



in Biologia  
cellulare  
e dello sviluppo

BREVE ARTICOLO DEL RAPPORTO DI RICERCA

Fronte. Biol., 04 febbraio 2022 | <https://doi.org/10.3389/fcell.2022.814165>

# Rigenerazione delle isole e ghiandole del dotto pancreatico nel diabete umano e sperimentale

 Diletta Overi<sup>1</sup>,  Guido Carpino<sup>2\*</sup>,  Marta Moretti<sup>3</sup>,  Antonio Franchitto<sup>4</sup>,   
Lorenzo Nevi<sup>4</sup>,  Paolo Onori<sup>5</sup>,  Enrico De Smaele<sup>6</sup>,  Luca Federici<sup>7</sup>,  Daniele Santorelli<sup>8</sup>,  Marella Maroder<sup>7</sup>,  Lola M. Reid<sup>9</sup>,  Vincenzo Cardinale<sup>10</sup> Domenico Alvaro<sup>10</sup> ed  Eugenio Gaudio<sup>1</sup>

- <sup>1</sup>Dipartimento di Scienze Anatomiche, Istologiche, Forensi e Ortopediche, Sapienza Università di Roma, Roma, Italia
- <sup>2</sup>Dipartimento di Scienze del Movimento, Umane e della Salute, Divisione di Scienze della Salute, Università di Roma "Foro Italico", Roma, Italia
- <sup>3</sup>Dipartimento di Medicina Sperimentale, Sapienza Università di Roma, Roma, Italia
- <sup>4</sup>Dipartimento di Bioscienze, Università degli Studi di Milano, Milano, Italia
- <sup>5</sup>CAST Centro studi e tecnologie avanzate e Dipartimento di Tecnologie Innovative in Medicina e Odontoiatria, Università "G. D'Annunzio" di Chieti-Pescara, Chieti, Italia
- <sup>6</sup>Dipartimento di Scienze Biochimiche "Rossi Fanelli", Sapienza Università di Roma, Roma, Italia
- <sup>7</sup>Dipartimento di Medicina Molecolare, Sapienza Università di Roma, Roma, Italia
- <sup>8</sup>Dipartimenti di Biologia Cellulare e Fisiologia, Programma in Biologia Molecolare e Biotecnologie, UNC School of Medicine, University of North Carolina, Chapel Hill, NC, Stati Uniti
- <sup>9</sup>Dipartimento di Scienze Medico-Chirurgiche e Biotecnologie, Sapienza Università di Roma, Latina, Italia
- <sup>10</sup>Dipartimento di Medicina Traslazionale e di Precisione, Sapienza Università di Roma, Roma, Italia

Prove contrastanti sono presenti per quanto riguarda il contributo delle popolazioni di cellule staminali / progenitrici alla rigenerazione pancreatica nel diabete. È interessante notare che un compartimento cellulare con caratteristiche di cellule staminali / progenitrici è stato identificato nelle ghiandole del dotto pancreatico (PDG). Gli obiettivi del presente studio erano di valutare la lesione e la rigenerazione delle isole pancreatiche e

la partecipazione del compartimento PDG nel mellito diabetico di tipo 2 (T2DM) e in un modello sperimentale di diabete. I pancreati umani sono stati ottenuti da donatori di organi cadaverici normali (N = 5) o T2DM (N = 10). Il diabete sperimentale è stato generato nei topi mediante iniezione intraperitoneale di 150 mg/kg di streptozotocina (STZ, N = 10); N = 10 topi STZ hanno anche ricevuto iniezioni intraperitoneali giornaliere di 100 µg di peptide PDX1 ricombinante umano (STZ + PDX1). I campioni sono stati esaminati mediante immunohistochimica/immunofluorescenza o RT-qPCR. I livelli sierici di glucosio e peptide C sono stati misurati nei topi. Le isole nei pazienti con DM2 hanno mostrato β perdita di cellule, segni di lesioni e proliferazione e una percentuale più elevata di isole centrali. I PDG nei pazienti con T2DM avevano una percentuale più elevata di cellule proliferanti e di insulina o glucagone rispetto ai controlli; isole pancreatiche potrebbero essere osservate all'interno delle pareti del dotto pancreatico dei pazienti con T2DM. I topi STZ erano caratterizzati da un'area isolare ridotta rispetto ai controlli. Il trattamento con PDX1 ha aumentato l'area delle isole e la percentuale di isole centrali rispetto ai topi STZ non trattati, ma non ha ripristinato il diabete. In conclusione, i pazienti con T2DM mostrano segni di rigenerazione delle isole pancreatiche e coinvolgimento della nicchia PDG. La somministrazione di PDX1 potrebbe supportare un aumento della rigenerazione pancreatica endocrina nella STZ. Questi risultati contribuiscono a definire il ruolo e la partecipazione dei compartimenti delle cellule staminali/progenitrici all'interno del pancreas.\*\*

## **Introduzione**

Il diabete mellito comprende malattie metaboliche caratterizzate da iperglicemia. Il diabete mellito di tipo 1 (T1DM) è causato da una distruzione autoimmune delle cellule β pancreatiche, mentre il diabete mellito di tipo 2 (T2DM) si sviluppa a causa della resistenza all'insulina e può progredire verso la disfunzione delle cellule β ([Mathieu et al., 2021](#)). In questi pazienti possono verificarsi processi rigenerativi, tentando di compensare la perdita di cellule β ([Yoneda et al., 2013](#)). Pertanto, l'identificazione e la caratterizzazione delle traiettorie rigenerative all'interno del pancreas potrebbe fornire informazioni per lo sviluppo di nuove strategie terapeutiche nel trattamento del diabete.

Negli ultimi anni, sono emerse prove che sfidano l'ipotesi della presenza di popolazioni di cellule progenitrici all'interno del pancreas che partecipano alla rigenerazione delle isole; in particolare, studi basati sul tracciamento del lignaggio hanno indicato che il rinnovamento delle cellule β deve essere sostenuto dalla replicazione cellulare matura più che dall'impegno delle cellule progenitrici ([Domínguez-Bendala et al., 2019](#)). È interessante notare che resti di precursori epato-bilio-pancreatici sono stati identificati nell'albero biliare e nel sistema del dotto pancreatico ([Cardinale et al., 2012](#)). In particolare, le cellule staminali/progenitrici dell'albero biliare (BTSC) sono state identificate all'interno delle ghiandole peribiliari (PBG) dei più grandi dotti biliari intraepatici ed extraepatici, e rappresentano un compartimento multipotente di cellule staminali/progenitrici. Le loro capacità di differenziarsi verso cellule pancreatiche endocrine mature sono state valutate sia *in vitro* che *in vivo* ([Lanzoni et al., 2016](#)). In particolare, è stato dimostrato come l'omeobox 1

pancreatico e duodenale (PDX1) possa modulare la differenziazione equilibrata delle cellule progenitrici/staminali verso l'impegno del pancreas endocrino piuttosto che verso il destino biliare ([Cardinale et al., 2015](#)). In precedenza abbiamo espresso la sequenza di PDX1 umana in *E. Coli* e testato *in vitro* gli effetti della proteina PDX1 ricombinante sull'induzione della differenziazione verso le cellule insulari pancreatiche nelle BTSC. Abbiamo osservato come PDX1 può innescare l'espressione di marcatori di differenziazione a cellule  $\beta$  stadio intermedio e maturo nelle BTSC ([Cardinale et al., 2015](#)).

Parallelamente ai PBG, il sistema del dotto pancreatico ospita compartimenti ghiandolari simili: le ghiandole del dotto pancreatico (PDG) sono ghiandole tubulo-acinari situate all'interno della lamina propria dei principali dotti pancreatici e, occasionalmente, grandi dotti interlobulari ([Carpino et al., 2016a](#)). I PDG hanno dimostrato di ospitare una nicchia di precursori impegnati verso i destini [pancreatici](#) ([Carpino et al., 2016a](#)). Tuttavia, la risposta di questo compartimento cellulare nel diabete non è stata ancora studiata.

Pertanto, gli obiettivi del presente studio erano: 1) valutare il danno e il fenotipo delle isole pancreatiche in pazienti con T2DM e in un modello sperimentale di diabete; 2) descrivere le modificazioni del compartimento PDG in pazienti diabetici di tipo 2 e in un modello sperimentale di diabete; 3) testare i possibili effetti della somministrazione ricombinante di PDX1 su isole pancreatiche e PDG in un modello sperimentale di diabete.

## **Materiali e Metodi**

### **Campioni umani**

Le pancreate umane sono state ottenute da donatori cadaverici (N = 15) del dipartimento chirurgico del Policlinico Umberto I, Sapienza Università di Roma, Italia. Sulla base di dati anamnestici e sierologici, i campioni sono stati divisi in normali (N = 5) o T2DM (N = 10). Il consenso informato è stato ottenuto dai parenti più prossimi per l'uso dei tessuti a fini di ricerca. I protocolli di studio hanno ricevuto l'approvazione dell'Institutional Review Board dal Policlinico Umberto I. Pancreas e duodeno sono stati ottenuti *in blocco* da procedure di trapianto di organi. Per ogni caso, i campioni sono stati prelevati a livello del dotto pancreatico principale prima della fusione con il coledoco e ai diversi livelli del corpo pancreatico e della coda.

### **Istomorfologia, immunoistochimica e immunofluorescenza**

I campioni sono stati fissati in formalina tamponata al 10% e incorporati nella paraffina, e sono state ottenute sezioni da 3-5  $\mu$ m ed elaborate per ematossilina ed eosina (H & E). Per l'immunoistochimica, l'attività della perossidasi endogena è stata bloccata da un'incubazione di 30 minuti in perossido di idrogeno al 2,5%. I paragrafi sono stati incubati durante la notte a 4°C con anticorpi primari (elencati nella [Tabella supplementare S1](#)). Quindi, campioni incubati per 20 minuti a temperatura ambiente con anticorpo biotinilato secondario e poi con streptavidina-rafano perossidasi (LSAB+, Dako, Glostrup, Danimarca, codice: K0690). La diaminobenzidina (Dako, Glostrup, Danimarca, codice: K3468) è stata utilizzata come substrato e le sezioni sono state controcolorate con ematossilina. Le sezioni sono state esaminate in modo codificato da Leica Microsystems DM4500B Light and Fluorescence Microscopy (Wetzlar, Germania), dotato di una videocamera Jenoptik Prog Res C10 Plus (Jena, Germania).

Per l'immunofluorescenza (IF), il legame proteico non specifico è stato bloccato dal 5% di siero di capra normale. I campioni sono stati incubati con anticorpi primari durante la notte; quindi, i

campioni sono stati lavati e incubati per 1 ora con anticorpi secondari isotipo-specifici marcati (AlexaFluor, Invitrogen, Life Technologies Ltd., Paisley, Regno Unito) e controcolorati con 4,6-diamidino-2-fenilindolo (DAPI) per la visualizzazione dei nuclei cellulari. Per eseguire una doppia immunocolorazione con due anticorpi primari della stessa specie ospite, abbiamo seguito un protocollo in 3 fasi: le sezioni sono state incubate con il primo anticorpo primario; quindi, è stato applicato un anticorpo fluorescente secondario; infine, il secondo anticorpo primario è stato pre-marcatore con un fluoroforo utilizzando il kit di etichettatura APEX-594 (Invitrogen) e applicato alla sezione.®

Per tutte le immunoreazioni, sono stati inclusi anche controlli negativi (l'anticorpo primario è stato sostituito con siero pre-immune).

Le sezioni sono state esaminate in modo codificato da Leica Microsystems DM4500B Light and Fluorescence Microscopy (Wetzlar, Germania), dotato di una videocamera Jenoptik Prog Res C10 Plus (Jena, Germania). Le macchie di immunofluorescenza sono state analizzate anche mediante microscopia confocale (Leica TCS-SP2). Le diapositive sono state ulteriormente scansionate da uno scanner digitale (Aperio Scanscope CS and FL Systems, Aperio Digital Pathology, Leica Biosystems, Milano, Italia) ed elaborate da ImageScope.

L'area del pancreas occupata dalle isole di Langerhans e le dimensioni dell'isolotto sono state valutate su diapositive H & E da ImageScope. Le isole sono state considerate "centrali" o "periferiche" in base alla loro posizione rispetto al lobulo pancreatico e al sistema del dotto: le isole centrali sono tipicamente situate vicino ai setti interlobulari, collegate a un dotto inter/intralobulare pancreatico chiaramente definito e in continuità con lo stroma circostante del dotto; le isole periferiche si trovano nel mezzo del lobulo pancreatico senza connessione con lo stroma del dotto inter/intralobulare ([Merkwitz et al., 2013](#)). La composizione delle isole è stata valutata contando le cellule positive all'interno delle isole. Inoltre, l'espressione degli antigeni nucleari è stata calcolata automaticamente da un algoritmo specifico su aree selezionate ed espressa come percentuale di cellule positive.

### **Streptozotocina (STZ)-Topi diabetici indotti e trattamento PDX1**

I topi maschi NOD/SCIDgamma (NSG) (N = 25) sono stati acquistati da Charles River (Calco, Milano, Italia). I topi sono stati ospitati in una struttura barriera dedicata e priva di agenti patogeni presso l'Università La Sapienza di Roma in conformità con le normative italiane. I topi sono stati tenuti in una stanza con specifici standard privi di agenti patogeni mantenuti a una temperatura di  $23 \pm 1$  °C e  $50 \pm 10\%$  di umidità relativa, con cibo e acqua disponibili *ad libitum*. La stanza degli animali era su un ciclo di luce: buio 12:12 h. I topi sono stati identificati individualmente mediante punzonatura all'orecchio.

Il diabete mellito di tipo 1 è stato indotto da una singola iniezione intraperitoneale di una singola dose di 150 mg/kg (N = 10) di STZ. Inoltre, N = 10 topi STZ aggiuntivi sono stati trattati con iniezioni intraperitoneali giornaliere di 100 µg di peptide PDX1 ricombinante umano ([Cardinale et al., 2015](#)). I topi del gruppo STZ sono stati iniettati con soluzione salina. N = 5 topi sono stati inclusi come controlli e non hanno ricevuto STZ o PDX1. Gli animali che hanno raggiunto livelli stabili di glucosio  $>300$  mg / dl sono stati considerati diabetici ([Leiter e Schile, 2013](#)). Lo studio è

stato condotto su topi NSG al fine di evitare una possibile reazione immunitaria dell'ospite contro il PDX1 umano.

Il trattamento con PDX1 è stato iniziato 48 ore dopo l'iniezione di STZ e la conferma di livelli stabili di glucosio sierico >300 mg/dl. Per prevenire la mortalità dovuta all'ipoglicemia causata dal massiccio rilascio di insulina dopo il danno alle isole pancreatiche indotto da STZ, gli animali sono stati trattati con acqua integrata con saccarosio al 10% per 48 ore dopo la somministrazione di STZ. I livelli di glucosio sono stati misurati ogni 3 giorni dal glucometro AlphaTRAK con strisce (Abbott). I campioni di tessuto pancreatico sono stati ottenuti al sacrificio. I tessuti sono stati elaborati per l'istologia, l'immunoistochimica e l'immunofluorescenza o congelati per l'analisi RT-qPCR. Tutti gli esperimenti sugli animali sono stati approvati dal comitato istituzionale per la cura e l'uso degli animali della Sapienza Università di Roma e dal Ministero della Salute italiano.

### **Produzione e purificazione PDX1**

Il PDX1 ricombinante è stato ottenuto sotto forma di proteina di fusione collegando 6His-tag al N-terminus della sequenza di amminoacidi. La sequenza di codifica del DNA a lunghezza intera per PDX1 umano (codifica 852 bp per 283 aa) adattata per l'espressione eterologa in *E. Coli* è stata fornita da GenScript United States Inc. (Piscataway, NJ). La sequenza è stata amplificata mediante PCR utilizzando primer 5'-TATCATATGAACGGTGAAGAACAGTACTAC-3' e 5'-ATACTCGAGCTAACGTGGTTCTTGCGGACGGC-3'. Dopo la digestione con NdeI e BamHI, l'amplicone è stato legato al vettore di espressione pET-28a (Novagen-Merck, Darmstadt, Germania), producendo plasmide pET-PDX1. Questo costrutto è stato utilizzato per trasformare il ceppo BL21 (DE3) *E. Coli* (Invitrogen). Le cellule BL 21 (DE3) sono state coltivate in terreno di Luria Bertani (LB) contenente 34 µg/ml di Kanamicina e a 37°C fino all'OD<sub>600</sub> raggiunto 0,6; quindi, l'espressione proteica è stata indotta con 1 mM di IPTG. Dopo l'induzione, le cellule sono state coltivate a 21 ° C durante la notte e poi raccolte mediante centrifugazione. Per la purificazione PDX1, il pellet cellulare è stato risospeso in 20 mM Tris-HCl pH 8,0, 0,2 U / mL di nucleasi benzonasi (Sigma-Aldrich), 5 mM MgCl<sub>2</sub>, compressa inibitore della proteasi (completa priva di EDTA, Roche) e glicerolo 10%, sonicato e centrifugato. Dopo l'aggiunta di 500 mM NaCl e 25 mM di imidazolo, la frazione solubile è stata caricata su un HisTrap FF (GE Healthcare) da 5 ml preequilibrato con tampone di risospensione. La proteina è stata eluita con un gradiente di imidazolo (20 mM-1 M imidazolo in Tris-HCl tamponato (pH 8,0, NaCl 500 mM, glicerolo 10%) e quindi le frazioni contenenti proteina PDX1 sono state analizzate da SDS-PAGE. Una colonna Sephadex G-25 (GE Healthcare) è stata impiegata per rimuovere l'imidazolo e per scambiare il buffer con PBS. Le analisi di spettrometria di massa sono state eseguite dopo digestione triptica della banda di 43 kDa isolata da gel colorato di blu Coomassie. Gli spettri di massa sono stati acquisiti dallo strumento Ultraflex III MALDI-TOF-TOF (Bruker-Daltonics, Brema, Germania) e i siti peptidici sono stati cercati nel database NCBI dal motore di ricerca MASCOT.

### **Analisi RT-qPCR e test ELISA**

L'RNA totale è stato estratto dalle procedure di Chomczynski e Sacchi ([Chomczynski e Sacchi, 2006](#)). La qualità e la quantità dell'RNA sono state valutate con il sistema di elettroforesi automatizzato Experion. RNA dotato di RNA StSens Analysis Chip (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA). L'RNA è stato estratto dal reagente TRIZOL (Life Technologies, Rockville, MD; Cat# 15,596-026) secondo le istruzioni del produttore. Un µg di RNA è stato retrotrascritto utilizzando il

kit di trascrizione inversa cDNA ad alta capacità (Applied Biosystems, Life Technologies, Paisley, Regno Unito: codice 4368814) e il cDNA è stato amplificato utilizzando il kit SensiMix SYBR (Bioline, Londra, Regno Unito: codice QT605-05) secondo le istruzioni del produttore. I primer utilizzati sono elencati nella [tabella supplementare S2](#). L'espressione del gene di interesse è stata calcolata dal rapporto tra le concentrazioni del gene di interesse e del gene di riferimento 18 s. I livelli sierici di peptide C del topo in risposta alla somministrazione di glucosio sono stati misurati mediante test ELISA. I topi sono stati a digiuno durante la notte e il 30% di destrosio è stato iniettato per via intraperitoneale a 2 g / kg di peso corporeo. Sessanta minuti dopo l'iniezione di glucosio, 80 µl di sangue sono stati raccolti in tubi capillari di microematocrito eparinizzato (Fisherbrand) e campioni di siero preparati sono stati sottoposti a test per il peptide C del topo. Il kit ELISA ultrasensibile del peptide C del topo (ALPCO, numero di catalogo 80-CPTMS-E01) è stato utilizzato secondo le istruzioni del produttore.

### Analisi statistica

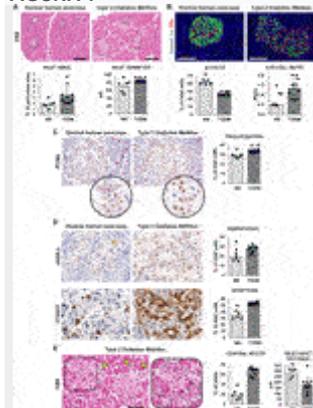
I dati continui sono presentati come medi  $\pm$  SD. Il t-test dello studente o *l'U-test* di Mann-Whitney sono stati utilizzati per determinare le differenze tra i gruppi per i dati normalmente o non normalmente distribuiti, rispettivamente. Un test ANOVA unidirezionale o Kruskal-Wallis H è stato utilizzato per calcolare le differenze tra tre gruppi. Un valore  $p < 0,05$  è stato considerato statisticamente significativo. Le analisi sono state eseguite utilizzando il software IBM SPSS (SPSS Inc., Stati Uniti).

## Risultati

### Isoletto di Langerhans Modifiche nel diabete umano

Nella pancreata ottenuta da pazienti affetti da T2DM, l'area occupata dalle isole era significativamente più alta ( $3,3 \pm 1,7\%$ ) rispetto a quelle normali ( $1,8 \pm 0,5\%$ ;  $p < 0,05$ ; [Figura 1A](#)). In parallelo, le isole pancreatiche nei campioni di T2DM erano più grandi ( $86,0 \pm 4,4 \mu\text{m}$ ) rispetto alle isole nella pancreata normale ( $69,8 \pm 13,5 \mu\text{m}$ ;  $p < 0,05$ ; [Figura 1A](#)). Tuttavia, quando è stata studiata la composizione delle isole pancreatiche ([Figura 1B](#)), le isole nel T2DM erano caratterizzate da una percentuale inferiore di cellule  $\beta$  ( $40,2 \pm 4,7\%$ ) e da una percentuale più elevata di cellule  $\alpha$  ( $55,0 \pm 9,6\%$ ) rispetto alla pancreata normale ( $62,2 \pm$  rispettivamente del  $4,4\%$  e del  $31,5 \pm 6,1\%$ ;  $p < 0,001$  e  $p < 0,01$ ); pertanto, il T2DM è stato caratterizzato da un rapporto  $\alpha/\beta$ -cella più elevato ( $1,35 \pm 0,49$ ) rispetto alle isole della pancreata normale ( $0,5 \pm 0,08$ ;  $p < 0,01$ ).

FIGURA 1



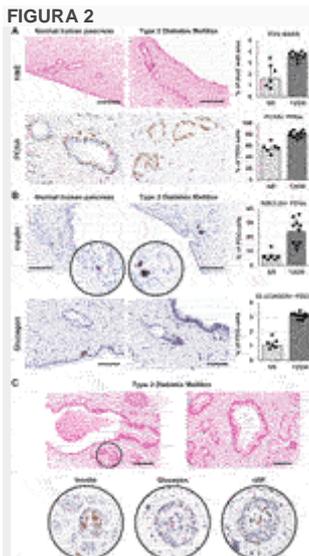
**FIGURA 1.** Istologia e fenotipo delle isole pancreatiche nel pancreas umano normale (NR) e nei campioni di pancreas del diabete mellito di tipo 2 (T2DM). **(A) Colorazione** di ematossilina ed

eosina (H&E). I pazienti con T2DM hanno mostrato un'area insulare e una dimensione delle isole più elevate rispetto ai campioni normali. Le linee tratteggiate individuano le isole pancreatiche. Gli istogrammi mostrano la media e la deviazione standard (SD) per l'area e il diametro dell'isolotto. Barra di scala: 150  $\mu\text{m}$ . **(B)** Doppia immunofluorescenza per insulina (verde) e glucagone (rosso). Le isole pancreatiche nei pazienti con T2DM erano caratterizzate da una percentuale di cellule  $\beta$  più bassa e da un rapporto  $\alpha/\beta$ -cellule più elevato rispetto alla pancreata normale. Gli istogrammi mostrano mezzi e SD per le percentuali di cellule  $\beta$  e per il rapporto  $\alpha/\beta$ -cellula. Barra di scala: 100  $\mu\text{m}$ . I nuclei sono visualizzati in blu (colorazione DAPI). **(C)** Immunoistochimica per la proliferazione dell'antigene nucleare cellulare (PCNA). I pazienti con T2DM hanno mostrato un aumento della percentuale di cellule PCNA + proliferanti all'interno delle isole rispetto alla pancreata normale. Ingrandimento originale: 40x. Le aree nel cerchio sono ingrandimenti delle immagini sopra. L'istogramma mostra mezzi e SD per la percentuale di cellule proliferanti. **(D)** Immunoistochimica per  $\gamma\text{H2A.x}$  (pannelli superiori) e caspasi 3 scissa (cCasp3, pannelli inferiori). Le isole pancreatiche nei pazienti diabetici erano caratterizzate da una maggiore espressione del marcatore di senescenza  $\gamma\text{H2A.x}$  e del marcatore di apoptosi cCasp3 rispetto alla pancreata normale. Gli istogrammi mostrano mezzi e deviazione standard per la percentuale di cellule positive. Ingrandimento originale: 40x. **(E)** Colorazione H & E su pancreata da pazienti T2DM. Pancreata da pazienti con T2DM era caratterizzata da una percentuale più elevata di isole centrali rispetto a quelle normali. Le punte di freccia indicano i dotti pancreatici. L'area nella scatola è ingrandita sulla destra; la linea tratteggiata individua un ramo del dotto pancreatico che circonda un'isolotto. Barra scala: 75  $\mu\text{m}$ . L'istogramma mostra le medie e SD per la percentuale di isolotti centrali e la distanza media tra gli isolotti e i condotti vicini. \* =  $p < 0,05$  contro T2DM.

Abbiamo quindi eseguito analisi immunoistochimiche per valutare la proliferazione cellulare (proliferando l'antigene nucleare cellulare-PCNA), la senescenza (da  $\gamma\text{H2A.x}$ ) e l'apoptosi (da caspasi scissa 3-cCasp3) nelle isole pancreatiche. La percentuale di cellule PCNA + isole era più alta in T2DM ( $52,9 \pm 4,2\%$ ) rispetto alla pancreata normale ( $43,2 \pm 2,3\%$ ;  $p < 0,01$ ; [Figura 1C](#)); tuttavia, le cellule all'interno delle isole pancreatiche nei pazienti con T2DM hanno anche mostrato un aumento dell'espressione di  $\gamma\text{H2A.x}$  ( $27,5 \pm 3,5\%$ ) e cCasp3+ ( $52,6 \pm 2,3\%$ ) rispetto alle normali isole pancreatiche ( $19,6 \pm 4,9\%$  e  $34,4 \pm 5,4\%$ , rispettivamente;  $p < 0,05$  e  $p < 0,001$ ; [Figura 1D](#)). È interessante notare che, quando abbiamo valutato la localizzazione delle isole pancreatiche, abbiamo osservato una percentuale più elevata di isole centrali nella pancreata del paziente T2DM ( $66,7 \pm 7,9\%$ ) rispetto a quelle normali ( $16,4 \pm 6,3\%$ ;  $p < 0,001$ ; [Figura 1E](#)). Le isole pancreatiche erano meno distanti dai dotti vicini in T2DM ( $172,0 \pm 74,5 \mu\text{m}$ ) rispetto alla pancreata del soggetto normale ( $285,4 \pm 40,33 \mu\text{m}$ ;  $p < 0,01$ ).

### **Ghiandole del dotto pancreatico (PDG) nel diabete mellito di tipo 2 umano**

Abbiamo studiato se il compartimento PDG potesse essere modificato nella pancreata affetta da T2DM. È interessante notare che i principali campioni di dotto pancreatico ottenuti da pazienti con T2DM erano caratterizzati da un'area più elevata occupata da PDG nella parete del dotto (cioè massa PDG;  $3,6 \pm 0,3\%$ ) rispetto ai campioni normali ( $1,6 \pm 0,9\%$ ;  $p < 0,01$ ; [Figura 2A](#)). Di conseguenza, è stata osservata una maggiore percentuale di cellule PCNA + nei PDG dei pazienti con T2DM ( $80,7 \pm 5,8\%$ ) rispetto a quelli normali ( $53,4 \pm 5,8\%$ ;  $p < 0,001$ ; [Figura 2A](#)).



**FIGURA 2.** Ghiandole del dotto pancreatico (PDG) nel pancreas umano normale (NR) e nei campioni di pancreas del diabete mellito di tipo 2 (T2DM). **(A)** Colorazione di ematossilina ed eosina (H&E) (pannelli superiori) e immunohistochimica per la proliferazione dell'antigene nucleare cellulare (PCNA, pannelli inferiori). I dotti pancreatici nei pazienti con T2DM erano caratterizzati da una maggiore massa di PDG e da una maggiore espressione di PCNA all'interno dei PDG rispetto ai dotti normali. Gli istogrammi mostrano la media e la deviazione standard (SD) per la percentuale di area della parete del condotto occupata dai PDG e per la percentuale di cellule PCNA + PDG. Barra di scala per H&E: 100  $\mu$ m. Ingrandimento originale per PCNA: 40x. **(B)** Immunohistochimica per insulina (pannelli superiori) e glucagone (pannelli inferiori). I pazienti con T2DM hanno mostrato una percentuale più elevata di cellule di insulina + e glucagone + all'interno dei PDG rispetto a quelli normali. Gli istogrammi mostrano mezzi e SD per la percentuale di cellule positive. Barra di scala: 75  $\mu$ m (insulina) e 50  $\mu$ m (glucagone). **(C)** La colorazione H&E su campioni di T2DM mostra dotti pancreatici con lesioni displastiche dell'epitelio superficiale e dei PDG e la presenza di isole pancreatiche tra i PDG (cerchio). Sezioni seriate della stessa area mostrano che le isole nei dotti pancreatici esprimono insulina, glucagone e sono vascolarizzate. Barra della scala: 100  $\mu$ m \* =  $p < 0,05$  contro T2DM.

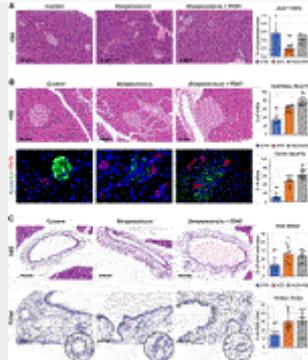
Come nel nostro studio precedente ([Carpino et al., 2016a](#)), si potrebbero osservare cellule all'interno di PDG che esprimono insulina o glucagone ([Figura 2B](#)). È interessante notare che i PDG nella pancreata diabetica erano caratterizzati da una percentuale più elevata di cellule di insulina + ( $23,9 \pm 8,9\%$ ) e glucagone + ( $3,1 \pm 0,2\%$ ) rispetto agli organi normali ( $7,2 \pm 1,1\%$  e  $1,1 \pm 0,2\%$ , rispettivamente;  $p < 0,05$ ).

In modo univoco, grandi strutture simili a isole potrebbero essere trovate all'interno delle principali pareti del dotto pancreatico in campioni di T2DM; queste isole hanno mostrato positività per insulina e glucagone e sono state caratterizzate dalla presenza di vasi sanguigni all'interno dell'isolotto ([Figura 2C](#)). Da notare, il dotto pancreatico principale in T2DM ma non in campioni normali, è stato caratterizzato anche dalla presenza di lesioni displastiche dell'epitelio superficiale e PDG (test chi-quadrato  $p < 0,05$ ; [Figura 2C](#)).

### **Lesione delle isole pancreatiche e attivazione del PDG nel diabete indotto da streptozotocina murina**

Abbiamo ulteriormente studiato la morfologia delle isole pancreatiche dopo la lesione in un modello murino di diabete, i topi STZ. Abbiamo prima esaminato la modificazione patologica delle isole nei topi e abbiamo osservato che l'area delle isole pancreatiche era più bassa nei topi STZ ( $0,19 \pm 0,07\%$ ) rispetto ai controlli ( $0,57 \pm 0,27\%$ ;  $p < 0,05$ ; [Figura 3A](#)). Inoltre, le isole pancreatiche erano più piccole nei topi STZ (diametro:  $60,7 \pm 15,6 \mu\text{m}$ ) rispetto a quelle di controllo ( $88,6 \pm 19,3 \mu\text{m}$ ;  $p < 0,05$ ). È interessante notare che l'area delle isole pancreatiche era più alta nei topi STZ trattati con PDX1 ( $0,45 \pm 0,10\%$ ) rispetto ai topi STZ non trattati ( $p < 0,01$ ); non è stata osservata alcuna differenza significativa tra i topi trattati con STZ + PDX1 e quelli di controllo.

FIGURA 3



**FIGURA 3.** Isole pancreatiche e ghiandole del dotto pancreatico (PDG) in topi di controllo, topi trattati con streptozotocina (STZ) e topi STZ trattati con PDX1. **(A) Colorazione** di ematossilina ed eosina (H&E) su campioni di pancreas. I topi trattati con STZ erano caratterizzati da un'area insulare pancreatiche inferiore rispetto ai controlli; I topi STZ + PDX1 hanno mostrato un'area insulare più elevata rispetto a STZ, senza differenze significative rispetto ai controlli. Le linee tratteggiate individuano le isole pancreatiche. L'istogramma mostra la media e la deviazione standard (SD) per la percentuale dell'area pancreatiche. Barra di scala: 150  $\mu\text{m}$ . **(B)** Colorazione H&E (pannelli superiori) e doppia immunofluorescenza per insulina (ins, in verde) e citocheratina 19 (CK19, in rosso) su campioni di pancreas. I topi trattati con STZ mostrano una percentuale più elevata di isole centrali rispetto ai controlli; inoltre, i topi STZ + PDX1 hanno mostrato una percentuale significativamente più alta di isole centrali rispetto ai topi STZ e di controllo. Barra di scala in H&E: 75  $\mu\text{m}$ . Nell'immagine di immunofluorescenza, le punte di freccia indicano piccole cellule CK19 + all'interno delle isole. I nuclei sono visualizzati in blu (colorazione DAPI). Ingrandimento originale: 40x. Gli istogrammi mostrano mezzi e SD per la percentuale di isolotti centrali e isole contenenti cellule CK19 +. **(C)** Colorazione H&E e immunohistochimica per la proliferazione dell'antigene nucleare cellulare (PCNA) sui dotti pancreatici. I topi trattati con STZ e STZ + PDX1 mostrano una maggiore massa PDG e percentuale di cellule PCNA + all'interno dei PDG rispetto ai controlli. Gli istogrammi mostrano mezzi e SD per la percentuale di area della parete del condotto occupata da PDG e per la percentuale di cellule PCNA + PDG. Barra di scala: 100  $\mu\text{m}$  (H&E) e 50  $\mu\text{m}$  (PCNA). \* =  $p < 0,05$  rispetto ad altri gruppi; ^ =  $p < 0,05$  contro il gruppo STZ.

Quando è stata studiata la posizione anatomica delle isole ([Figura 3B](#)), la percentuale di isole centrali era più alta nei topi trattati con STZ ( $62,3 \pm 7,1\%$ ) rispetto ai topi di controllo ( $34,5 \pm 8,1\%$ ;  $p < 0,001$ ). Inoltre, i topi trattati con STZ + PDX1 erano caratterizzati da una percentuale più

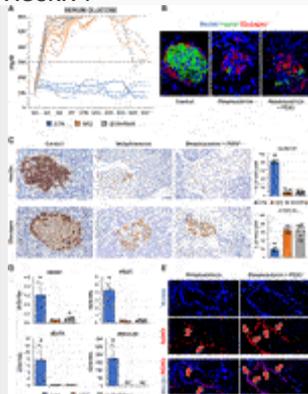
elevata di isole centrali ( $76,5 \pm 7,3\%$ ) rispetto ai topi STZ non trattati ( $p = 0,03$ ) e di controllo ( $p < 0,001$ ). Le isole nei topi trattati con STZ + PDX1 hanno mostrato una maggiore vicinanza ai condotti ( $59,0 \pm 13,5 \mu\text{m}$ ) rispetto a STZ ( $79,3 \pm 22,9 \mu\text{m}$ ;  $p < 0,05$ ) e topi di controllo ( $154,8 \pm 7,8 \mu\text{m}$   $p < 0,05$ ). Le cellule CK19 + duttali sono state trovate all'interno delle isole pancreatiche (Figura 3B) e la percentuale di isole con cellule CK19 + era più alta in STZ + PDX1 ( $63,7 \pm 9,7$ ) rispetto a STZ ( $49,0 \pm 10,9$ ;  $p < 0,05$ ) e topi di controllo ( $11,2 \pm 5,5$ ;  $p < 0,05$ ).

Abbiamo quindi studiato le modifiche del compartimento cellulare PDG nei topi STZ (Figura 3C). È interessante notare che sia i topi STZ che STZ + PDX1 erano caratterizzati da una massa PDG più elevata ( $12,8 \pm 5,8\%$  e  $11,7 \pm 3,3\%$ , rispettivamente) rispetto a quelli di controllo ( $6,4 \pm 3,1\%$ ;  $p < 0,05$ ). Di conseguenza, le cellule PDG nei topi STZ e STZ + PDX1 erano caratterizzate da una maggiore espressione di PCNA ( $30,1 \pm 10,5\%$  e  $31,2 \pm 12,6\%$ , rispettivamente) rispetto ai controlli ( $14,1 \pm 5,7\%$ ;  $p < 0,05$ ). Non sono state osservate differenze significative tra topi STZ e STZ + PDX1 in termini di area PDG ed espressione di PCNA nelle cellule PDG.

### Fenotipo delle isole e profilo glicemico nel diabete indotto da streptozotocina murina

Quando il profilo glicemico è stato studiato nei topi (Figura 4A), i livelli sierici di glucosio sono rimasti al di sopra della soglia di 300 mg/dl in tutti gli animali, ad eccezione di un topo nel gruppo STZ + PDX1. Al momento del sacrificio, nessun topo STZ ha mostrato positività per il peptide c all'ELISA sul siero. Tuttavia, i topi N = 2/10 STZ + PDX1 sono risultati positivi per il peptide C sierico (test *del chi quadrato*:  $p < 0,001$ ).

FIGURA 4



**FIGURA 4.** Fenotipo delle isole pancreatiche e profilo glicemico nei topi di controllo, nei topi trattati con streptozotocina (STZ) e nei topi STZ trattati con PDX1. **(A)** Il grafico mostra i valori individuali per i livelli sierici di glucosio nei topi STZ e STZ + PDX1. La linea tratteggiata indica la soglia per la diagnosi del diabete (300 mg/dl). **(B)** Doppia immunofluorescenza per insulina (ins, in verde) e glucagone (glu, in rosso). **(C)** Immunoistochimica per l'insulina (pannelli superiori) e per il glucagone (pannelli inferiori). I topi trattati con STZ e STZ + PDX1 hanno mostrato una percentuale inferiore di cellule  $\beta$  e una percentuale più elevata di cellule  $\alpha$  rispetto ai controlli. Gli istogrammi mostrano la media e la deviazione standard (SD) per la percentuale di  $\alpha/\beta$  cellule. Ingrandimento originale: 40x. **(D)** Gli istogrammi mostrano mezzi e deviazione standard per l'espressione RT-qPCR dei geni *NGN3*, *PDX1*, *MaFA* e *Insulina*. I dati sono espressi come mezzi e deviazione standard (SD). GOI: gene di interesse. ND: non rilevabile. (D) L'immunofluorescenza per *NGN3* ha confermato la maggiore espressione di *NGN3* nei topi trattati con STZ + PDX1 rispetto al gruppo STZ. *NGN3* è stato espresso principalmente dalle cellule del dotto pancreatico

(frece). Sono stati forniti canali separati. Ingrandimento originale: 40x. \* =  $p < 0,05$  rispetto ad altri gruppi; ^ =  $p < 0,05$  contro il gruppo STZ.

Quando è stato studiato il fenotipo delle cellule delle isole pancreatiche murine ([Figura 4B,C](#)), abbiamo osservato che la percentuale di cellule  $\beta$  all'interno delle isole pancreatiche era inferiore nei topi STZ ( $9,1 \pm 5,5\%$ ) e nei topi trattati con STZ + PDX1 ( $8,4 \pm 2,6\%$ ) rispetto a quelli di controllo ( $81,2 \pm 4,2\%$ ;  $p < 0,001$ ). Parallelamente, la percentuale di cellule  $\alpha$  era più alta nei topi STZ ( $65,3 \pm 8,3\%$ ) e nei topi trattati con STZ + PDX1 ( $65,1 \pm 15,3\%$ ) rispetto ai controlli ( $17,9 \pm 3,8\%$ ;  $p = 0,004$  e  $p < 0,001$ , rispettivamente). Non sono state osservate differenze nella percentuale di cellule  $\beta$  e cellule  $\alpha$  nei topi STZ + PDX1 rispetto ai topi STZ.

Infine, quando l'analisi RT-qPCR è stata eseguita sui tessuti pancreatici ([Figura 4D](#)), non sono state osservate differenze significative in termini di espressione di *insulina*, *MaFA* e *PDX1* tra i gruppi STZ e STZ + PDX1. Tuttavia, abbiamo osservato un aumento dell'espressione genica di *NGN3* nei topi STZ-PDX1 rispetto a quelli STZ ( $N = 5$ ,  $p < 0,05$ ). L'aumento dell'espressione in STZ-PDX1 ( $56,1 \pm 8,2\%$ ) rispetto ai topi PDX1 ( $45,9 \pm 10,1\%$ ;  $p < 0,05$ ) è stato confermato dall'immunofluorescenza, che ha anche mostrato che l'espressione di *NGN3* si trovava principalmente nelle cellule duttali ([Figura 4E](#)).

## Discussione

I risultati ottenuti nel presente studio dimostrano che: 1) i pancreati affetti da T2DM sono caratterizzati da espansione di massa delle isole e proliferazione cellulare, accompagnate da interruzione delle cellule  $\beta$  e segni di apoptosi e senescenza delle cellule delle isole pancreatiche; 2) Il compartimento PDG prolifera nei pazienti diabetici e mostra segni di impegno endocrino del pancreas (espressione di insulina/glucagone e formazione di neo-isole); 3) nei topi trattati con STZ, la massa delle isole è risultata compromessa e associata alla proliferazione di PDG e alla prevalenza delle isole centrali; 4) La somministrazione di PDX1 in topi trattati con STZ ha determinato un aumento della massa delle isole e della percentuale di isole centrali, ma non è stata efficace nel ripristinare la produzione di insulina all'interno delle isole e nel ripristinare lo stato diabetico nei topi.

La progressione del T2DM è accompagnata da alterazioni patologiche nelle isole di Langerhans, che sono le conseguenze dell'alterata segnalazione dell'insulina e del fallimento delle cellule  $\beta$  ([Dooley et al., 2016](#); [Folli et al., 2018](#)). Nel presente manoscritto descriviamo che, nonostante la perdita di cellule  $\beta$  che si verifica nei pazienti con T2DM, avviene un significativo processo rigenerativo, che porta all'osservazione di isole più grandi e un aumento della massa delle isole, insieme ad una maggiore espressione del marcatore di proliferazione PCNA all'interno delle cellule insulari. In parallelo, le cellule insulari hanno mostrato una maggiore espressione di apoptosi e marcatori di senescenza cellulare. Queste osservazioni indicano che il danno alle isole durante il T2DM è accompagnato da un'attivazione dei processi rigenerativi associati alla senescenza proliferativa e all'apoptosi, limitando un rinnovamento appropriato e duraturo del pool di cellule  $\beta$ . Le proprietà rigenerative delle cellule pancreatiche endocrine e la possibile fonte di isole pancreatiche di nuova formazione sono oggetto di indagini e vivaci discussioni nella comunità scientifica ([Domínguez-Bendala et al., 2019](#)). Studi di lineage tracing hanno prodotto risultati contraddittori sull'argomento, sia escludendo che individuando un possibile ruolo delle cellule

progenitrici nel rinnovamento endocrino del pancreas ([Dor et al., 2004](#); [Xiao et al., 2013](#); [Song et al., 2015](#); [Yuchi et al., 2015](#)). Nonostante la possibilità di replicazione delle cellule endocrine mature ([Meier et al., 2008](#); [van der Meulen et al., 2017](#)), diversi studi hanno identificato popolazioni cellulari con caratteristiche progenitrici sia nelle insulae che nel compartimento duttale ([Martin-Pagola et al., 2008](#); [Huch et al., 2013](#); [El-Gohary et al., 2016](#); [Qadir et al., 2018](#); [Wang et al., 2020](#)). I risultati ottenuti nel presente manoscritto supportano che molteplici percorsi rigenerativi si stanno verificando nella pancreata T2DM: 1) l'allargamento delle isole e l'aumento della proliferazione delle cellule insulari supportano il concetto di replicazione delle cellule endocrine mature; 2) l'individuazione di una maggiore percentuale di isole pancreatiche in prossimità di rami intra- e interlobulari del dotto pancreatico suggerisce un ruolo della plasticità del dotto pancreatico nella generazione delle isole; infine, 3) la comparsa di segni di rigenerazione delle isole endocrine nei PDG, associati a dotti pancreatici più grandi, delinea ulteriormente il coinvolgimento di questo peculiare compartimento cellulare.

È stato dimostrato che i resti dei comuni precursori epato-bilio-pancreatici sono ospitati all'interno dell'albero biliare e del sistema del dotto pancreatico postnatale ([Carpino et al., 2012](#); [Carpino et al., 2014](#); [Carpino et al., 2016a](#)). Queste cellule mostrano caratteristiche delle cellule staminali/progenitrici e, in particolare, potenza verso il destino pancreatico endocrino maturo *in vitro* e/o in condizioni specifiche *in vivo*. Le cellule isolate dall'albero biliare e dai PDG hanno dimostrato la capacità di differenziarsi in strutture funzionali simili a isole pancreatiche senza riprogrammazione cellulare quando coltivate in un mezzo definito ormonalmente ([Cardinale et al., 2015](#)); le capacità funzionali di queste cellule sono state dimostrate anche trapiantando le neo-isole differenziate in un modello murino di diabete, che ha portato ad un miglioramento del profilo glicemico dei topi ([Wang et al., 2013](#)). Inoltre, sono state osservate modifiche nel compartimento PBG all'interno dell'albero biliare sia nel diabete umano che in quello murino. In queste impostazioni, i PBG hanno mostrato cellule con ampi segni di proliferazione e sono stati caratterizzati dalla sovraregolazione dei marcatori correlati al destino pancreatico (ad esempio MafA) ([Carpino et al., 2016b](#)). Prove simili stanno ora emergendo per il ruolo del compartimento cellulare PDG come nicchia di precursori impegnati destinati ai destini pancreatici. Queste cellule possono essere identificate dalla co-espressione di marcatori staminali/progenitori dell'endoderma (es. Sox9) e marcatori staminali/progenitori pancreatici (es. Pdx1 o Ngn3) ([Yamaguchi et al., 2015](#); [Carpino et al., 2016a](#); [Qadir et al., 2020](#)). Nel presente manoscritto, abbiamo descritto la presenza di strutture simili a isole all'interno del compartimento PDG nei dotti pancreatici dei pazienti con T2DM; queste strutture contenevano cellule positive all'insulina e al glucagone e mostravano una rete microvascolare ben organizzata, suggerendo proprietà funzionali. Pertanto, questi dati supportano ulteriormente il ruolo dei PDG come possibile compartimento rigenerativo nel pancreas. Tuttavia, nessun marcatore/promotore specifico per i PDG è stato ancora individuato per distinguere le cellule PDG dall'epitelio superficiale del dotto pancreatico; pertanto, è impossibile giudicare l'effettiva cellula di origine degli isolotti associati a PDG.

È interessante notare che i dotti caratterizzati dalla comparsa di neoislets presentavano anche lesioni displastiche dell'epitelio e dei PDG. T2DM è stato collegato allo sviluppo dell'adenocarcinoma del dotto pancreatico (PDAC) ([Qadir et al., 2020](#)) attraverso diversi possibili meccanismi che includono sia fattori di rischio sistemici che processi locali ([Duvillié et al., 2020](#)).

Per quanto riguarda quest'ultimo, è stato ipotizzato che l'iperinsulinemia intrapancreatica potrebbe innescare una risposta nelle cellule duttali attraverso i recettori dell'insulina e, in particolare sulle cellule trasformate, dalla via di segnalazione IGF-1. Ciò potrebbe portare alla proliferazione anche all'interno del compartimento esocrino e predisporre allo sviluppo di PDAC ([Andersen et al., 2017](#)). Inoltre, le cellule insulari danneggiate possono acquisire un fenotipo secretorio associato alla senescenza che può supportare ulteriormente lo sviluppo del cancro ([Cantor e David, 2014](#); [Thompson et al., 2019](#)). È interessante notare che osservazioni precedenti hanno mostrato una relazione tra l'attivazione del compartimento PDG dopo la lesione e lo sviluppo di PDAC ([Strobel et al., 2010](#); [Yamaguchi et al., 2015](#); [Yamaguchi et al., 2016](#)). I nostri risultati sono in accordo con questa evidenza, suggerendo come l'attivazione del PDG nei pazienti con T2DM potrebbe essere correlata all'emergere di lesioni displastiche dei dotti pancreatici, possibilmente predisponenti allo sviluppo del cancro.

Infine, abbiamo studiato la possibilità di indurre la rigenerazione delle cellule  $\beta$  pancreatiche in un modello murino di diabete (cioè il topo STZ) mediante somministrazione di PDX1. Nel nostro modello, abbiamo osservato un aumento della porzione di isole centrali e della vicinanza delle isole al dotto pancreatico rispetto ai controlli in tutti i topi STZ e, soprattutto, in quelli trattati con PDX1, che hanno anche mostrato un recupero della massa delle isole rispetto ai topi STZ. Tuttavia, il trattamento con PDX1 non è stato efficace nel ripristinare una popolazione funzionale a cellule  $\beta$  e nel salvare il diabete nei topi, il che potrebbe essere dovuto a diversi aspetti. Le strategie di riprogrammazione si sono dimostrate efficaci nella conversione delle cellule in cellule funzionali che secernono insulina *in vivo*, inducendo i geni pancreatici chiave *NGN3*, *PDX1* e *MAFA* ([Zhou et al., 2008](#); [Banga et al., 2012](#)). Il nostro approccio si basava sulla somministrazione intraperitoneale di un singolo fattore e non richiedeva manipolazione genetica. Con ulteriori miglioramenti delle condizioni e delle modalità di somministrazione, questo potrebbe rappresentare un approccio fattibile da tradurre in ambito clinico al fine di ottenere risultati positivi sulla produzione di insulina e sull'inversione del diabete. Inoltre, l'ampio danno derivante dalla somministrazione di STZ e la continua lesione durante il washout STZ potrebbero ostacolare l'efficace rigenerazione delle cellule  $\beta$  funzionali in questo modello. È interessante notare che l'aumento delle cellule alfa nei topi trattati con STZ potrebbe rappresentare un meccanismo compensativo temporaneo nelle cellule beta stressate in cui stanno tornando a uno stato de-differenziato. In quest'ottica, il decorso temporale dell'impostazione sperimentale potrebbe rappresentare un limite dello studio; un decorso temporale più lungo potrebbe consentire di monitorare il recupero della massa delle cellule beta. Tuttavia, il nostro approccio ha avuto successo nel supportare l'evidenza di processi rigenerativi soprattutto all'interno delle isole pancreatiche centrali, rappresentando una prova di concetto per un possibile ruolo di PDX1 nel supportare la rigenerazione delle isole pancreatiche derivate dalla dutta.

In conclusione, forniamo ulteriori prove che la rigenerazione delle isole pancreatiche avviene nei pazienti con DMT2 e che le isole rigeneranti possono essere associate al sistema del dotto pancreatico e alla nicchia delle cellule PDG. Inoltre, la proliferazione indotta nel sistema duttale nei pazienti con T2DM potrebbe avere un ruolo nello sviluppo della PDAC. Infine, forniamo un rapporto sull'efficacia della somministrazione di PDX1 per supportare l'aumento della rigenerazione pancreatica endocrina nel modello murino di diabete STZ. Sono necessari studi

futuri al fine di sviluppare strategie efficaci e fattibili per utilizzare lo stesso approccio per ripristinare lo stato diabetico e ripristinare la popolazione di cellule  $\beta$  all'interno delle isole.

## **Dichiarazione sulla disponibilità dei dati**

I dati grezzi a sostegno della conclusione di questo articolo saranno resi disponibili dagli autori, senza indebite riserve.

## **Dichiarazione etica**

Gli studi che hanno coinvolto partecipanti umani sono stati esaminati e approvati dall'Institutional Review Board del Policlinico Umberto I e dalla Sapienza Università di Roma. I

pazienti/partecipanti hanno fornito il loro consenso informato scritto a partecipare a questo studio. Tutti gli esperimenti sugli animali sono stati approvati dal comitato istituzionale per la cura e l'uso degli animali della Sapienza Università di Roma e dal Ministero della Salute italiano (auth #172/2018-PR).

## **Contributi dell'autore**

GC e DO erano responsabili del concetto e della progettazione dello studio, dell'acquisizione dei dati, dell'analisi e dell'interpretazione dei dati, della stesura del manoscritto e delle revisioni critiche del manoscritto per importanti contenuti intellettuali, analisi statistica e supervisione dello studio. VC, MMo, LN, EDS, GF, LF, DS, MMa e LR erano responsabili dell'acquisizione dei dati, dell'analisi e dell'interpretazione dei dati, della stesura del manoscritto, della revisione critica del manoscritto per importanti contenuti intellettuali e del supporto tecnico o materiale. AF, PO, LR, DA ed EG erano responsabili del concetto e della progettazione dello studio, dell'interpretazione dei dati, della stesura del manoscritto, della revisione critica del manoscritto per importanti contenuti intellettuali, dell'ottenimento di finanziamenti e della supervisione dello studio.

## **Finanziamento**

**Lo studio è stato sostenuto da assegni di ricerca della Sapienza Università di Roma (EG, PO, AF) e della Federazione Nazionale Diabete Giovanile (FDG).**

## **Conflitto di interessi**

**La Federazione Nazionale Diabete Giovanile (FDG) detiene un brevetto relativo al Pdx1 ricombinante utilizzato in questo studio.**

**Gli autori dichiarano che la ricerca è stata condotta in assenza di relazioni commerciali o finanziarie che potrebbero essere interpretate come un potenziale conflitto di interessi.**

## **Nota dell'editore**

Tutte le affermazioni espresse in questo articolo sono esclusivamente quelle degli autori e non rappresentano necessariamente quelle delle loro organizzazioni affiliate, o quelle dell'editore, degli editori e dei revisori. Qualsiasi prodotto che possa essere valutato in questo articolo, o che possa essere fatto dal suo produttore, non è garantito o approvato dall'editore.

## **Riconoscimenti**

Gli autori ringraziano gentilmente la Federazione Nazionale Diabete Giovanile, e il suo consiglio composto dal Prof. Giorgio Federici, dal Prof. Domenico Casa, dal prof. Rocco Panetta e dal Dott. Antonio Cabras, per il continuo supporto.

## **Materiale supplementare**

Il materiale supplementare per questo articolo è disponibile online

all'indirizzo: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fcell.2022.814165/full#supplementary-material>

## **Referenze**

Andersen, D. K., Korc, M., Petersen, G.M., Eibl, G., Li, D., Rickels, M. R., et al. (2017). Diabete, diabete pancreatogenico e cancro al pancreas. *Diabete* 66, 1103-1110. DOI:10.2337/db16-1477

[| abstract di PubMed](#) | [di testo completo CrossRef](#) [Google Scholar](#)

Banga, A., Akinci, E., Greder, L. V., Dutton, J. R. e Slack, J.M. W. (2012). Riprogrammazione *in vivo* delle cellule Sox9+ nel fegato in dotti secernenti insulina. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 109, 15336–15341. DOI:10.1073/pnas.1201701109

[| abstract di PubMed](#) | [di testo completo CrossRef](#) [Google Scholar](#)

Cantor, D. J. e David, G. (2014). SIN3B, SASP e cancro al pancreas. *Cell Oncol.* 1, e969167.

DOI:10.4161/23723548.2014.969167

[| abstract di PubMed](#) | [di testo completo CrossRef](#) [Google Scholar](#)

Cardinale, V., Puca, R., Carpino, G., Scafetta, G., Renzi, A., De Canio, M., et al. (2015). Le cellule staminali dell'albero biliare umano adulto si differenziano in cellule insulari  $\beta$ -pancreatiche mediante trattamento con un peptide Pdx1 umano ricombinante. *PloS uno* 10, e0134677.

DOI:10.1371/journal.pone.0134677

[| abstract di PubMed](#) | [di testo completo CrossRef](#) [Google Scholar](#)

Cardinale, V., Wang, Y., Carpino, G., Mendel, G., Alpini, G., Gaudio, E., et al. (2012). L'albero biliare-Un serbatoio di cellule staminali multipotenti. *Nat. Rev. Gastroenterol. Epatolo.* 9, 231–240. DOI:10.1038/nrgastro.2012.23

[| abstract di PubMed](#) | [di testo completo CrossRef](#) [Google Scholar](#)

Carpino, G., Cardinale, V., Gentile, R., Onori, P., Semeraro, R., Franchitto, A., et al. (2014).

Evidenza di popolazioni di cellule staminali / progenitrici endodermiche multipotenti nella cistifellea umana. *J. Epatolo.* 60, 1194–1202. DOI:10.1016/j.jhep.2014.01.026

[| di testo completo CrossRef](#) [Google Scholar](#)

Carpino, G., Cardinale, V., Onori, P., Franchitto, A., Berloco, P.B., Rossi, M., et al. (2012). Cellule staminali / progenitrici dell'albero biliare nelle ghiandole dei dotti biliari extraepatici e intraepatici: uno studio anatomico *in situ* che produce prove di lignaggi maturativi. *J. Anat.* 220, 186–199.

DOI:10.1111/j.1469-7580.2011.01462.x

[| di testo completo CrossRef](#) [Google Scholar](#)

Carpino, G., Puca, R., Cardinale, V., Renzi, A., Scafetta, G., Nevi, L., et al. (2016a). Ghiandole peribiliari come una nicchia di precursori extrapancreatici che producono cellule produttrici di insulina nel diabete sperimentale e umano. *Cellule staminali* 34, 1332-1342.

DOI:10.1002/stem.2311

[| abstract di PubMed](#) | [di testo completo CrossRef](#) [Google Scholar](#)

Carpino, G., Renzi, A., Cardinale, V., Franchitto, A., Onori, P., Overi, D., et al. (2016b). Nicchie di cellule progenitrici nel sistema del dotto pancreatico umano e nelle ghiandole del dotto pancreatico associate: uno studio anatomico e immunofenotipico. *J. Anat.* 228, 474–486.

DOI:10.1111/joa.12418

[| di testo completo CrossRef Google Scholar](#)

Chomczynski, P., e Sacchi, N. (2006). Il metodo a fase singola di isolamento dell'RNA mediante estrazione acida di guanidinio tiocianato-fenolo-cloroformio: vent'anni dopo. *Protoc.* 1, 581–585.

DOI:10.1038/nprot.2006.83

[| abstract di PubMed | di testo completo CrossRef Google Scholar](#)

Domínguez-Bendala, J., Qadir, M.M. F. e Pastori, R. L. (2019). Progenitori pancreatici: andata e ritorno. *Tendenze Endocrinol. Metab.* 30, 4–11. DOI:10.1016/j.tem.2018.10.002

[| abstract di PubMed | di testo completo CrossRef Google Scholar](#)

Dooley, J., Tian, L., Schonefeldt, S., Delghingaro-Augusto, V., Garcia-Perez, J. E., Pasciuto, E., et al. (2016). La predisposizione genetica per la fragilità delle cellule beta è alla base del diabete di tipo 1 e di tipo 2. *Genet.* 48, 519–527. DOI:10.1038/ng.3531

[| abstract di PubMed | di testo completo CrossRef Google Scholar](#)

Dor, Y., Brown, J., Martinez, O. I., e Melton, D. A. (2004). Le cellule  $\beta$  pancreatiche adulte sono formate dall'autoduplicazione piuttosto che dalla differenziazione delle cellule staminali. *Natura* 429, 41–46. DOI:10.1038/nature02520

[| abstract di PubMed | di testo completo CrossRef Google Scholar](#)

Duvillié, B., Kourdoughli, R., Druillennec, S., Eychène, A., e Pouponnot, C. (2020). Interazione tra diabete e adenocarcinoma duttale pancreatico e insulinoma: il ruolo dell'invecchiamento, dei fattori genetici e dell'obesità. *Fronte. Endocrinolo.* 11, 563267. DOI:10.3389/fendo.2020.563267

[| di testo completo CrossRef Google Scholar](#)

El-Gohary, Y., Wiersch, J., Tulachan, S., Xiao, X., Guo, P., Rymer, C., et al. (2016). I dotti pancreatici intraislet possono dare origine a cellule insulino-positive. *Endocrinologia* 157, 166-175. DOI:10.1210/it.2015-1175

[| abstract di PubMed | di testo completo CrossRef Google Scholar](#)

Folli, F., La Rosa, S., Finzi, G., Davalli, A.M., Galli, A., Dick, E. J., et al. (2018). Isolotto pancreatico della citoarchitettura e dell'ultrastruttura di Langerhans nella normale tolleranza al glucosio e nel diabete mellito di tipo 2. *Diabete obeso. Metab.* 20 (Suppl. 2), 137–144. DOI:10.1111/dom.13380

[| abstract di PubMed | di testo completo CrossRef Google Scholar](#)

Huch, M., Bonfanti, P., Boj, S. F., Sato, T., Loomans, C. J.M., van de Wetering, M., et al. (2013). *Espansione in vitro illimitata* di progenitori pancreatici bipotenti adulti attraverso l'asse Lgr5/R-Spondin. *EMBO J.* 32, 2708–2721. DOI:10.1038/emboj.2013.204

[| abstract di PubMed | di testo completo CrossRef Google Scholar](#)

Lanzoni, G., Cardinale, V., e Carpino, G. (2016). La rete epatica, biliare e pancreatico delle nicchie di cellule staminali / progenitrici negli esseri umani: un nuovo quadro di riferimento per la malattia e la rigenerazione. *Epatologia* 64, 277–286. DOI:10.1002/hep.28326

[| abstract di PubMed | di testo completo CrossRef Google Scholar](#)

Leiter, E. H., e Schile, A. (2013). Modelli genetici e farmacologici per il diabete di tipo 1. *Curr. Protoc. mouse Biol.* 3, 9–19. DOI:10.1002/9780470942390.mo120154

[| abstract di PubMed](#) | [di testo completo CrossRef](#) [Google Scholar](#)

Martin-Pagola, A., Sisino, G., Allende, G., Dominguez-Bendala, J., Gianani, R., Reijonen, H., et al. (2008). Proteina dell'insulina e proliferazione nelle cellule duttali nel pancreas trapiantato di pazienti con diabete di tipo 1 e recidiva di autoimmunità. *Diabetologia* 51, 1803-1813.

DOI:10.1007/s00125-008-1105-x

[| abstract di PubMed](#) | [di testo completo CrossRef](#) [Google Scholar](#)

Mathieu, C., Martens, P.-J., e Vangoitsenhoven, R. (2021). Cento anni di terapia insulinica. *Endocrinolo.* 17, 715–725. DOI:10.1038/s41574-021-00542-w

[| abstract di PubMed](#) | [di testo completo CrossRef](#) [Google Scholar](#)

Meier, J. J., Butler, A. E., Saisho, Y., Monchamp, T., Galasso, R., Bhushan, A., et al. (2008).  $\beta$ -cellula è il meccanismo primario che serve l'espansione postnatale della massa  $\beta$ -cellulare negli esseri umani. *Diabete* 57, 1584-1594. DOI:10.2337/db07-1369

[| abstract di PubMed](#) | [di testo completo CrossRef](#) [Google Scholar](#)

Merkwitz, C., Blaschuk, O. W., Schulz, A., Lochhead, P., Meister, J., Ehrlich, A., et al. (2013). L'origine duttale dell'eterogeneità strutturale e funzionale tra le isole pancreatiche. *Prog. Istochem. Citochem.* 48, 103–140. DOI:10.1016/j.proghi.2013.09.001

[| abstract di PubMed](#) | [di testo completo CrossRef](#) [Google Scholar](#)

Qadir, M.M. F., Álvarez-Cubela, S., Klein, D., Lanzoni, G., García-Santana, C., Montalvo, A., et al. (2018). Le cellule che esprimono P2RY1 / ALK3 all'interno del pancreas esocrino umano adulto sono espandibili BMP-7 e presentano caratteristiche simili a progenitori. *Cel Rep.* 22, 2408–2420. DOI:10.1016/j.celrep.2018.02.006

[| abstract di PubMed](#) | [di testo completo CrossRef](#) [Google Scholar](#)

Qadir, M.M. F., Álvarez-Cubela, S., Klein, D., van Dijk, J., Muñoz-Anquela, R., Moreno-Hernández, Y.B., et al. (2020). Analisi della risoluzione unicellulare della nicchia delle cellule progenitrici duttali pancreatiche umane. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 117, 10876–10887.

DOI:10.1073/pnas.1918314117

[| abstract di PubMed](#) | [di testo completo CrossRef](#) [Google Scholar](#)

Song, I., Patel, O., Himpe, E., Muller, C. J. F. e Bouwens, L. (2015). Ripristino della massa delle cellule beta in topi diabetici alloxan trattati con EGF e gastrina. *PloS uno* 10, e0140148.

DOI:10.1371/journal.pone.0140148

[| abstract di PubMed](#) | [di testo completo CrossRef](#) [Google Scholar](#)

Strobel, O., Rosow, D. E., Rakhlin, E. Y., Lauwers, G. Y., Trainor, A. G., Alsina, J., et al. (2010). Le ghiandole del dotto pancreatico sono compartimenti duttali distinti che reagiscono alle lesioni croniche e mediano la metaplasia indotta da Shh. *Gastroenterologia* 138, 1166-1177.

DOI:10.1053/j.gastro.2009.12.005

[| abstract di PubMed](#) | [di testo completo CrossRef](#) [Google Scholar](#)

Thompson, P. J., Shah, A., Ntranos, V., Van Gool, F., Atkinson, M., e Bhushan, A. (2019).

L'eliminazione mirata delle cellule beta senescenti previene il diabete di tipo 1. *Cel Metab.* 29, 1045–1060. DOI:10.1016/j.cmet.2019.01.021

[| abstract di PubMed](#) | [di testo completo CrossRef](#) [Google Scholar](#)

van der Meulen, T., Mawla, A.M., DiGrucchio, M. R., Adams, M. W., Nies, V., Dólleman, S., et al. (2017). Le cellule beta vergini persistono per tutta la vita in una nicchia neogenica all'interno delle isole pancreatiche. *Cel Metab.* 25, 911–926. DOI:10.1016/j.cmet.2017.03.017

[| di testo completo CrossRef Google Scholar](#)

Wang, D., Wang, J., Bai, L., Pan, H., Feng, H., Clevers, H., et al. (2020). Espansione a lungo termine degli organoidi delle isole pancreatiche dai progenitori Procr+ residenti. *Cella* 180, 1198–1211. DOI:10.1016/j.cell.2020.02.048

[| abstract di PubMed](#) | [| di testo completo CrossRef Google Scholar](#)

Wang, Y., Lanzoni, G., Carpino, G., Cui, C.B., Dominguez-Bendala, J., Wauthier, E., et al. (2013). Cellule staminali dell'albero biliare, precursori dei progenitori pancreatici impegnati: prove di possibile organogenesi pancreatica per tutta la vita. *Cellule staminali* 31, 1966-1979. DOI:10.1002/stem.1460

[| abstract di PubMed](#) | [| di testo completo CrossRef Google Scholar](#)

Xiao, X., Chen, Z., Shiota, C., Prasad, K., Guo, P., El-Gohary, Y., et al. (2013). Nessuna evidenza di neogenesi delle cellule  $\beta$  nel pancreas adulto murino. *J. Clin. Investire.* 123, 2207–2217. DOI:10.1172/jci66323

[| di testo completo CrossRef Google Scholar](#)

Yamaguchi, J., Liss, A. S., Sontheimer, A., Mino-Kenudson, M., Castillo, C. F.-d., Warshaw, A. L., et al. (2015). Le ghiandole del dotto pancreatico (PDG) sono un compartimento progenitore responsabile della riparazione dell'epitelio duttale pancreatico. *Stelo Cel. Res.* 15, 190–202. DOI:10.1016/j.scr.2015.05.006

[| di testo completo CrossRef Google Scholar](#)

Yamaguchi, J., Mino-Kenudson, M., Liss, A. S., Chowdhury, S., Wang, T.C., Fernández-del Castillo, C., et al. (2016). La perdita di Fattore Trefoil 2 dalle ghiandole del dotto pancreatico promuove la formazione di neoplasie mucinose papillari intraduttali nei topi. *Gastroenterologia* 151, 1232-1244. DOI:10.1053/j.gastro.2016.07.045

[| abstract di PubMed](#) | [| di testo completo CrossRef Google Scholar](#)

Yoneda, S., Uno, S., Iwahashi, H., Fujita, Y., Yoshikawa, A., Kozawa, J., et al. (2013). Predominanza della neogenesi a cellule  $\beta$  piuttosto che della replicazione negli esseri umani con una ridotta tolleranza al glucosio e diabete di nuova diagnosi. *J. Clin. Endocrinolo. Metab.* 98, 2053–2061. DOI:10.1210/jc.2012-3832

[| di testo completo CrossRef Google Scholar](#)

Yuchi, Y., Cai, Y., Legein, B., De Groef, S., Leuckx, G., Coppens, V., et al. (2015). Il recettore degli estrogeni  $\alpha$  regola la formazione di cellule  $\beta$  durante lo sviluppo del pancreas e dopo le lesioni. *Diabete* 64, 3218-3228. DOI:10.2337/db14-1798

[| abstract di PubMed](#) | [| di testo completo CrossRef Google Scholar](#)

Zhou, Q., Brown, J., Kanarek, A., Rajagopal, J., e Melton, D. A. (2008). Riprogrammazione in vivo di cellule esocrine pancreatiche adulte in cellule  $\beta$ . *Natura* 455, 627–632. DOI:10.1038/nature07314

[| abstract di PubMed](#) | [| di testo completo CrossRef Google Scholar](#)

**Parole chiave:** cellule staminali/progenitrici, pancreas endocrino, streptozotocina, Pdx1, insulina  
**Citazione:** Overi D, Carpino G, Moretti M, Franchitto A, Nevi L, Onori P, De Smaele E, Federici L, Santorelli D, Maroder M, Reid LM, Cardinale V, Alvaro D e Gaudio E (2022) Rigenerazione

delle isole e ghiandole del dotto pancreatico nel diabete umano e sperimentale. *Fronte. Biol.* 10:814165. DOI: 10.3389/fcell.2022.814165

**Ricevuto il:** 12 novembre 2021; **Accettato:** 10 gennaio 2022;

**Pubblicato:** 04 febbraio 2022.

A cura di:

**Jianjun Zhou**, Università di Tongji, Cina

Recensito da:

**Fahd Qadir**, Tulane University, Stati

**UnitiNashwa El-Tahawy**, Minia University, Egitto

**Copyright** © 2022 Overi, Carpino, Moretti, Franchitto, Nevi, Onori, De Smaele, Federici, Santorelli, Maroder, Reid, Cardinale, Alvaro e Gaudio. Questo è un articolo ad accesso aperto distribuito sotto i termini della **Creative Commons Attribution License (CC BY)**. L'uso, la distribuzione o la riproduzione in altri forum è consentita, a condizione che l'autore o gli autori originali e i proprietari del copyright siano accreditati e che la pubblicazione originale in questa rivista sia citata, in conformità con la pratica accademica accettata. Non è consentito alcun uso, distribuzione o riproduzione che non sia conforme a questi termini.

**\*Corrispondenza:** Guido Carpino, **guido.carpino@uniroma1.it**

**Disconoscimento:** Tutte le affermazioni espresse in questo articolo sono esclusivamente quelle degli autori e non rappresentano necessariamente quelle delle loro organizzazioni affiliate, o quelle dell'editore, degli editori e dei revisori. Qualsiasi prodotto che possa essere valutato in questo articolo o reclamo che possa essere fatto dal suo produttore non è garantito o approvato dall'editore.

