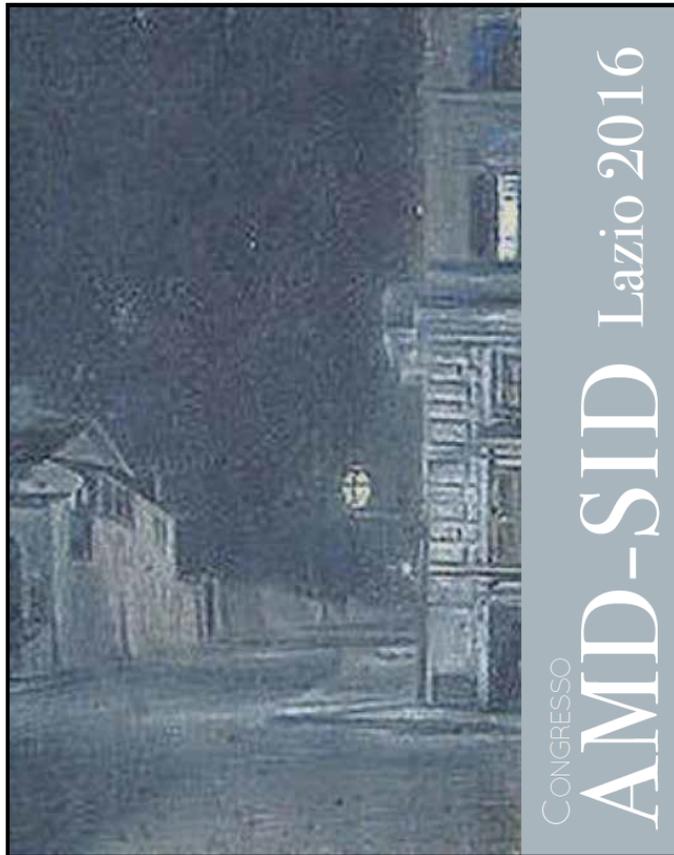


# La Ricerca nel Diabete: Novità e Prospettive



## Notizie dalla regione:

ricerca, assistenza e  
politiche sanitarie

## Roma

23-24 settembre 2016

Villa Malta

## Infiammazione e Diabete Gestazionale

Dott.ssa Tiziana Filardi

Scuola di Specializzazione in Endocrinologia  
e Malattie del Metabolismo

Università di Roma "Sapienza"

Dipartimento di Medicina Sperimentale

# Diabete Mellito Gestazionale (GDM)



- Intolleranza al glucosio di entità variabile che inizia in gravidanza
- Prevalenza in Italia: 11-13 %
- Se non diagnosticato e, quindi, non trattato, comporta rischi
  - sia per la madre (ipertensione e più frequente ricorso al taglio cesareo)
  - sia per il feto e il neonato (aumentata incidenza di macrosomia, iperbilirubinemia, ipocalcemia, policitemia, ipoglicemia)

# GDM: Screening



## Alto rischio per GDM OGTT 75 g a 16-18 settimane

- Obesità (BMI  $\geq 30$  kg/m<sup>2</sup>)
- Pregresso diabete gestazionale
- Glicemia a digiuno 100-125 mg/dl all'inizio della gravidanza o in passato

## Fattori di rischio per GDM OGTT 75 g a 24-28 settimane

- Familiarità di I grado per diabete
- Macrosomia fetale in gravidanze precedenti
- Sovrappeso (BMI  $\geq 25$  kg/m<sup>2</sup>)
- Età  $\geq 35$  anni
- Etnie a elevato rischio (Asia meridionale, Medio Oriente, Caraibi)

# GDM: Criteri Diagnostici



## Test diagnostico

Curva da carico orale con 75 g di glucosio (OGTT 75 g)  
e dosaggio della glicemia ai tempi: 0, 60', 120'

Tempi (minuti)	Glicemia (mg/ dl)
0	92
60	180
120	153

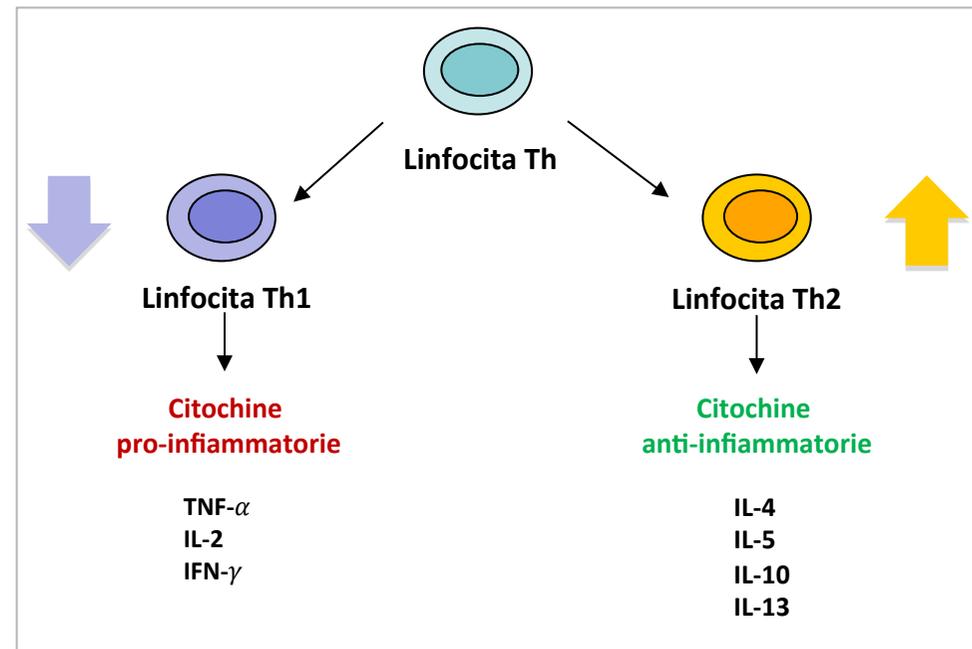
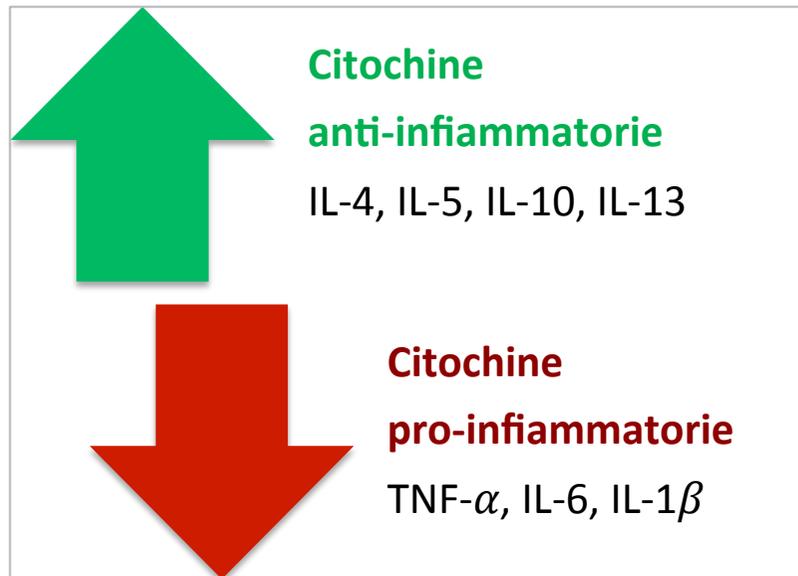
## Diagnosi

Uno o più valori uguali  
o superiori a quelli  
indicati

# Infiammazione e Gravidanza



## Risposta infiammatoria di basso grado



# Citochine in Gravidanza



Citochina	Funzione in gravidanza
GM-CSF	Morfogenesi placentare, impianto embrione
<b>IL-1<math>\alpha</math> (pro-infiammatoria)</b>	In risposta a ipossia
<b>IL-1<math>\beta</math> (pro-infiammatoria)</b>	Stimolo rilascio $\beta$ HCG Regolazione secrezione IL-6
<b>IL-2 (pro-infiammatoria)</b>	Regolazione risposte immuni in utero
<b>IL-3 (pro-infiammatoria)</b>	Crescita e differenziazione trofoblasto
<b>IL-6 (pro-infiammatoria)</b>	Invasione cellulare e rimodellamento arterie spirali
<b>IFN-<math>\gamma</math> (pro-infiammatoria)</b>	Angiogenesi placenta Inibizione proliferazione cellule citotrofoblasto
<b>IL-12 (pro-infiammatoria)</b>	Differenziazione linfociti Th1
<b>TNF-<math>\alpha</math> (pro-infiammatoria)</b>	Azione su trofoblasto (apoptosi e anti-apoptosi)
<b>IL-10 (anti-infiammatoria)</b>	Down-regolazione TNF- $\alpha$
<b>IL-4 (anti-infiammatoria)</b>	Maturazione Th Regulatori
<b>IL-5 (anti-infiammatoria)</b>	Sviluppo placentare, crescita fetale, controllo invasione trofoblasto

# Placenta e Infiammazione



## Secrezione di citochine

Cellule di Hofbauer

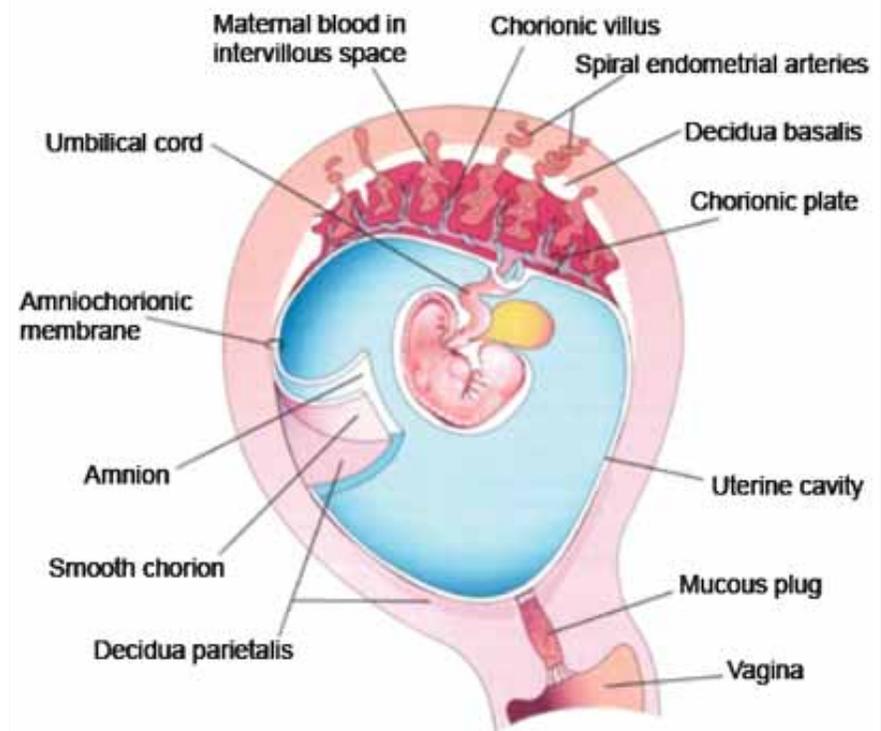
Citotrofoblasto

Sinciziotrofoblasto

Cellule dell'endotelio vascolare

Azione paracrina  
Azione autocrina  
Azione endocrina

## Tessuto target di citochine (sistemiche/locali)



# Membrane Fetali e Infiammazione



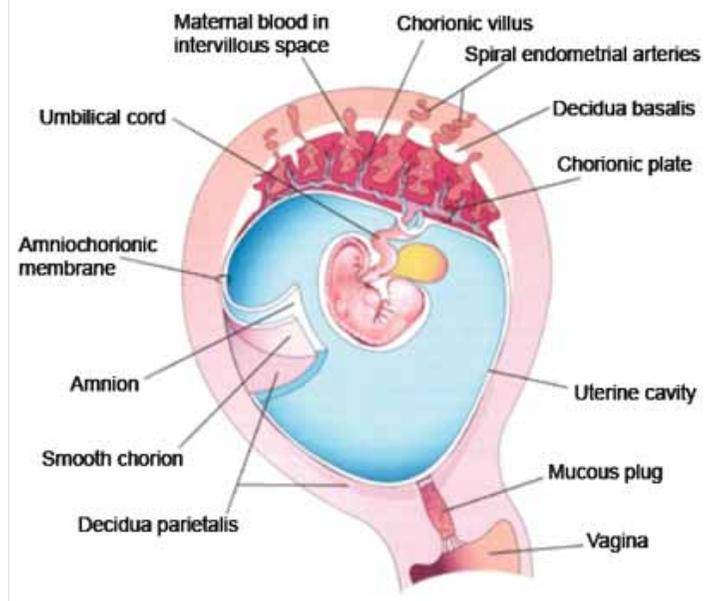
## Amnion Corion

### Barriera madre-feto

(protezione meccanica e da agenti patogeni)

### Mantenimento della tolleranza madre-feto

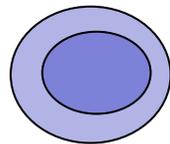
**Produzione di citochine  
pro-infiammatorie  
(TNF- $\alpha$ , IL-6, IL-1 $\beta$ )**



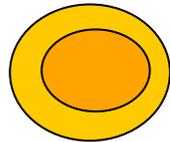
# Inflammation and Immune Response in Pregnancy Complicated by GDM



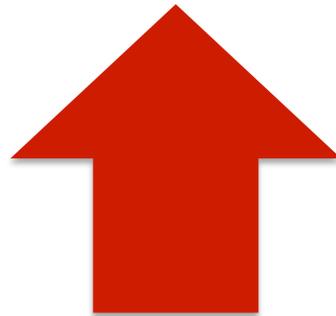
## Amplification of the inflammatory response



Th1



Th2



**Cytokines**

**pro-inflammatory:**

TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6

**Cytokines**

**anti-inflammatory:**

IL-4, IL-5, IL-10, IL-13

# Risposta Infiammatoria e Insulino-Resistenza



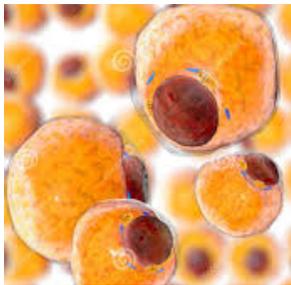
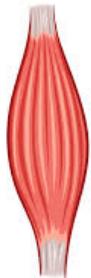
**Citochine pro-infiammatorie**  
Attivazione chinasi (JNK, IKK)



**Inibizione del signaling  
insulina-recettore  
(inattivazione di IRS)**



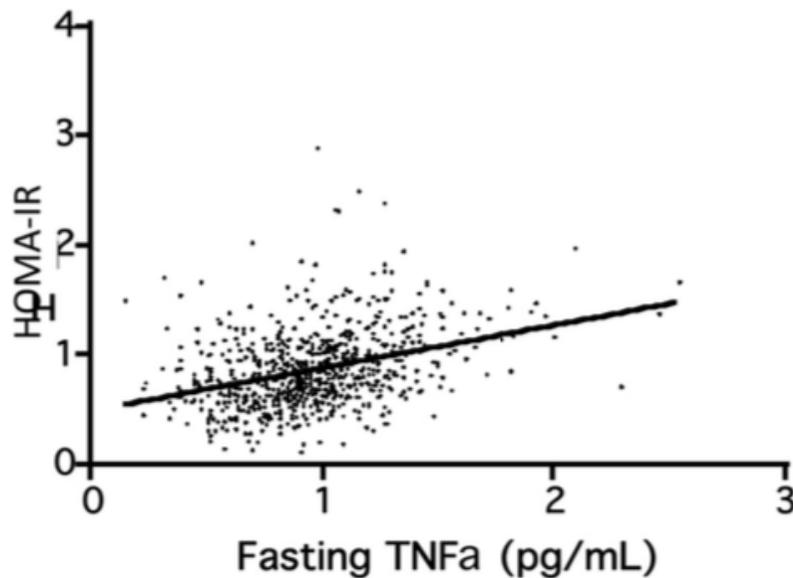
**Insulino-resistenza**



# TNF- $\alpha$ e GDM



Correlazione tra livelli sierici di TNF- $\alpha$   
al II trimestre e HOMA IR



**P < 0.00001**

## Studio prospettico

N . 756

Incidenza di GDM 8.1%

Età:  $28.4 \pm 4.4$  anni

BMI pre-gravidico:  $24.7 \pm 5.4$  Kg/m<sup>2</sup>

Follow up: 5–16 settimane e 24–28  
settimane di gravidanza

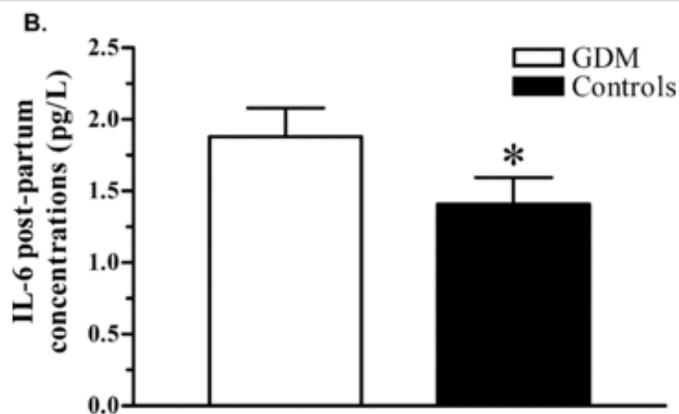
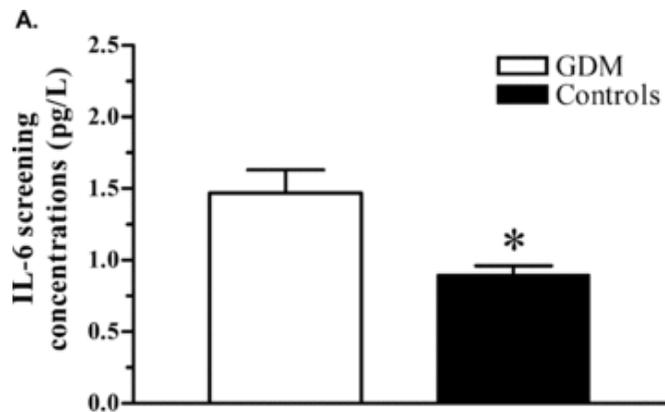
Correlazione tra TNF- $\alpha$  e Matsuda index  
( $r = -0.29$   $p < 0.00001$ )

Associazione tra TNF- $\alpha$ , HOMA-IR e  
Matsuda insulin sensitivity index  
significativa correggendo per età, BMI,  
trigliceridemia e livelli sierici  
adiponectina

# IL-6 e GDM



## A. Al momento dello screening per GDM \* $p \leq 0.05$



## B. Due mesi dopo il parto \* $p \leq 0.05$

N = 40 (18 GDM, 22 controlli)

**N. 20 GDM, N.27 controlli**

**Età (GDM vs controlli):**

$31.9 \pm 4.6$  vs  $29.4 \pm 3.8$  anni  $p \leq 0.05$

**BMI pre-gravidico (GDM vs controlli):**

$28.2 \pm 7.5$  vs  $24.2 \pm 4.3$  Kg/m<sup>2</sup>  $p \leq 0.03$

Correzione per età e BMI

- Livelli sierici di IL-6 correlati significativamente con il Matsuda insulin sensitivity index, misurato ai due tempi ( $r = -0.60$ ,  $p \leq 0.01$  and  $r = -0.34$ ,  $p \leq 0.05$ )
- Il Matsuda insulin sensitivity index è predittore indipendente dei livelli di IL-6 al momento dello screening per GDM

# Adiponectina e Rischio di GDM



Studio prospettico di coorte  
N. 445, 407 NGT, 38 GDM (8.5 %)  
Età  $28.4 \pm 4.3$  anni  
BMI:  $25.4 \pm 5.6$  kg/m<sup>2</sup> (I trimestre)  
I trimestre (6–13 sett) e al II trimestre (24–28 sett)  
Diagnosi di GDM secondo criteri IADPSG

## I trimestre (6-13 settimane)

	GDM	NGT	P
Adiponectina ( $\mu\text{g/ml}$ )	$9.67 \pm 3.84$	$11.92 \pm 4.59$	P = 0.004

Valori inferiori di adiponectina al I trimestre sono associati a aumentato rischio di sviluppare GDM

**OR 1.12 per ogni 1  $\mu\text{g/ml}$  di riduzione di adiponectina, correggendo per BMI e HbA1c (p=0.02)**

## ...Novità e Prospettive



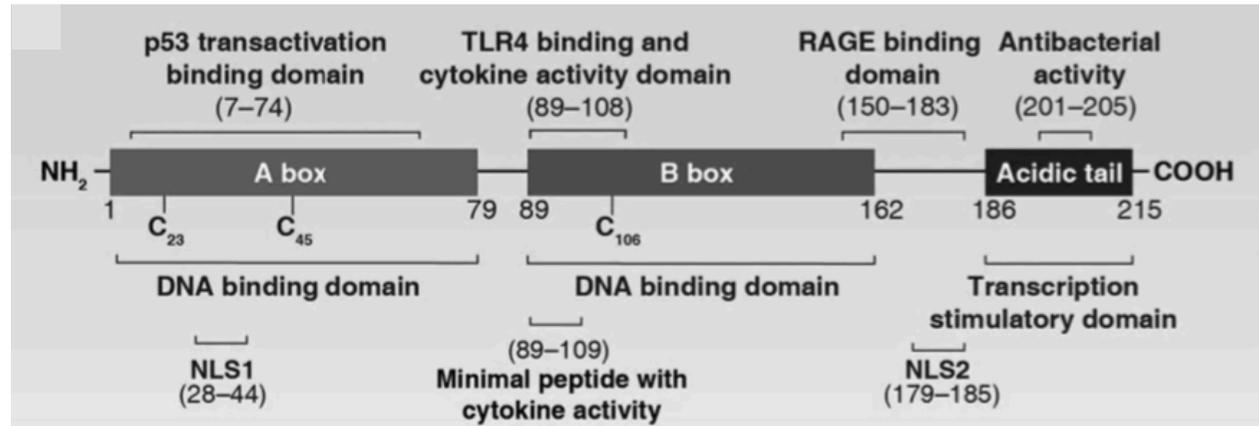
**Altri possibili bio-marcatori  
di infiammazione poco indagati finora**



# High Mobility Group Box 1 (HMGB1)



- Proteina nucleare non istonica associata alla cromatina
- Migrazione veloce all'elettroforesi



## HMGB1 nucleare

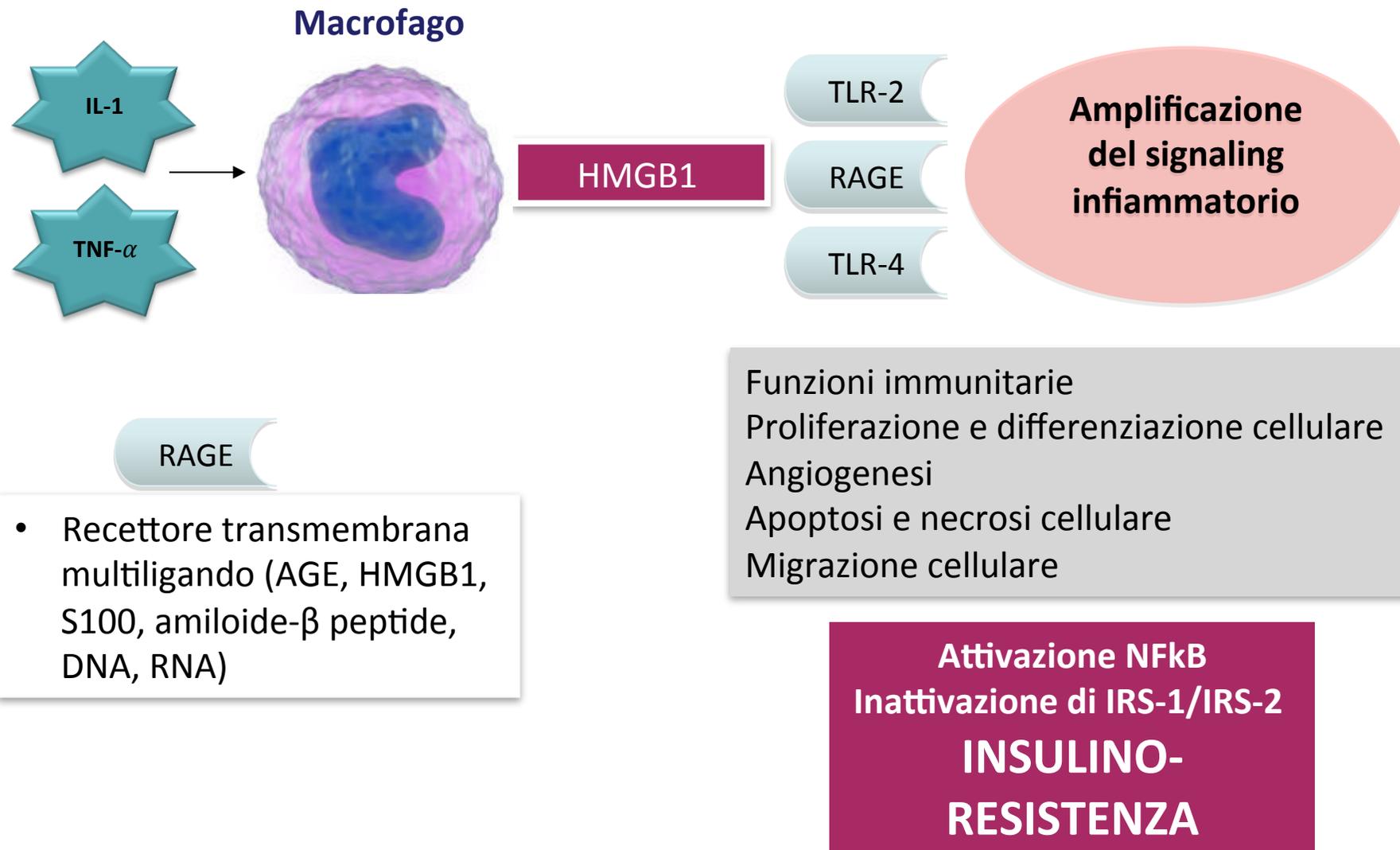
- Mantenimento del nucleosoma
- Regolazione della trascrizione genica

## HMGB1 extracellulare

*Danger signal*

Infiammazione  
Immunomodulazione  
Chemiotassi

# High Mobility Group Box 1 (HMGB1) / Receptor for Advanced Glycation Endproduct (RAGE)



# HMGB1 / RAGE e malattie



- Malattie infettive, sepsi e shock settico
- Malattie neurodegenerative
- Malattie autoimmuni
- Malattie neoplastiche
- Aterosclerosi e malattie cardiovascolari
- Diabete mellito
- Pre-eclampsia

# Livelli Sierici di HMGB1 e Diabete Gestazionale

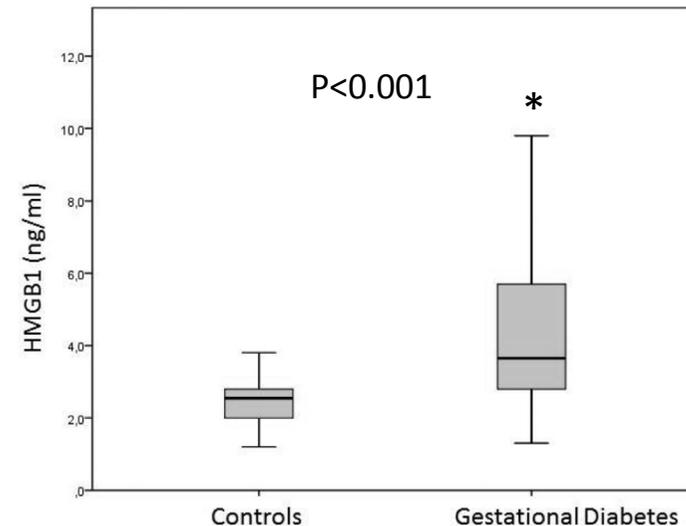


75 GDM vs 48 controlli

24-28 settimane

Diagnosi GDM secondo criteri IADPSG

	GDM	Controlli	P
Età (anni)	32 ± 4.9	29.9 ± 5.4	p = 0.005
BMI pregravidico (kg/m <sup>2</sup> )	29.9 ± 2.0	23.6 ± 2.7	P= 0.0001



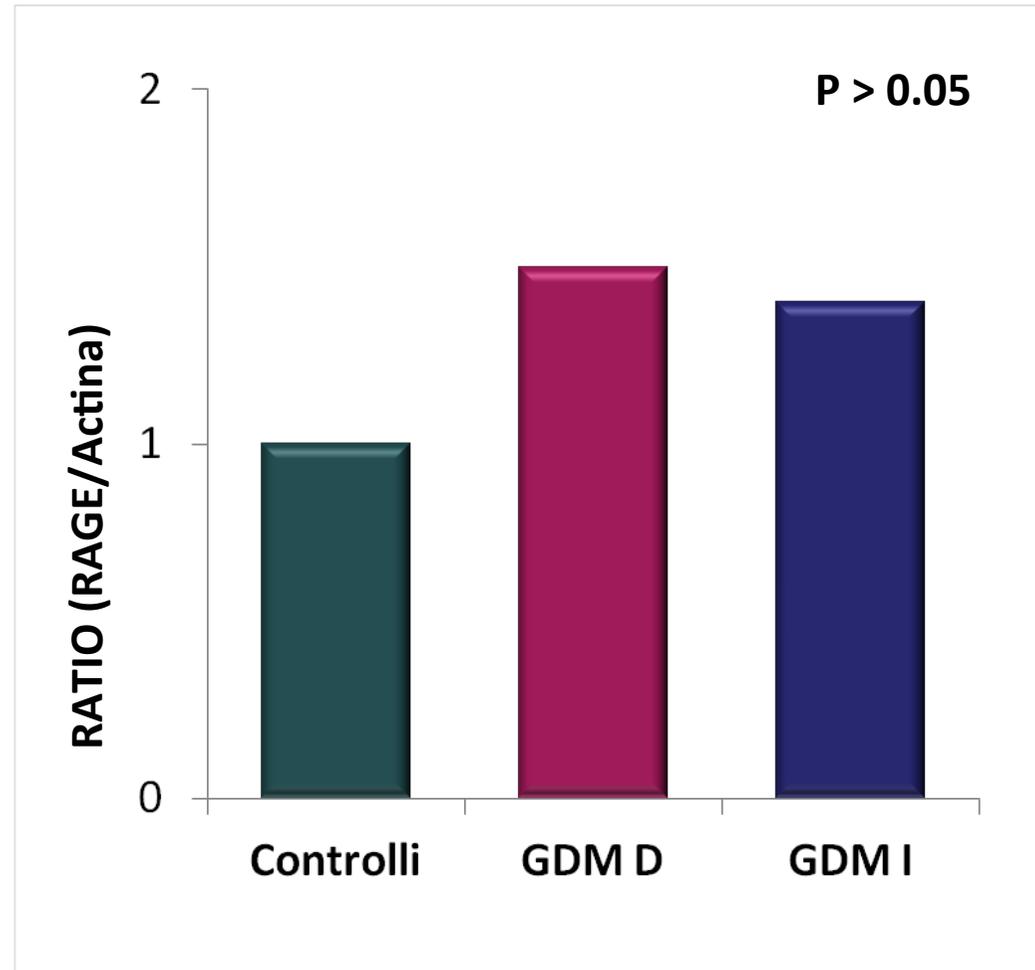
- Livelli sierici di HMGB1 significamente più elevati nel gruppo GDM, **dopo correzione per età e BMI**
- HMGB1 sierico predittore indipendente di GDM

# RAGE e Diabete Gestazionale



N10 GDM-D  
N10 GDM-I  
N10 controlli

L' espressione di RAGE  
nella placenta non è  
risultata significativamente  
differente in GDM rispetto  
a controlli



# Studio Pilota



## Obiettivo dello studio

Valutazione dei **livelli di HMGB1/RAGE tissutali (placenta e membrane fetali)** e sierici in donne affette da **GDM (casi)** e in **donne sane in gravidanza (controlli)**

Correlazione tra **livelli di HMGB1/RAGE tissutali e sierici** e parametri laboratoristici, ecografici fetali e outcome materno-fetali

**Università di Roma "Sapienza"**

Dipartimento di Medicina Sperimentale, Sezione di Fisiopatologia Medica-Endocrinologia

Dipartimento di Medicina Sperimentale, Istituto di Patologia Generale

Dipartimento di Scienze Ginecologiche e Ostetriche

# Criteria



## Criteria di inclusione

- Taglio cesareo di elezione
- Gravidanza singola
- Etnia caucasica
- Diagnosi di GDM secondo criteri AMD-SID 2016 (casi)
- Donne sane in gravidanza (controlli)

## Criteria di esclusione

- Etnia non caucasica
- Diabete pre-gravidico
- BMI pre-gravidico  $\geq 30 \text{ Kg/m}^2$
- Riscontro, precedentemente o all'inizio della gravidanza, di IFG/IGT
- Gravidanza gemellare
- Malattie infettive
- Malattie infiammatorie
- Malattie autoimmuni
- Dipendenza da alcool e droghe
- Terapia cortisonica

## Disegno dello Studio Visita 0 (III trimestre)



- Raccolta del **consenso informato**
- **Anamnesi familiare, fisiologica ed ostetrica**
- **Anamnesi patologica remota**
- Misura dei **parametri antropometrici e vitali**
- **Esami ematochimici:** glicemia, HbA1c, colesterolo totale, LDL, HDL, trigliceridi, LDL, non-HDL, GOT, GPT, gamma GT, emocromo, PT, PTT, fibrinogeno, ATIII, TSH, FT3, FT4, AbTPO, uricemia, hsPCR, ferritina, FFA, creatininemia, microalbuminuria, eGFR, **valutazione dei livelli circolanti di HMGB1/sRAGE**
- Valutazione **accrescimento fetale mediante esame ultrasonografico**

## Disegno dello Studio – Visita 1 (parto TC)



- Raccolta **dati relativi al parto e al neonato**
- Prelievo di sangue materno valutazione dei **livelli sierici di HMGB1/sRAGE**
- Prelievo di **placenta e membrane fetali per valutazione dei livelli tissutali di HMGB1/RAGE**

# Metodi



## **Raccolta di membrane placentari umane e coltura di espianti tissutali**

I campioni di membrane placentari sono stati raccolti immediatamente dopo l'espulsione della placenta e trasferiti in ghiaccio.

Dopo lavaggio in soluzione fisiologica, incubazione per 24 h in atmosfera al 95% di O<sub>2</sub> e 5% CO<sub>2</sub> in piastre di Petri con RPMI 1640 (Gibco, Grand Island, NY, USA), i campioni di membrane sono stati conservati a -80 ° C.

## **Analisi in Western Blot**

Le membrane placentari sono state omogeneizzate e quindi sonicate in tampone di lisi [10 mM Tris-HCl, 50 mM NaCl, 2 mM EDTA, 1% Triton X-100, (pH 7,0)] con cocktail di inibitori della proteasi (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Germania ). La concentrazione proteica è stata determinata con metodo Bradford con BSA (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA). 30 µg di proteina sono stati caricati su gel al 12,5% e quindi trasferiti su membrana (PVDF) (Amersham Biosciences, Piscataway, NJ, USA). Le membrane sono state incubate con anticorpo anti-HMGB1 (R & D Systems, Minneapolis, MN, USA) o monoclonale anti-RAGE (clone DD/A11 Millipore 1:1000). Come controllo isotipico sono state utilizzate IgG2b di topo (Amersham Biosciences, Little Chalfont, UK). L'anticorpo secondario era anti-IgG di topo (1/1000; Amersham Biosciences) coniugato con perossidasi. L'analisi densitometrica è stata eseguita utilizzando ImageJ Software (NIH, Bethesda, MD, USA).

**Università di Roma "Sapienza"**  
**Dipartimento di Medicina Sperimentale**  
**Istituto di Patologia Generale**

## Risultati Preliminari Popolazione in Studio



	GDM	Controlli
N.	7	8
Età (anni)	34.7 ± 3.0	34.4 ± 4.2
<b>BMI-pregravidico (Kg/m<sup>2</sup>)</b>	<b>27.4 ± 4.0</b>	<b>24.2 ± 4.4</b>
Incremento ponderale (kg)	4.2 ± 7.6	11.9 ± 2.3
Nullipare (n)	3/7	4/8
Ipertensione in gravidanza (frequenza)	2/7	0/8
Familiarità di I grado per DM (frequenza)	2/7	5/8
Pregresso GDM (frequenza)	2/7	0/8

## Risultati Preliminari Esami di Laboratorio



	GDM	Controlli
Colesterolo totale (mg/dl)	274 ± 91	317 ± 88
Colesterolo HDL (mg/dl)	66 ± 14	63 ± 7
Colesterolo LDL (mg/dl)	168 ± 67	200 ± 92
Trigliceridi (mg/dl)	210 ± 103	302 ± 74
GFR MDRD (mL/min/1.73 m <sup>2</sup> )	122 ± 24	125 ± 19
TSH (μUI/ml)	2.3 ± 2.6	2.3 ± 0.7
Uricemia (mg/dl)	3.5 ± 0.7	5.0 ± 2.2
hsProteina C Reattiva (μg/l)	4050.0 ± 4171.9	5125.0 ± 2568.2
<b>Ferritina (μg/l)</b>	<b>41.4 ± 45.5</b>	<b>16.4 ± 8.9</b>
Fibrinogeno (g/l)	5.2 ± 0.17	5.1 ± 0.8

## Risultati Preliminari: Parametri Ecografici e Parametri Neonatali

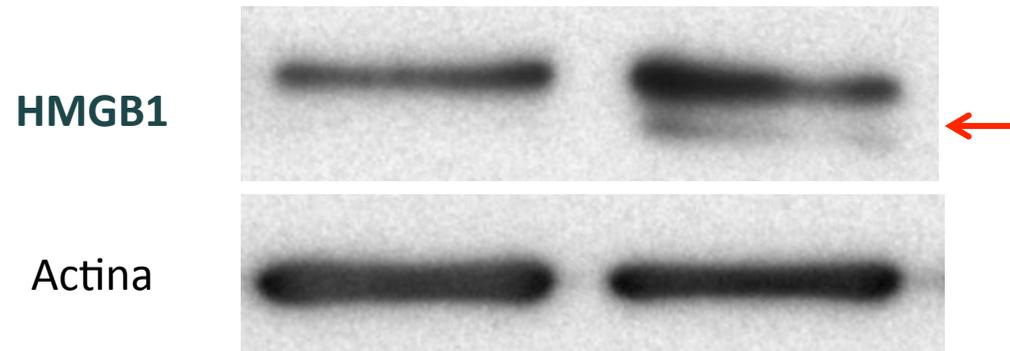


<b>Parametri fetali</b>	<b>GDM</b>	<b>Controlli</b>
<b>Circonferenza addome (mm)</b>	<b>303.8 ± 35.3</b>	<b>300 ± 22.2</b>
Peso fetale stimato (g)	2469.14 ± 559.5	2349.8 ± 500.3
<b>Circonferenza cranica (mm)</b>	<b>277.2 ± 57.2</b>	<b>317.3 ± 11.1</b>

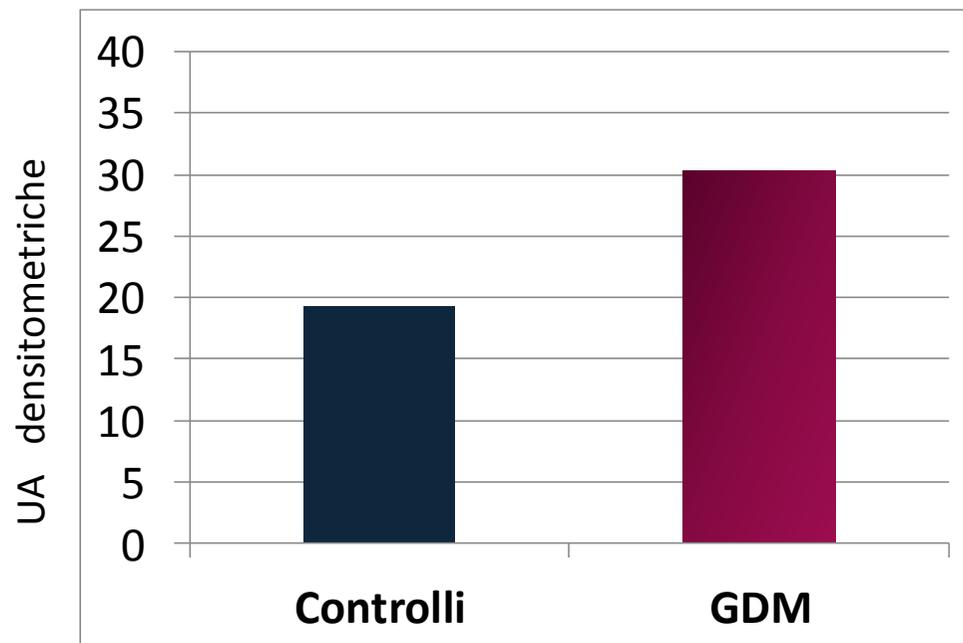
  

<b>Parametri neonatali</b>	<b>GDM</b>	<b>Controlli</b>
<b>Peso alla nascita (g)</b>	<b>3223.3 ± 396.5</b>	<b>3360.6 ± 270.1</b>
Circonferenza cranica (mm)	349 ± 12.0	344 ± 10.1
Lunghezza (cm)	49.5 ± 1.2	49.5 ± 1.4

# Risultati Preliminari HMGB1 in Membrane Fetali (Membrana Amnio-Corionica con Decidua Basale)



n. 3 GDM  
n. 3 Controlli

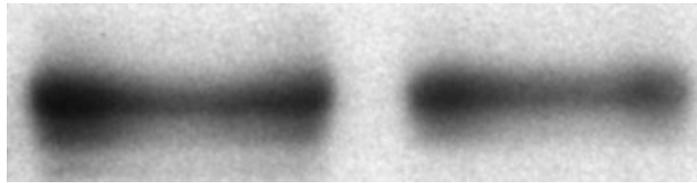


**Espressione di HMGB1  
acetilata (attiva)  
maggiore nel GDM**

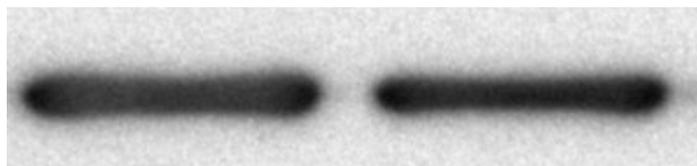
# Risultati Preliminari RAGE in Membrane Fetali (Membrana Amnio-Corionica con Decidua Basale)



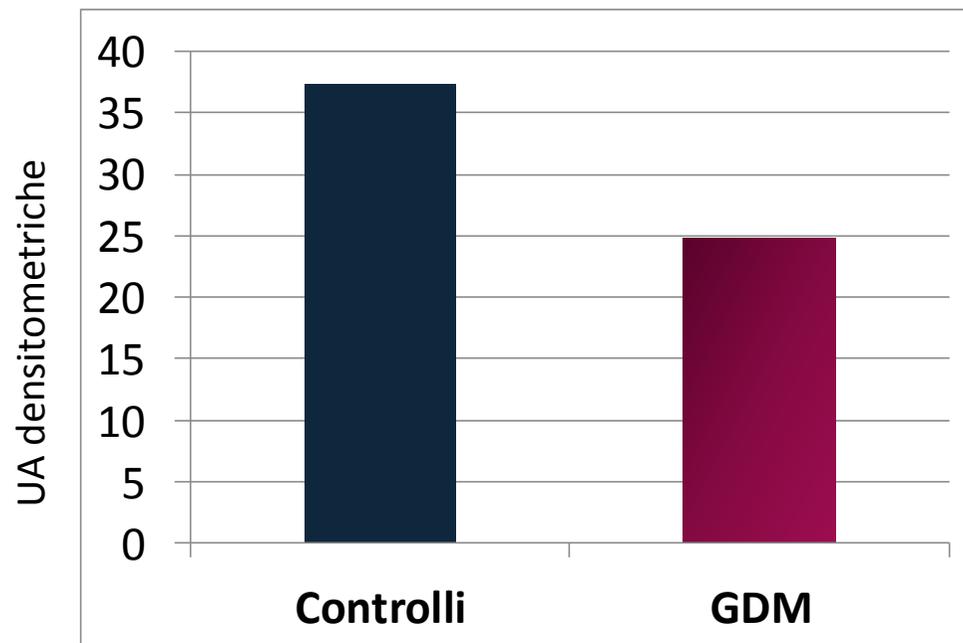
RAGE



Actina



n. 3 GDM  
n. 3 Controlli



**Espressione di RAGE  
maggiore nei controlli**

## Conclusioni



- La gravidanza *per se* è caratterizzata da uno stato infiammatorio che induce insulino-resistenza
- In presenza di GDM tale stato infiammatorio è amplificato per squilibrio tra citochine pro-infiammatorie e anti-infiammatorie
- Esistono evidenze sulla relazione tra alcune citochine e GDM
- HMGB1 possibile nuovo biomarcatore di infiammazione nel GDM
- Ulteriori studi in popolazione più ampia per confermare i dati su HMGB1 e per chiarire l'esatto ruolo di RAGE