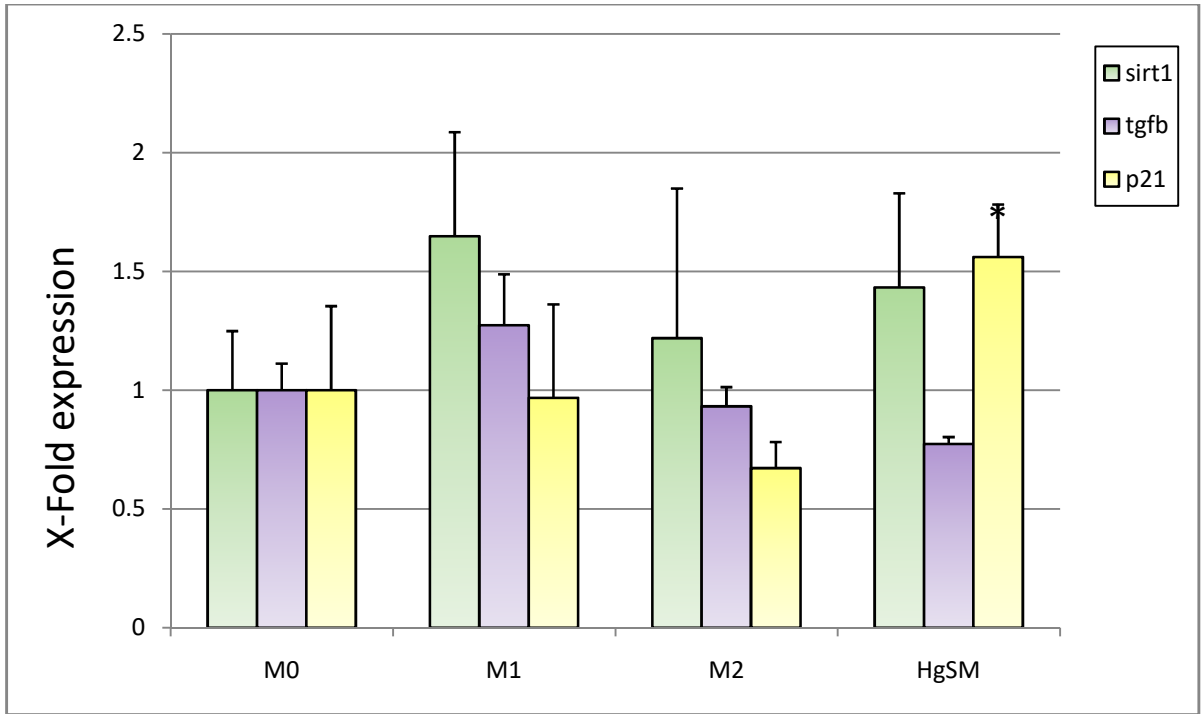


Figura 15. Il grafico mostra il livello di espressione di SIRT-1, TGF- β e p21 nei macrofagi M0, M1, M2 e HgSM

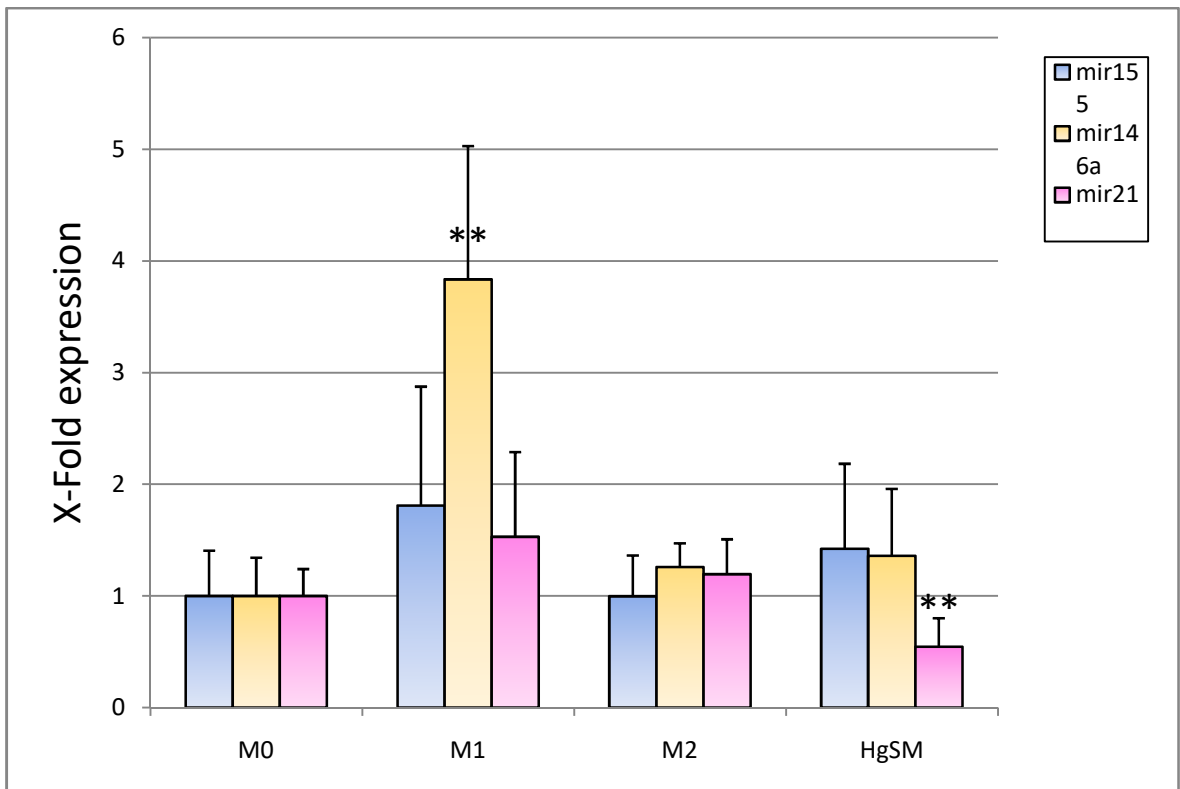


Figura 16. Il grafico mostra il livello di espressione di mir155, mir146a e mir21 nei macrofagi M0, M1, M2 e HgSM.

Come si evince dalle figure 17, 18 e 19 i macrofagi in iperglicemia (HgSM) mostrano un'elevata espressione di IL-10 e TNF- α e una ridotta espressione di IL-1 β , IL-6, IL-8 e mi-R21, variazioni significative rispetto ai macrofagi M0.

Il risultato mostra che il trattamento in iperglicemia per una settimana induce una polarizzazione dei macrofagi HgSM verso un fenotipo misto M1/M2.

6. Analisi del Western Blot

Infine, è stata analizzata l'espressione di diverse proteine coinvolte nel processo infiammatorio e di senescenza cellulare, mediante WB, da parte dei macrofagi normoglicemici (M0, M1, M2) e da parte dei macrofagi iperglicemici (HgSM).

L'analisi densitometrica del WB ha rivelato una riduzione dei livelli proteici di SIRT1, IKB- α e IL-1beta nei macrofagi in iperglicemia (HgSM) rispetto ai macrofagi M0, mentre vi è un aumento di espressione proteica di p21. Non si osserva attivazione della caspasi, che risulta aumentare significativamente solo nella condizione M1.

I dati dell'analisi WB sembrerebbero confermare la polarizzazione dei macrofagi HgSM verso un fenotipo misto M1/M2(fig.17)(fig.18).

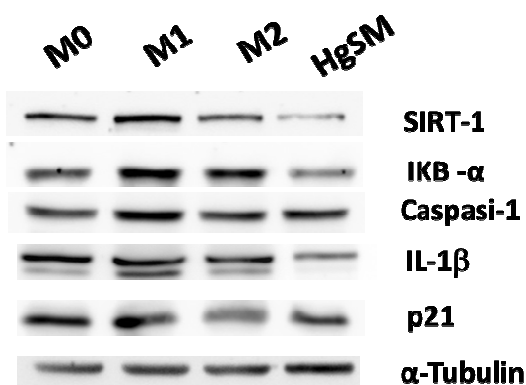


Figura 17. La figura mostra il livello di espressione delle proteine SIRT-1, IKB- α , Caspasi-1, IL-1 β , p21 e α -Tubulina nei macrofagi M0, M1, M2 e HgSM e la quantizzazione mediante analisi densitometrica.

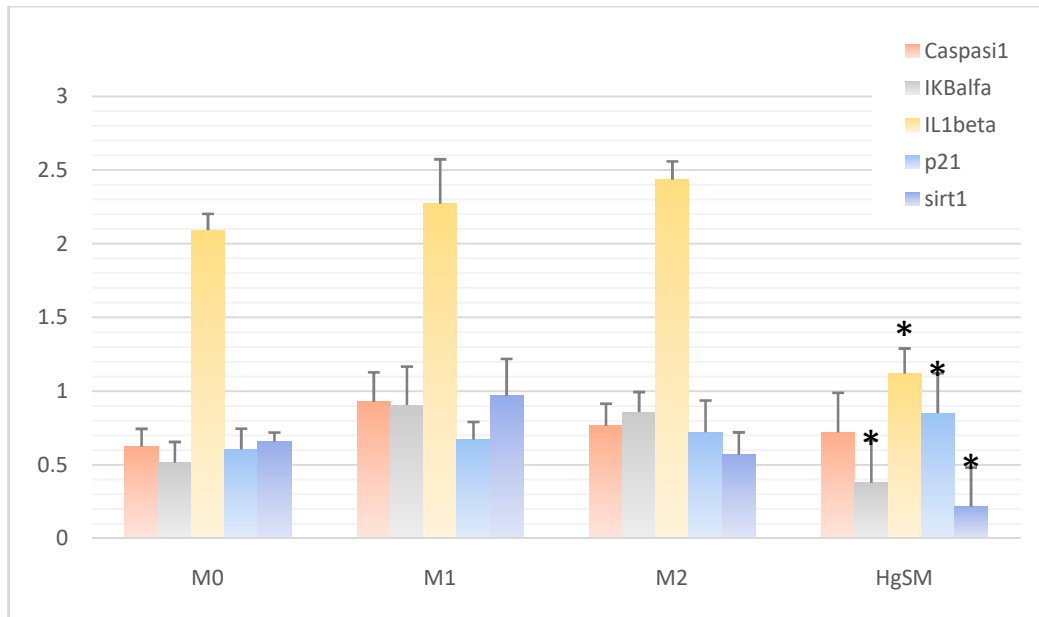


Figura 18. Densitometria del Western Blotting

Conclusioni

La relazione fra infiammazione e diabete, soprattutto diabete di tipo 2, è nota da tempo, così come l'accumulo di cellule senescenti caratterizzate da fenotipo pro-infiammatorio secernente. L'iperglicemia cronica è la caratteristica tipica della patologia diabetica, con conseguenze deleterie su cellule endoteliali e di altri tessuti.

Il ruolo dei macrofagi nel promuovere l'infiammazione associata al diabete tipo 2 è un altro elemento già noto da tempo. La scoperta che il macrofago poteva assumere diversi fenotipi, così come il linfocita T, ha aperto nuovi filoni di ricerca sulla polarizzazione dei macrofagi nell'ambito di diverse patologie umane. La polarizzazione dei macrofagi nell'ambito della condizione iperglicemica, resta ancora oggi un elemento di discussione:

In particolare, anche se sarebbe intuitivo ipotizzare una polarizzazione verso l'M1, il macrofago pro-infiammatorio che produce IL-1- e TNF-alpha, dati recenti di letteratura metterebbero in discussione questo assunto.

I risultati del lavoro presentato in questa tesi suggeriscono che, almeno in vitro, un macrofago umano M0 esposto ad elevate concentrazioni di glucosio per 7 giorni acquisisce un fenotipo intermedio fra M1 ed M2, in quanto esprime un' aumentata quantità di TNF-alpha ma al tempo stesso produce anche un' aumentata quantità di IL-10.

Mentre il TNF-alpha accende ed amplifica il processo infiammatorio a livello sia locale che sistemico, l'IL-10 ha attività di immunosoppressione, e questa capacità dei macrofagi in iperglicemia di scatenare l'infiammazione bloccando però l'attivazione delle cellule dell'immunità spiegherebbe perché il diabetico pur essendo pro-infiammato non risponde bene a stimoli stressogeni, come quelli infettivi.

Il macrofago in iperglicemia, acquisisce inoltre alcune caratteristiche di una cellula senescente, quale l'accorciamento dei telomeri, l'aumento di attività della beta galattosidasi e l'aumentata espressione della proteina p21.

Riguardo ai microRNA, il macrofago in iperglicemia sembra avere un profilo proinfiammatorio, perché non aumenta la produzione di miR-146 (che ridurrebbe la produzione di TNF-alpha), e al tempo stesso riduce la produzione di miR-21, anch'esso coinvolto nell'inibizione dello stato pro-infiammatorio.

Il dato presentato in questa tesi è molto innovativo ed apre la via alla comprensione dei meccanismi molecolari che legano l'iperglicemia tipica del diabetico all'aumentato stato infiammatorio del paziente associato però a ridotta risposta del sistema immunitario.

BIBLIOGRAFIA

1. **Pontieri, G.M.** *Patologia Generale & Fisiopatologia Generale-III Edizione*.s.l. :Piccin.
2. **Weiss M., Steiner DF, M.D., and Philipson LH, M.D., Ph.D.** *Insulin Biosynthesis, Secretion, Structure, and Structure-Activity Relationships-Review*.s.l. :Endotext, February 2014
3. **Brady MJ.** *IRS2 takes center stage in the development of type 2 diabetes*.s.l. : J Clin Invest., Oct 2004, Vol.114(7):886-888.doi:10.1172/JCI23108
4. **Giorgino F. (Medicina interna, Endocrinologia e Malattie metaboliche, Dipartimento dell'Emergenze e dei trapianti d'organo, Università degli studi di Bari).** *Il segnale intracellulare dell'insulina: complessità e interferenze nella trasmissione del messaggio-Rassegna*. s.l.: Il Diabete, Settembre 2008, vol.20(3):111-125
5. **Ian F. Godsland IF.** *Insulin Resistance and hyperinsulinaemia in the development and progression of cancer-Review*.s.l. : Clinical Science, Novembre 2009, Vol.118(5):315-332.doi:10.1042/CS20090399
6. **Scheen A.J.** *Pathophysiology of Type 2 Diabetes-Review*. s.l. : Acta Clin Belg., Nov-Dec 2003, vol.58(6):335-341, doi:10.1179/acb.2003.58.6.001
7. **Rea IM, Gibson DS, McNerlan SE, Alexander HD, Ross OA.** *Age and Age-Related Diseases: Role of Inflammation Triggers and Cytokines-Review*.s.l. : Frontiers in Immunology ,April 2018, Vol. 9:586:1-28, doi:10.3389/fimmu.2018.00586.eCollection2018
8. **Hirsiger S, Simmen HP, Werner CM, Wanner GA, Rittirsch D.** *Danger Signals Activating the Immune Response after Trauma*. s.l. : Mediators Inflamm, 2012 Jun 19.,2012:315941, 10 pages, doi: 10.1155/2012/315941
9. **Medzhitov R.** *Origin and physiological roles of inflammation*. s.l. : Nature,2008 Jul 24, Vol.454(7203):428-35 doi: 10.1038/nature07201

10. **Borish LC, Steinke JW.** *2. Cytokines and Chemokines-Review.* s.l. : The Journal of Allergy and Clinical Immunology, Feb 2003, vol.111(2):460-475, doi: 10.1067/mai.2003.108
11. **Tchkonia T, Zhu Y, van Deursen J, Campisi J, Kirkland JL.** *Cellular senescence and the senescent secretory phenotype: therapeutic opportunities-Review.* s.l. : The Journal of Clinical Investigation, 2013 Mar, 123(3):966-972, doi: 10.1172/JCI64098
12. **de Magalhaes JP, Passos JF.** *Stress, cell senescence and organismal ageing-Review.* s.l. : Mechanisms of Ageing and Development, Mar 2018, vol.170:2-9, doi:10.1016/j.mad.2017.07.001
13. **Rodier F, Campisi J.** *Four faces of cellular senescence.* s.l. : J Cell Bio, Feb 2011, Vol. 192(4):547-56. doi:10.1083/jcb.201009094
14. **Carmona JJ, Michan S.** *Biology of Healthy Aging and Longevity.* s.l. : Rev Invest Clin, 2016 Jan-Feb, Vol. 68(1):7-16
15. **Hewitt G, Jurk D, Marques FD, Correia-Melo C, Hardy T, Gackowska A, Anderson R, Taschuk M, Mann J, Passos JF.** *Telomeres are favoured targets of a persistent DNA damage response in ageing and stress-induced senescence.* s.l. : Nat Commun, 2012 Feb, Vol. 3:708. doi: 10.1038/ncomms1708
16. **Sanders YY, Liu H, Zhang X, Hecker L, Bernard K, Desai L, Liu G, Thannickal VJ.** *Histone modifications in senescence-associated resistance to apoptosis by oxidative stress.* s.l.: Redox Biol, Jan 2013, Vol. 1:8-16, doi:10.1016/j.redox.2012.11.004
17. **Childs BG, Baker DJ, Kirkland JL, Campisi J, van Deursen JM.** *Senescence and Apoptosis: dueling or complementary cell fates?* s.l. : EMBO Rep, Nov 2014, Vol. 15(11):1139-53. doi: 10.15252/embr.201439245
18. **Hernandez-Segura A, Nehme J, Demaria M.** *Hallmarks of Cellular Senescence.* s.l. : Trends Cell Biol, 2018 Jun, Vol.28(6):436-453, doi:10.1016/j.tcb.2018.02.001

19. **Korolchuck VI, Miwa S, Carroll B, von Zglinicki T.** *Mitochondria in Cell Senescence: Is Mitophagy the Weakest Link?* s.l. : EBio Medicine ,2017 Jul, Vol. 21:7-13. doi: 10.1016/j.ebiom2017.03.020.
20. **Rippo MR, Olivieri F, Monsurro V, Prattichizzo F, Albertini MC, Procopio AD.** *MitomiRs in human inflamm-aging: a hypothesis involving miR-181a, miR-34a and miR-146a.* s.l. :ExpGerontol, 2014 Aug, Vol. 56:154-63. doi: 10.1016/j.exger.2014.03.002.
21. **Beausèjour CM, Krtolica A, Galimi F, Narita M, Lowe SW, Yaswen P and Campisi J.** *Reversal of human cellular senescence: roles of the p53 and p16 pathways.*s.l. : the EMBO Journal, Aug 2003, Vol.22 No.16 pp.4212-4222,doi:10.1093/emboj/cdg417
22. **Soto -Gamez A, Demaria M.** *Therapeutic interventions for aging: the case of cellular senescence.* s.l. : Drug Discov Today, 2017 May, Vol.22(5):786-795.doi:10.1016/j.drudis.2017.01.004
23. **Kang C, Xu Q, Martin TD, Li MZ, Demaria M, Aron L, Lu T, Yankner BA, Campisi J, Elledge SJ.** *The DNA damage response induces inflammation and senescence by inhibiting autophagy of GATA4.* s.l. : Science, 2015 Sep, Vol.349(6255):aaa5612:1-11,doi:10.1126/science.aaa5612.
24. **Xia S,Zhang X,Zheng S, Khanabdali R,Kalionis B, Wu J,Wan W, and Tai X.** *Update of Inflamm-aging: Mechanisms, Prevention, and Treatment.*s.l. : Journal of Immunology Research, 2016,2016:8426874: 12 pages, doi: 10.1155/2016/8426874
25. **Franceschi C, Passarino G, Mari D, Monti D.** *Centenarians as a 21st century healthy aging model: A legacy of humanity and the need for a world-wide consortium(WWC 100+).* s.l. : Mech AgeingDev, 2017 Jul, Vol.165(Pt B):55-58,doi: 10.1016/j.mad2017.06.002
26. **Franceschi C, Capri M, Monti D, Giunta S, Olivieri F, Sevini F, Panourgia MP, Invidia L, Celani L, Scurti M, Cevenini E, Castellani GC, Salvioli S.** *Inflammaging and anti-inflammaging: a systemic perspective on aging and*

- longevity emerged from studies in humans*. s.l. : Mech AgeingDev, 2007 Jan, Vol.128(1):92-105, doi:10.1016/j.mad.2006.11.016
- 27.**Franceschi C, Bonafè M, Valensin S, Olivieri F, De Luca M, Ottaviani E, De Benedictis G.** *Inflamm-aging. An Evolutionary Perspective on ImmunoSenescence*. s.l. : Ann NY Acad Sci, 2000 Jun, Vol.908:244-54, doi:10.1111/j.1749-6632.2000.tb06651.x
- 28.**Olivieri F, Rippo MR, Procopio AD, Fazioli F.** *Circulating inflamma-miRs in aging and age-related diseases*. s.l.: Front Genet., Jun 2013, Vol.4(121):1-9, doi:10.3389/fgene.2013.00121
- 29.**Palmer AK, Tchkonja T, LeBrasseur NK, Chini EN, Xu M, and Kirkland JL.** *Cellular Senescence in Type 2 Diabetes: A Therapeutic Opportunity*. s.l. : Diabetes, July 2015, Vol.64:2289-2298.doi:10.2337/db14-1820.
- 30.**Debacq-Chainiaux F, Erusalimsky JD, Campisi J, Toussaint O.** *Protocols to detect senescence-associated beta-galactosidase(SA-beta-gal)activity, a biomarker of senescent cells in culture and in vivo*. s.l.: Nat Protoc., 2009, Vol.4(12):1798-806,doi:10.1038/nprot.2009.191
- 31.**Giardini MA, Segatto M, da Silva MS, Nunes VS, Cano MI.** *Telomere and telomerase biology*. s.l.: Prog Mol Biol Transl Sci., 2014, Vol.125:1-40,doi:10.1016/B978-0-12-397898-1.00001-3
- 32.**Al-Keilani MS, Agarwal S, Alqudah MA, SibenallerZ,RykenTC,Assem M.***Role of tyrosyl-DNA phosphodiesterase I(TDPI) as a prognostic and predictive factor in malignant glioma*.s.l. : Iowa Research Online,2013,doi:10.17077/etd.rtin1w8u

RINGRAZIAMENTI

Ringrazio prima di tutto la mia relatrice, Proff.ssa Olivieri Fabiola, e la mia correlatrice, Dott.ssa Maticchione Giulia, per gli impagabili consigli e per il grande supporto alla stesura di questa tesi. Ringrazio, poi, Giorgio Bettarelli e Massimo Gambella, i nostri tutor, che in questi tre anni ci hanno guidato in maniera costante e precisa, non facendoci mai mancare il loro supporto e la loro professionalità.

Ringrazio i miei genitori, mia sorella e tutta la mia famiglia per il sostegno economico ed affettivo che mi hanno dimostrato durante questi tre anni. Grazie per i vostri consigli e per le vostre critiche che mi hanno fatto crescere e mi hanno fatto comprendere che con il sacrificio e l'umiltà si ottengono grandi risultati. Spero di avervi reso orgogliosi di me!

Ringrazio tutti i miei compagni di corso per aver condiviso con me le difficoltà e le gioie che hanno portato a questo risultato, primo vero punto di arrivo e di partenza della nostra vita, grazie a voi ho trovato una seconda famiglia con cui ho trascorso momenti di svago e di "studio" che porterò sempre nel cuore. In particolare vorrei ringraziare Alice e Camilla, con cui ho stretto un rapporto di sincera amicizia sia umana che professionale, per avermi sempre sopportato e supportato nell'affrontare le tante prove, private e professionali, che mi sono trovata a fronteggiare in questi tre anni.

Ringrazio tutte le mie amiche e tutti i miei amici per essermi stati accanto durante questo percorso, per avermi sempre consigliato nel migliore dei modi e per avermi fatto capire che potevo farcela, incoraggiandomi a non mollare mai.

Infine ringrazio Mirco, il mio ragazzo, che mi è sempre stato vicino, anche nei momenti apparentemente più ostici. A lui va un ringraziamento speciale perché, con la sua instancabile allegria e dolcezza, ha sempre creduto in me, anche quando io stessa non ci credevo, aiutandomi a superare tutte le difficoltà che ho incontrato lungo il mio cammino e alleggerendo così tutto il carico emotivo e professionale, derivatemi da questa esperienza.

Grazie di cuore a tutti.

Giulia

