

21. Ottobre

Neuroimmunometabolismo e obesità

*Oh Dio, se non puoi farmi dimagrire,
fa' almeno che i miei amici ingrassino.*

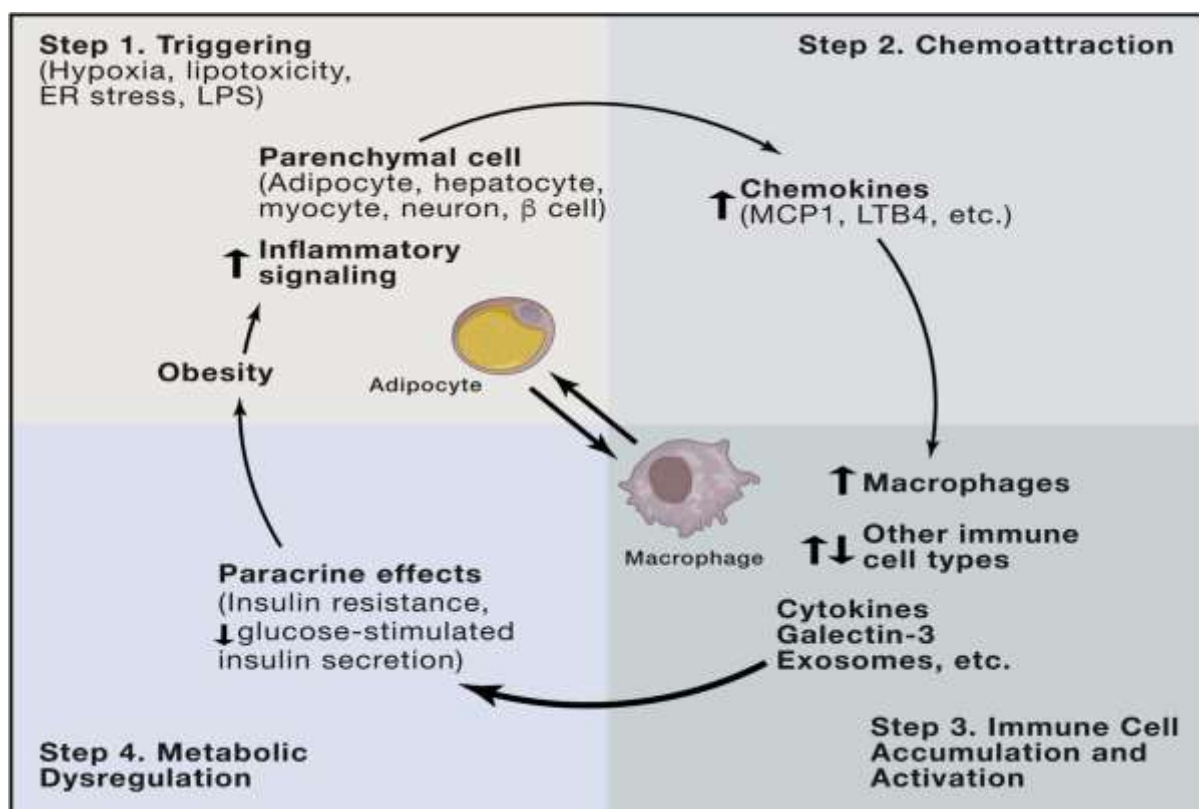
Erma Bombeck

È noto che un bilancio energetico cronico **positivo** provoca **obesità** e la massa grassa corporea aumenta quando **l'assunzione di energia** supera il **dispendio energetico**. L'epidemia mondiale di obesità è emersa come una delle principali cause di insulino-resistenza e diabete di tipo 2. **L'infiammazione cronica** dei tessuti è una caratteristica ben nota **dell'obesità** e il campo dell'**immunometabolismo** ha assistito a molti progressi negli ultimi anni.

C'è un crescente interesse della **diafonia** varia e talvolta integrata tra le cellule all'interno di un tessuto (intraorgano) e i tessuti all'interno di un organismo (intero organo) che supporta **l'infiammazione** nel contesto della **disregolazione metabolica**. La comprensione di questi percorsi e modalità di comunicazione ha enormi implicazioni per gli studi traslazionali.

Studi emergenti, in particolare quelli **del Department of Medicine, Division of Endocrinology and Metabolism, University of San Diego, La Jolla**, hanno rivelato che l'obesità è associata **all'infiammazione cronica** e alle risposte immunitarie, un aspetto centrale dell'immunometabolismo.

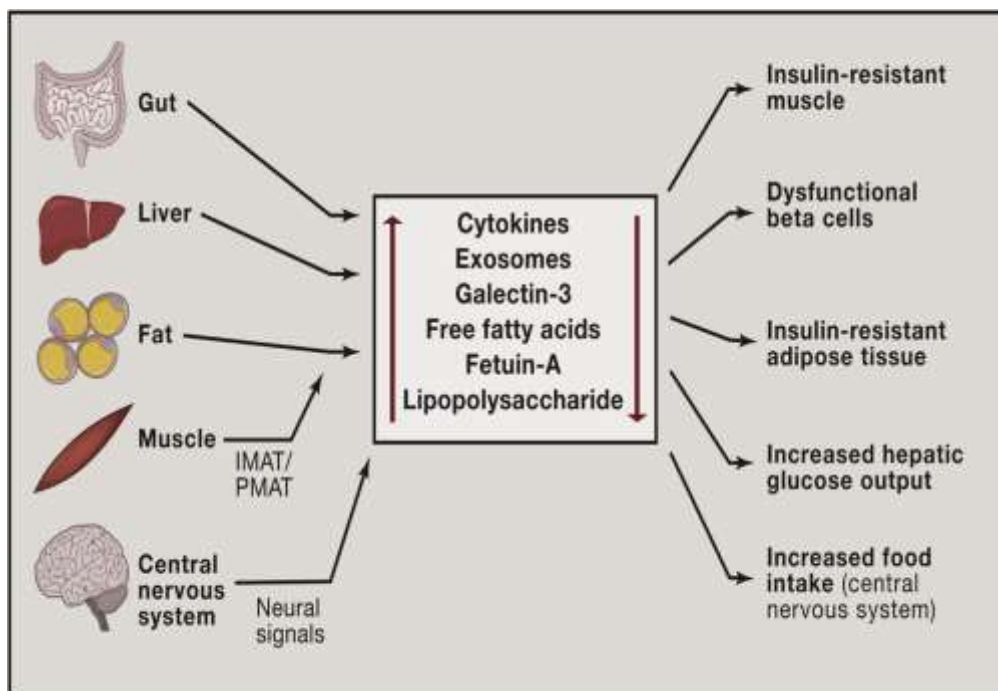
La tabella riassume i Meccanismi di cross-talk intraorgano e indica schematicamente come l'obesità porta a vari eventi scatenanti, come stress ER, ipossia e lipotossicità, che possono avviare l'attivazione di vie proinfiammatorie all'interno delle cellule parenchimali dei tessuti



Lo **Step1** indica come parte del meccanismo di attivazione in queste cellule parenchimali, porta alla secrezione di una varietà di chemochine (**Step 2**), e successivamente alla chemiotassi e alla migrazione dei macrofagi, nonché di altri tipi di cellule immunitarie, nel tessuto sottostante (**Step 3**). Nel complesso, queste cellule immunitarie assumono un fenotipo proinfiammatorio e secernono una serie di fattori (citochine, galectina-3, esosomi contenenti miRNA, ecc.), che esercitano effetti paracrini locali per causare insulino-resistenza negli adipociti, epatociti e miociti, oppure GSIS ridotto nelle cellule β (**Step4**).

L'**obesità** porta a **un'inflammatione cronica** nei tessuti metabolici (fegato, tessuto adiposo e muscoli). Provoca anche **disbiosi nel tratto gastrointestinale** e **gliosi nel SNC**. Una volta stabiliti questi eventi, questi tessuti elaborano quindi un gran numero di fattori secretori che non solo agiscono localmente (effetti paracrini), ma possono anche entrare nella circolazione causando effetti distali sulla sensibilità all'insulina, sul GSIS e sull'assunzione di cibo.

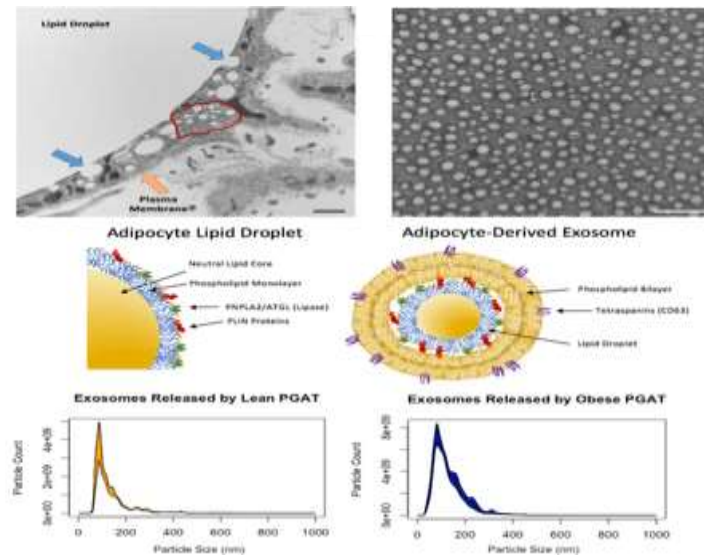
Questi fattori, esemplificati da citochine, esosomi contenenti miRNA, galectina-3, FFA, fetuina A e LPS non agiscono in isolamento ma possono agire in modo additivo o coordinato sui siti di azione dei tessuti. Ciascun fattore ha il potenziale per influenzare la produzione e la secrezione di alcuni degli altri fattori, aumentando la complessità della rete integrata che comprende il crosstalk metabolico tra organi.



Lee Yset al. *An Integrated View of Immunometabolism*. *Cell*. 2018 Jan 11;172(1-2):22-40.

Per soddisfare i fabbisogni metabolici sistemici, gli **adipociti** rilasciano acidi grassi e glicerolo attraverso l'azione delle lipasi neutre.

Il team del **Department of Medicine, Naomi Berrie Diabetes Center, Columbia University** ha dimostrato che esiste un percorso secondario di rilascio di lipidi dagli adipociti che è indipendente dalla lipolisi canonica. Gli adipociti rilasciano vescicole piene di lipidi (**AdExos**) delle dimensioni di *un esosoma* che diventano una fonte di lipidi per i macrofagi locali.



Il tessuto adiposo di topi magri rilascia circa **l'1%** del suo contenuto lipidico al giorno attraverso gli esosomi ex vivo, un tasso che più che **raddoppia negli animali obesi**.

AdExos e fattori associati sono sufficienti per indurre la differenziazione in vitro dei precursori del midollo osseo in cellule simili ai macrofagi del tessuto adiposo. Pertanto, **AdExos** rappresenta una *via alternativa* di rilascio lipidico locale che un meccanismo mediante il quale le cellule parenchimali possono modulare la differenziazione e la funzione dei macrofagi tissutali.

In sintesi i macrofagi, le cellule immunitarie più abbondanti nel tessuto adiposo bianco (WAT), intervengono nella omeostasi metabolica regolando l'utilizzo del glucosio, l'accumulo di lipidi e il dispendio energetico degli adipociti

Flaherty SE 3rd et al. A lipase-independent pathway of lipid release and immune modulation by adipocytes. Science. 2019 Mar 1;363(6430):989-993.

L'interazione tra **Neuroimmunologia** e **Immunometabolismo** è particolarmente prevalente all'interno del tessuto adiposo, dove le cellule immunitarie e il sistema nervoso simpatico (SNS) hanno un ruolo importante **nell'omeostasi metabolica** e nella patologia, in particolare nell'obesità. Il ciclo neuroendocrino facilitato principalmente dalla **leptina** derivata dal tessuto adiposo e dalla noradrenalina derivata dal SNS, l'ampia diafonia tra adipociti e cellule immunitarie innate residenti, nonché i cambiamenti che si verificano in queste vie secretorie e di segnalazione nell'obesità costituiscono lo scenario di questa interazione che costituisce la base del **Neuroimmunometabolismo**.

In questo contesto *Larabee, Neely e Domingos* del *Department of Physiology, Anatomy & Genetics, Oxford University, Oxford*, hanno dimostrato un ruolo centrale per i **macrofagi residenti** nel SNS nella modulazione del crosstalk SNS-adiposo



dimostrando come i **macrofagi adiposi pro-infiammatori** alterati migliorano la resistenza all'insulina indotta dall'obesità e l'intolleranza al glucosio **nello stato obeso**, **mentre i macrofagi antinfiammatori** mantengono l'ambiente insulino-sensibile **nello stato magro**
Larabee CM et al. Obesity: a neuroimmunometabolic perspective. Nat Rev Endocrinol. 2020 Jan;16(1):30-43.

I **mitocondri** sono coinvolti nel mantenimento della crescita e della funzione cellulare. Sono responsabili della *fosforilazione ossidativa, della produzione di energia, dell'omeostasi metabolica, della regolazione redox e dell'apoptosi cellulare.*

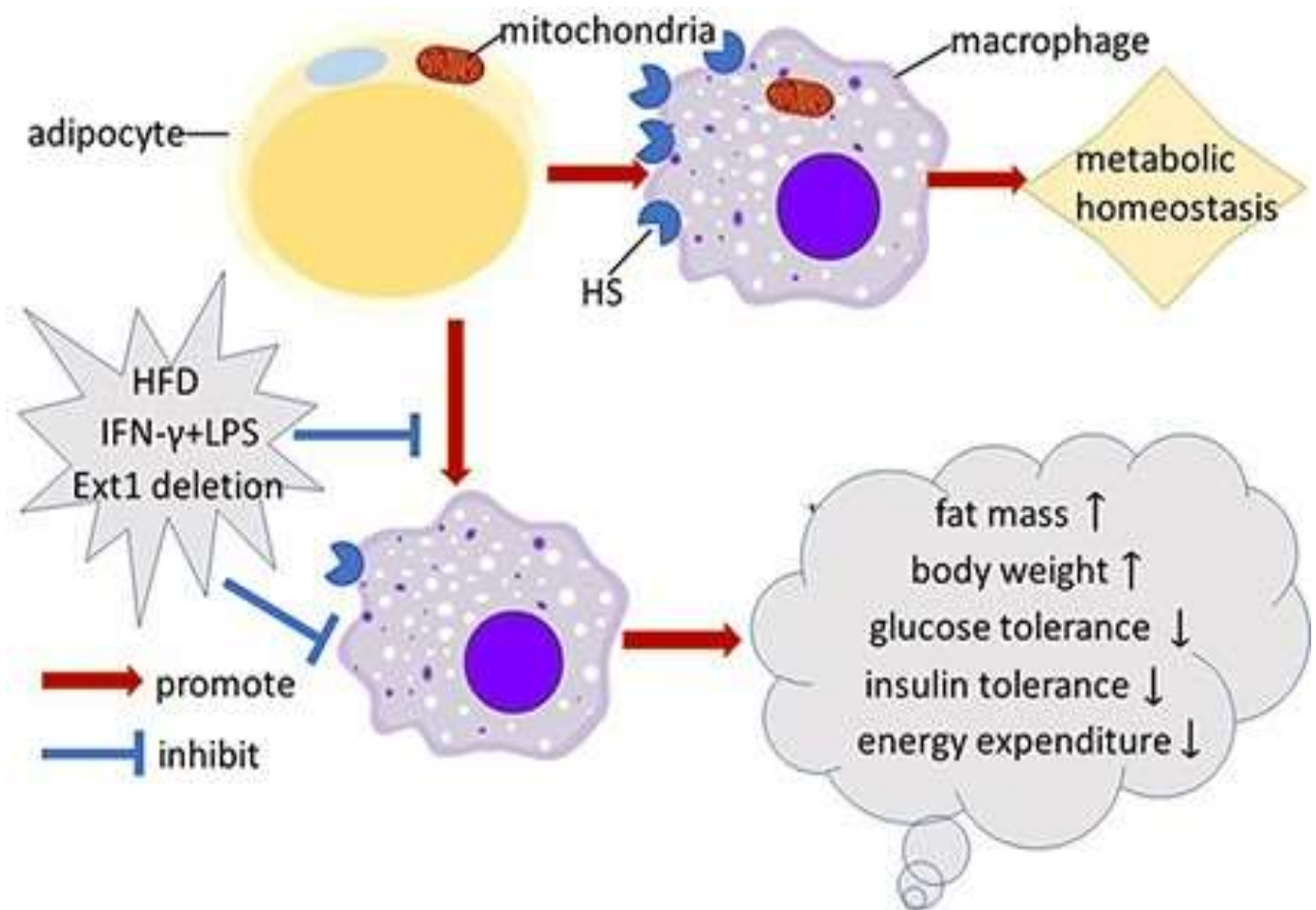
Pertanto, non sorprende che la **disfunzione mitocondriale** sia associata a molte malattie, comprese le malattie metaboliche, i disturbi neurodegenerativi, i tumori metastatici e così via

Recentemente, il **trasferimento intercellulare** dei mitocondri ha attirato grande attenzione da parte dei ricercatori di medicina di base come trattamento promettente in diversi contesti terapeutici (vedi allegato 1)

Lightowers RN et al. Mitochondrial transplantation-a possible therapeutic for mitochondrial dysfunctionEMBO Rep. 2020 Sep 3;21(9):e50964.

I **mitocondri** sono da sempre considerati le **unità generatrici di energia** della cellula a causa del loro ruolo chiave nel metabolismo energetico e nella segnalazione cellulare.

Mitocondri funzionanti, mitocondri associati alle vescicole extracellulari, e il DNA dei mitocondri possono essere trovati nella circolazione e possono essere trasferiti naturalmente tra cellule e tessuti sia nei topi che nell'uomo



I mitocondri sono considerati le unità generatrici di energia della cellula a causa del loro ruolo chiave nel metabolismo energetico e nella segnalazione cellulare. Tuttavia, i componenti mitocondriali potrebbero essere trovati nello spazio extracellulare, come frammenti o incapsulati in vescicole.

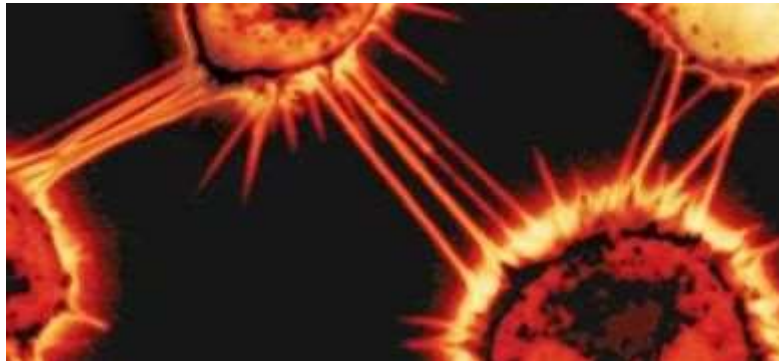
I ricercatori del **IRCM, di Montpellier** hanno dimostrato che mitocondri vengono rilasciati dalle **piastrine** in condizioni specifiche

Le cellule normali e quelle in coltura tumorale sono in grado di secernere i loro mitocondri. Utilizzando la centrifugazione seriale o la filtrazione seguita da metodi basati sulla reazione a catena della polimerasi e dal sequenziamento del genoma intero, rileviamo il DNA mitocondriale extracellulare a lunghezza intera in particelle superiori a 0.22 μm contenenti specifiche proteine della membrana mitocondriale. Sono stati identificate queste particelle e come mitocondri privi di cellule intatti utilizzando l'analisi di smistamento cellulare attivata dalla fluorescenza, la microscopia a fluorescenza e la microscopia elettronica a trasmissione.

L'analisi del consumo di ossigeno ha rivelato che questi mitocondri sono respiratori competenti ed il loro trasferimento intercellulare, potrebbe ampliare notevolmente la portata della biologia della comunicazione cellula-cellula .

Al Amir Dache Z et al *Blood contains circulating cell-free respiratory competent mitochondria.* *FASEB J.* 2020 *Mar*;34(3):3616-3630.

I **nanotubi tunneling** sono stati identificati come mediatori del trasferimento mitocondriale intercellulare. Queste estensioni aperte basate sul citoscheletro consentono il trasporto di mitocondri tra le cellule *in vivo*.



Nel frattempo, gruppi di ricerca, si sono concentrati sull'isolamento dei mitocondri funzionali e li hanno iniettati direttamente nelle cellule o nei tessuti riceventi. Finora, diversi studi hanno dimostrato che le cellule carenti di **mitocondri possono acquisire mitocondri dall'ambiente** per migliorare lo stato metabolico.

Laboratorio di biologia polmonare della Columbia University ha dimostrato che le cellule stromali derivate dal midollo osseo possono trasferire i mitocondri negli alveoli polmonari per proteggersi dal danno polmonare acuto.

Le cellule stromali derivate dal midollo osseo (BMSC) proteggono dal danno polmonare acuto (ALI). La presenza di mitocondri derivati da BMSC negli epitelii era evidente otticamente, così come dalla presenza di DNA mitocondriale umano nei polmoni di topo instillati con hBMSC. Il trasferimento mitocondriale ha comportato un aumento delle concentrazioni di ATP alveolare.

ALI indotta da LPS, come indicato da leucocitosi alveolare e perdita di proteine, l'inibizione della secrezione di tensioattivo e l'elevata mortalità, è stata notevolmente abrogata dall'instillazione di mBMSC di tipo selvaggio ma non di mBMSC mutanti, GJC-incompetenti o mBMSC con mitocondri disfunzionali.

In sintesi i BMSC proteggono dall'ALI restituendo la bioenergetica alveolare attraverso l'attaccamento alveolare Cx43-dipendente e il trasferimento mitocondriale.

Islam MN et al. Mitochondrial transfer from bone-marrow-derived stromal cells to pulmonary alveoli protects against acute lung injury. Nat Med. 2012 Apr 15;18(5):759-65.

Il Neuroprotection Research Laboratory della Harvard Medical School ha dimostrato che i neuroni possono rilasciare i mitocondri danneggiati e trasferirli agli astrociti per lo smaltimento e il riciclaggio. Questa capacità di scambiare i mitocondri può rappresentare una potenziale modalità di segnalazione da cellula a cellula nel sistema nervoso centrale.

In modelli sperimentali è stato dimostrato come gli astrociti possono rilasciare mitocondri funzionali che entrano nei neuroni. Il rilascio astrocitico di particelle mitocondriali extracellulari è mediato da un meccanismo calcio-dipendente che coinvolge CD38 e segnalazione ciclica del ribosio ADP. L'ischemia cerebrale focale transitoria nei topi ha indotto l'ingresso di mitocondri astrocitici nei neuroni adiacenti e questo ingresso ha amplificato i segnali di sopravvivenza cellulare.

La soppressione della segnalazione di CD38 da parte di un breve RNA interferente ha ridotto il trasferimento di mitocondri extracellulari e ha peggiorato gli esiti neurologici.

In sintesi gli astrociti possono trasferire i mitocondri funzionali ai neuroni per supportare la vitalità neuronale dopo ictus ischemico

Hayakawa K et al. Transfer of mitochondria from astrocytes to neurons after stroke. Nature. 2016 Jul ;535(7613):551-5.

Il paradigma attuale è che il dolore infiammatorio si risolve passivamente dopo la cessazione dell'infiammazione. Tuttavia, in una percentuale sostanziale di pazienti con malattie infiammatorie, la risoluzione dell'infiammazione non è sufficiente per risolvere il dolore, con conseguente dolore cronico. Manca l'intuizione meccanicistica su come viene risolto il dolore infiammatorio.

Il Center for Translational Immunology di Utrecht University ha dimostrato che i macrofagi trasferiscono i mitocondri ai neuroni sensoriali per risolvere il **dolore infiammatorio cronico**. Ha dimostrato inoltre che i macrofagi controllano attivamente la risoluzione del dolore infiammatorio a distanza dal sito dell'infiammazione trasferendo i mitocondri ai neuroni sensoriali.

Durante la risoluzione del dolore infiammatorio, i **macrofagi simili a M2** si infiltrano nei gangli della radice dorsale che contengono i somi dei neuroni sensoriali, in concomitanza con il recupero della fosforilazione ossidativa nei neuroni sensoriali. La risoluzione del dolore e il trasferimento dei mitocondri richiede l'espressione del recettore CD200 (CD200R) sui macrofagi e del ligando CD200R non canonico iSec1 sui neuroni sensoriali.

van der Vlist M et al. [Macrophages transfer mitochondria to sensory neurons to resolve inflammatory pain](#). *Neuron*. 2022 Feb 16;110(4):613-626.e9.

Tuttavia, non è noto se i macrofagi interagiscano direttamente con gli adipociti per supportare l'omeostasi metabolica sistemica. Studi recenti suggeriscono che i mitocondri possono essere trasferiti tra le cellule per supportare la sopravvivenza delle cellule metabolicamente compromesse. Tuttavia, rimane sconosciuto se il trasferimento intercellulare dei mitocondri avvenga nel tessuto adiposo bianco (WAT) o regoli l'omeostasi metabolica in vivo.

Il team **Jonathan Brestoff** del *Department of Pathology and Immunology della Washington University School of Medicine*



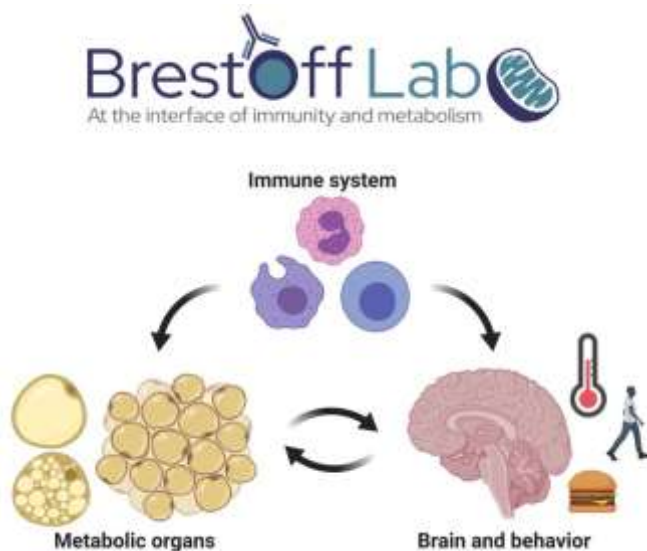
Ha dimostrato che i macrofagi acquisiscono i mitocondri dagli adipociti vicini in vivo e che questo processo definisce una sottopopolazione di **macrofagi trascrizionalmente distinta**.

Uno schermo knockout CRISPR-Cas9 dell'intero genoma ha rivelato che l'assorbimento dei mitocondri dipende da **Eparan-solfato (HS)**.

I topi obesi indotti da dieta ricca di grassi (HFD) mostrano livelli di HS inferiori sui macrofagi WAT e un ridotto trasferimento di mitocondri intercellulari dagli adipociti ai macrofagi. La delezione del gene biosintetico HS Ext1 nelle cellule mieloidi diminuisce l'assorbimento dei mitocondri da parte dei macrofagi WAT, aumenta la massa WAT, riduce il dispendio energetico ed esacerba l'obesità indotta da HFD in vivo.

In sintesi:

Collettivamente, questo studio suggerisce che adipociti e macrofagi impiegano il trasferimento di mitocondri intercellulari come meccanismo di *diafonia immunometabolica* che regola l'omeostasi metabolica ed è compromessa nell'obesità.



Brestoff JR et al. Intercellular Mitochondria Transfer to Macrophages Regulates White Adipose Tissue Homeostasis and Is Impaired in Obesity. Cell Metab. 2021 Feb 2;33(2):270-282.e8.

La microscopia intravitale a due fotoni ha inoltre rivelato che i mitocondri non erano attaccati alla superficie ma interiorizzati nei macrofagi. Da notare, questo processo è stato significativamente compromesso nell'obesità indotta da dieta ricca di grassi (HFD). Questi risultati implicavano una riduzione del trasferimento dei mitocondri come caratteristica dell'obesità, che potrebbe essere considerata un obiettivo per salvare le cellule metabolicamente disfunzionali. Inoltre, gli approcci genetici, farmacologici ed enzimatici hanno pienamente confermato che i geni di biosintesi dei proteoglicani dell'eparan solfato (HS) erano fondamentali per l'assorbimento dei mitocondri sia in vitro che in vivo. Coerentemente, hanno scoperto che i macrofagi dei topi alimentati con HFD diminuivano notevolmente l'espressione di HS rispetto a quella dei controlli alimentati con cibo

L' **Unidad de Gestión Clínica Endocrinología y Nutrición, Instituto de Investigación Biomédica de Málaga** coordinato da **Mercedes Clemente-Postigo** ha dimostrato che nell'obesità, il WAT subisce cambiamenti metabolici e infiammatori. Inoltre, l'infiammazione e le risposte immunitarie influenzano gli eventi metabolici sistemici. Ha dimostrato inoltre che le citochine pro-infiammatorie come l'interferone (IFN)- γ , il lipopolisaccaride (LPS) e altri stimoli attivano la polarizzazione dei macrofagi pro-infiammatori M1 in WAT nell'obesità, mentre le citochine antinfiammatorie come l'interleuchina (IL)-4 e IL-13 guida la polarizzazione dei macrofagi simili a M2.

Clemente-Postigo M et al. Metabolic endotoxemia promotes adipose dysfunction and inflammation in human obesity. Am J Physiol Endocrinol Metab. 2019 Feb 1;316(2):E319-E332.

Coerentemente con questo risultato il team di Brestoff et al ha anche scoperto che quando trattati con IFN- γ (10 ng/ml) più LPS (1 ng/ml), i macrofagi erano polarizzati verso un fenotipo M1, che diminuiva l'espressione del gene della biosintesi HS e alterava il trasferimento dei mitocondri da adipociti a macrofagi nelle cellule BV2, mentre IL-4 (20 ng/ml) non ha avuto effetto. Inoltre, le popolazioni di macrofagi simili a

M1 e M2 hanno ridotto il trasferimento dei mitocondri nell'obesità indotta da HFD e la percentuale di trasferimento dei mitocondri ai macrofagi era correlata ai loro livelli di HS.

Ciò ha rappresentato un dialogo incrociato in cui le cellule immunitarie coinvolte nella risposta infiammatoria hanno indotto malattie metaboliche come l'obesità. Collettivamente, questi dati indicavano chiaramente che una riduzione del trasferimento dei mitocondri ai macrofagi era un carattere dell'obesità.

La prossima domanda è se il trasferimento intercellulare dei mitocondri può influenzare il metabolismo sistemico. Infatti, Brestoff *et al* ha precedentemente ipotizzato che le interazioni tra adipociti e cellule immunitarie erano fondamentali per regolare l'omeostasi metabolica, mentre l'interruzione di questo equilibrio potrebbe indurre un'infiammazione patologica e promuovere l'obesità o altre malattie metaboliche.

Successivamente ha dimostrato che la delezione condizionale di [Ext1](#) (un gene biosintetico HS) nelle cellule mieloidi riduce i livelli di [HS](#) dei macrofagi e compromette l'assorbimento dei mitocondri, aumentando il peso corporeo e riducendo il dispendio energetico. Inoltre, questi cambiamenti sono stati accompagnati da ridotta tolleranza al glucosio, ridotta tolleranza all'insulina e esacerbata obesità indotta dalla dieta nei topi

Brestoff JR, Artis D. *Immune regulation of metabolic homeostasis in health and disease. Cell. 2015 Mar 26;161(1):146-160. doi: 10.1016/j.cell.2015.02.022. PMID: 25815992; PMCID: PMC4400287.*

È interessante ricordare che i pazienti con mutazioni eterozigoti in [Ext1](#) hanno interrotto la sintesi di HS, che ha portato a un alterato metabolismo del glucosio e dei lipidi

Mooij HL *et al*, [Ext1 heterozygosity causes a modest effect on postprandial lipid clearance in humans. J Lipid Res. 2015 Mar;56\(3\):665-673.](#)

Inoltre, studi di associazione sull'intero genoma hanno identificato un nuovo loci di rischio **T2DM** [in Ext2](#), che contribuisce all'allungamento della [catena HS](#)

Sladek R *et al*. [A genome-wide association study identifies novel risk loci for type 2 diabetes. Nature. 2007 Feb 22;445\(7130\):881-5.](#)

Conclusioni...

Pertanto il **Neuroimmunometabolismo** rivela una nuova modalità di diafonia da cellula a cellula all'interno del tessuto adiposo. Tuttavia, il limite di questo studio è che non è ancora del tutto chiara la distinzione tra mitocondri funzionali dai mitocondri disfunzionali negli adipociti WAT.

Le prove hanno dimostrato che l'obesità potrebbe causare disfunzione mitocondriale, che a sua volta potrebbe attivare un circolo vizioso che ha portato all'obesità e alle malattie metaboliche.

Sono necessari ulteriori studi per identificare i mitocondri funzionali ed esplorare come questi mitocondri si trasferiscono ai macrofagi influenzano l'omeostasi metabolica.

Allegato

La disfunzione mitocondriale.

La disfunzione mitocondriale provoca malattie mitocondriali, comprese varie malattie neurodegenerative comuni, ed è implicata nel processo di invecchiamento. Di conseguenza, sta diventando un obiettivo importante per le aziende biotecnologiche e farmaceutiche. Ad oggi, tuttavia, ci sono stati pochi o nessun successo. I problemi affrontati nella correzione della disfunzione mitocondriale vanno dall'identificazione di bersagli adatti alla mancanza di metodi che trasferiscano i mitocondri in modo affidabile. Un nuovo approccio ha recentemente attirato l'attenzione sia degli scienziati che del pubblico in generale: trapiantare i mitocondri completamente funzionali direttamente nelle cellule difettose. Potrebbe essere troppo bello per essere vero?

La Malattia mitocondriale

Mentre molte malattie mitocondriali influiscono sulla funzione neurologica, i mitocondri difettosi possono interessare qualsiasi tipo di tessuto e i sintomi sono spesso multisistemici e complessi. A complicare ulteriormente le cose, il mitocondrio contiene il proprio genoma, mtDNA, che codifica solo tredici degli oltre 1.000 polipeptidi che compongono il mitocondrio. Mutazioni patogene che causano malattie mitocondriali possono quindi verificarsi in entrambi i genomi. In generale, gli adulti tendono ad avere mutazioni nel mtDNA, mentre gravi difetti neonatali hanno geni nucleari aberranti. Nel loro insieme, la malattia mitocondriale è tra le forme più comuni di disturbo neurologico ereditario con una prevalenza minima di 1:5.000.

Concetti attuali per il trattamento della disfunzione mitocondriale

Quando si trattano in modo specifico i difetti patogeni del mtDNA, è importante ricordare che non è necessario riparare tutti i mitocondri difettosi poiché la presenza di un numero sufficientemente elevato di mitocondri attivi in una popolazione eterogenea può essere sufficiente per ripristinare la normale funzione tissutale. Le strategie di trattamento per la disfunzione mitocondriale in generale rientrano nelle seguenti categorie: (i) aumento della biogenesi mitocondriale; (ii) ridurre i mitocondri disfunzionali e sostituirli con quelli attivi; (iii) bypassare o sostituire il componente difettoso; (iv) prendere di mira le conseguenze della disfunzione mitocondriale; o (v) riprogrammazione del metabolismo .

Certamente, identificare metodi per promuovere la proliferazione mitocondriale è una strategia interessante. Ad esempio, un esercizio attento è ancora una delle terapie più promettenti per la malattia mitocondriale, sebbene non sia chiaro se aumenti la biogenesi mitocondriale come ci si potrebbe aspettare. La proliferazione come metodo per il salvataggio della funzione mitocondriale è supportata anche da esperimenti su topi con malattia mitocondriale che sovraesprimono PGC1alfa, un mediatore chiave della biogenesi mitocondriale. Mostra che, almeno in alcuni casi di disfunzione mitocondriale, è utile avere un numero maggiore di mitocondri *in totale* anche se una proporzione è disfunzionale. Ciò dovrebbe essere bilanciato con l'osservazione che il trattamento con rapamicina di un altro modello murino con deficit respiratorio ha contribuito a ritardare i sintomi, possibilmente promuovendo un aumento del turnover dei mitocondri disfunzionali.

Un concetto che non è stato affrontato nella revisione sopra menzionata ([Russell et al , 2020](#)) è se l'aumento della massa mitocondriale mediante trapianto mitocondriale di *per sé* potrebbe essere un approccio praticabile, che affronteremo in questo articolo.

Aumento della massa mitocondriale trapiantando i mitocondri "normali" nelle cellule colpite

Sorprendentemente, ci sono molti rapporti che affermano che tale trapianto in cellule, tessuti, sistemi modello e persino in pazienti, sia autologhi che non autologhi, è stato efficace. Questi includono ischemia miocardica/lesione da riperfusione, lesione del midollo spinale e modelli di morbo di Parkinson in cui, notevolmente, l'efficacia è stata riportata solo dopo l'introduzione endovenosa di mitocondri.

Il trasferimento mitocondriale è stato osservato anche naturalmente *in vivo*: in risposta a un'ischemia cerebrale indotta focalmente, gli astrociti vicini al sito della lesione hanno trasferito particelle incorporate mitocondrialmente mediante un processo controllato CD34 + mediato endocitoticamente nei neuroni, (Hayakawa *et al*, [2016](#)). È interessante notare che gli autori sono stati attenti a sottolineare che non erano state valutate soglie quantitative per produrre alcun beneficio funzionale. I nanotubi tunneling (TNT) sono stati anche implicati come mediatori del trasporto mitocondriale intercellulare. Queste estensioni tubulari aperte basate sul citoscheletro consentono lo scambio diretto di metaboliti, proteine, particelle virali e organelli tra le cellule in coltura *in vivo*, spesso come conseguenza di stress. In effetti, il trasferimento mitocondriale tramite TNT è stato osservato tra cellule staminali pluripotenti e una varietà di tipi di cellule riceventi *in vitro*, portando spesso a una maggiore produzione di ATP, consumo di ossigeno e vitalità cellulare (rivisto in rif. Murray & Krasnodembskaya, [2019](#)).

Inoltre, le vescicole extracellulari, essenzialmente secrezioni cellulari legate alla membrana, possono occasionalmente contenere mitocondri. Islam *e altri* ([2012](#)) hanno riferito che i mitocondri sono stati trasferiti dalle cellule staminali mesenchimali alle cellule epiteliali alveolari polmonari e hanno osservato un conseguente aumento dei livelli di ATP nelle cellule riceventi. È stato dimostrato che le cellule epiteliali producono sia microvescicole che TNT per promuovere il trasferimento mitocondriale.

Certamente, tutti questi dati sfidano la nostra comprensione di come si comportano gli organelli nelle cellule e di conseguenza dovremmo richiedere alti livelli di rigore per supportare queste affermazioni. Ciò è diventato ancora più essenziale poiché vengono pianificati ed eseguiti studi clinici che utilizzano il trapianto mitocondriale. Tuttavia, se i processi descritti in questi rapporti sono robusti, avrebbe un grande potenziale per la terapia mitocondriale.

I mitocondri iniettati o importati nelle cellule mantengono l'attività?

Il lavoro in molti laboratori ha dimostrato che i citoplasti enucleati possono essere ricostruiti con nuclei donatori, il che ha portato al concetto di terapia sostitutiva mitocondriale per prevenire la trasmissione di mitocondri difettosi tra le generazioni. Questo metodo non deve essere confuso con i tentativi di integrare gli ovociti con piccole quantità di ooplasma o direttamente con i mitocondri isolati dalle cellule staminali oogoniali adulte per aumentare i tassi di fertilità nella fecondazione *in vitro*. Entrambi i metodi hanno sollevato sostanziali preoccupazioni per quanto riguarda l'efficacia e la sicurezza (rivisto in (Kristensen *et al*, [2017](#))). In molti casi ben documentati, i citoplasti sono stati utilizzati anche per trasmettere mitocondri funzionali a cellule prive di mtDNA, producendo cibridi transcondriali. In tutti questi casi, i mitocondri non sono stati isolati ma trasferiti insieme al citosol. Numerosi esperimenti di controllo confermano che il ripristino della funzione dipende in modo critico dal trasferimento dei mitocondri *attivi*. Pertanto, la domanda se i mitocondri isolati mantengono l'attività quando vengono iniettati direttamente nelle cellule o nei tessuti è particolarmente importante poiché i mitocondri isolati vengono ora utilizzati per trattare i pazienti, con malattia mitocondriale o danno da ischemia/riperfusione miocardica.

Per quanto riguarda il fatto che i mitocondri mantengano completamente la loro integrità al di fuori del citoplasma, sappiamo da molti anni che ciò è possibile per gli organelli isolati ma solo se preparati con cura in mezzi specificamente integrati. Questo è un problema chiave, perché il mantenimento di un robusto potenziale di membrana è essenziale per il normale funzionamento. Ad esempio, è estremamente difficile far rivivere i mitocondri dei mammiferi che sono stati conservati al di sotto dei 4°C, poiché i cristalli di ghiaccio ne distruggono l'integrità. Tra molti altri stress, l'iniezione di mitocondri isolati in un ambiente extracellulare eserciterebbe un cambiamento sostanziale nella concentrazione di ioni calcio. Ciò potrebbe causare una perdita rapida e potenzialmente irreversibile del potenziale della membrana mitocondriale a causa dell'apertura del poro di transizione della permeabilità mitocondriale. Il mantenimento di un elevato potenziale di membrana è probabilmente la funzione più importante dei mitocondri ed è ugualmente cruciale quando vengono iniettati direttamente nelle cellule, dove ci si aspetterebbe che si fondano con una rete mitocondriale funzionale. L'inferenza, che risale a esperimenti negli anni '80, suggerisce che potrebbe essere possibile, almeno per un'attenta iniezione di mitocondri appena isolati ma l'efficienza di questo processo è estremamente scarsa e senza una forte selezione per i mitocondri iniettati mtDNA e tempo per facilitare la selezione, l'effetto complessivo sulla funzione cellulare sarà minimo. Indipendentemente da ciò, i mitocondri, in particolare quelli che hanno perso il loro potenziale di membrana, sono costantemente capovolti nella cellula, deducendo che se i mitocondri trapiantati hanno avuto qualche beneficio, questo potrebbe essere solo di breve durata.

Considerando tutti questi avvertimenti, è difficile vedere come il trapianto possa portare a benefici a lungo termine direttamente dai mitocondri trapiantati. Alcune di queste straordinarie affermazioni potrebbero essere spiegate con effetti più indiretti? Vari rapporti sul trapianto mitocondriale si concentrano sul miglioramento degli effetti del danno da riperfusione a seguito di ischemia nel tessuto cardiaco. Questi hanno portato a sperimentazioni pilota con un piccolo numero di pazienti pediatrici con ischemia cardiaca sottoposti a ECMO (ossigenazione extracorporea della membrana); uno studio simile è attualmente in fase di reclutamento (NCT02851758). Sono stati riportati effetti positivi con 4 su 5 pazienti che mostravano una migliore funzione ventricolare ([Emani et al, 2017](#)), ma questi studi sono stati messi in discussione ([Bertero et al, 2018](#)). Il gruppo che ha condotto questi studi ha precedentemente suggerito che almeno una parte dei risultati benefici potrebbe essere causata da effetti extracellulari. Forse i mitocondri extracellulari potrebbero promuovere una cascata di segnali semplicemente essendo in prossimità di cellule in difficoltà? Questa ipotesi avrebbe il doppio vantaggio in quanto potrebbe spiegare come una quantità così evanescente di organelli importati possa avere un così forte effetto protettivo. Tali effetti positivi sono stati osservati anche in altri esperimenti di trapianto mitocondriale e potrebbero spiegare in modo simile la cinetica di protezione, che sembra verificarsi prima che gli organelli entrino nella cellula. Tuttavia, poiché esperimenti di controllo hanno dimostrato che l'effetto protettivo richiede mitocondri funzionanti,

In un modello ischemico di cuore di maiale, i mitocondri preetichettati sono stati trovati fino a 4 settimane dopo l'iniezione, sebbene gli autori non ne abbiano analizzato la funzionalità ([Kaza et al, 2017](#)). Studi bioenergetici più recenti sui mitocondri isolati trasferiti nei cardiomiociti hanno riportato conseguenze benefiche su OXPHOS 2 giorni dopo l'iniezione ([Ali Pour et al, 2020](#)), ma questo effetto positivo non è stato mantenuto. Lo stesso studio ha rilevato un beneficio simile con il trasferimento non autologo e anche con il trasferimento interspecie. Quest'ultimo è particolarmente sorprendente, poiché il genoma mitocondriale non può essere espresso naturalmente in tali incroci interspecie. Ciò implicherebbe che, affinché il trasferimento

interspecie produca un effetto funzionale dopo 2 giorni, la proteina mitocondriale importata dovrebbe essere conservata, funzionale e non degradata durante questo periodo.

La conservazione di un effetto duraturo dipenderà dall'espressione attiva del mtDNA wild-type. Pertanto, una probabile spiegazione per qualsiasi effetto positivo derivante dal trasferimento mitocondriale è che il mitocondrio trapiantato è semplicemente un vettore per fornire mtDNA normale alla rete mitocondriale. Ciò sarebbe potenzialmente molto vantaggioso, poiché attualmente non esiste un metodo non invasivo per fornire il DNA all'organello. Un numero maggiore di copie del mtDNA wild-type può essere molto utile, soprattutto perché molte mutazioni del mtDNA sono funzionalmente recessive. Indipendentemente da ciò, sarebbe sorprendente se il numero complessivo di copie non tornasse a livelli normali e gli effetti notevolmente rapidi riportati sul trasferimento di alcuni mitocondri non sarebbero completamente compatibili con questa ipotesi.

Se il trapianto mitocondriale può effettivamente fornire copie normali del mtDNA alla rete mitocondriale e in un modo che ne consenta l'espressione naturale, come potrebbe essere utilizzato il processo per curare i pazienti? Un possibile approccio è trasferire i mitocondri alle cellule staminali *ex vivo*. Curiosamente, uno studio precedente ha mostrato che le cellule staminali muscolari, le cosiddette cellule satelliti, quando attivate dalla degenerazione muscolare indotta, erano in grado di riparare il deficit respiratorio mitocondriale nel muscolo di un paziente con un disturbo mitocondriale che portava sia normale (bassi livelli) che forme patogene (alti livelli) di mtDNA. In questo caso, il mtDNA wild-type è stato fornito dalle cellule satelliti attivate endogene, ma, sfortunatamente, il salvataggio è stato possibile solo in un'area muscolare molto piccola. Per essere utile terapeuticamente, deve in qualche modo aumentare i livelli di mitocondri normali in un gran numero di cellule staminali tissutali. Questo è attualmente in fase di sperimentazione in uno studio clinico per pazienti con una specifica malattia del mtDNA, la sindrome di Pearson, iniettando i mitocondri non affetti nelle cellule staminali dei pazienti *ex vivo*.

Il processo di Pearson

La sindrome del midollo osseo di Pearson è una malattia mitocondriale rara e grave che colpisce i neonati, causata da delezioni nel genoma mitocondriale. Come in tanti casi di malattia mitocondriale, la specificità tissutale è profonda e può variare tra i pazienti, ma la logica alla base di questa specificità è attualmente sconosciuta. Tra molti altri sintomi, il midollo osseo e il pancreas sono particolarmente colpiti, con conseguente pancitopenia (un grave difetto nelle dimensioni e nel numero di tutti i tipi di cellule del sangue), forte dolore allo stomaco e diabete. Non esiste una cura e i pazienti alla fine muoiono di profonda acidemia lattica, sepsi o insufficienza epatica. Tre bambini con la sindrome di Pearson e uno con la relativa sindrome di Kearns-Sayre erano già stati sottoposti a una terapia di aumento mitocondriale nell'ambito di un programma di assistenza compassionevole. I progenitori ematopoietici e delle cellule staminali sono stati raccolti dai bambini e sottoposti ad arricchimento con mitocondri materni isolati *ex vivo* prima dell'infusione endovenosa. Sfortunatamente, i dati risultanti non erano stati sottoposti a revisione paritaria quando sono stati presentati all'incontro dell'American Society for Hematology nel dicembre 2018; una sintesi è fornita sul sito web di Minovia. È stato segnalato che la capacità aerobica e il contenuto di ATP aumentano nei linfociti di due pazienti, portando a una migliore qualità della vita. È attualmente in corso la successiva sperimentazione clinica di fase I/II, con l'obiettivo di valutare ulteriormente la sicurezza e l'efficacia dell'aumento mitocondriale.

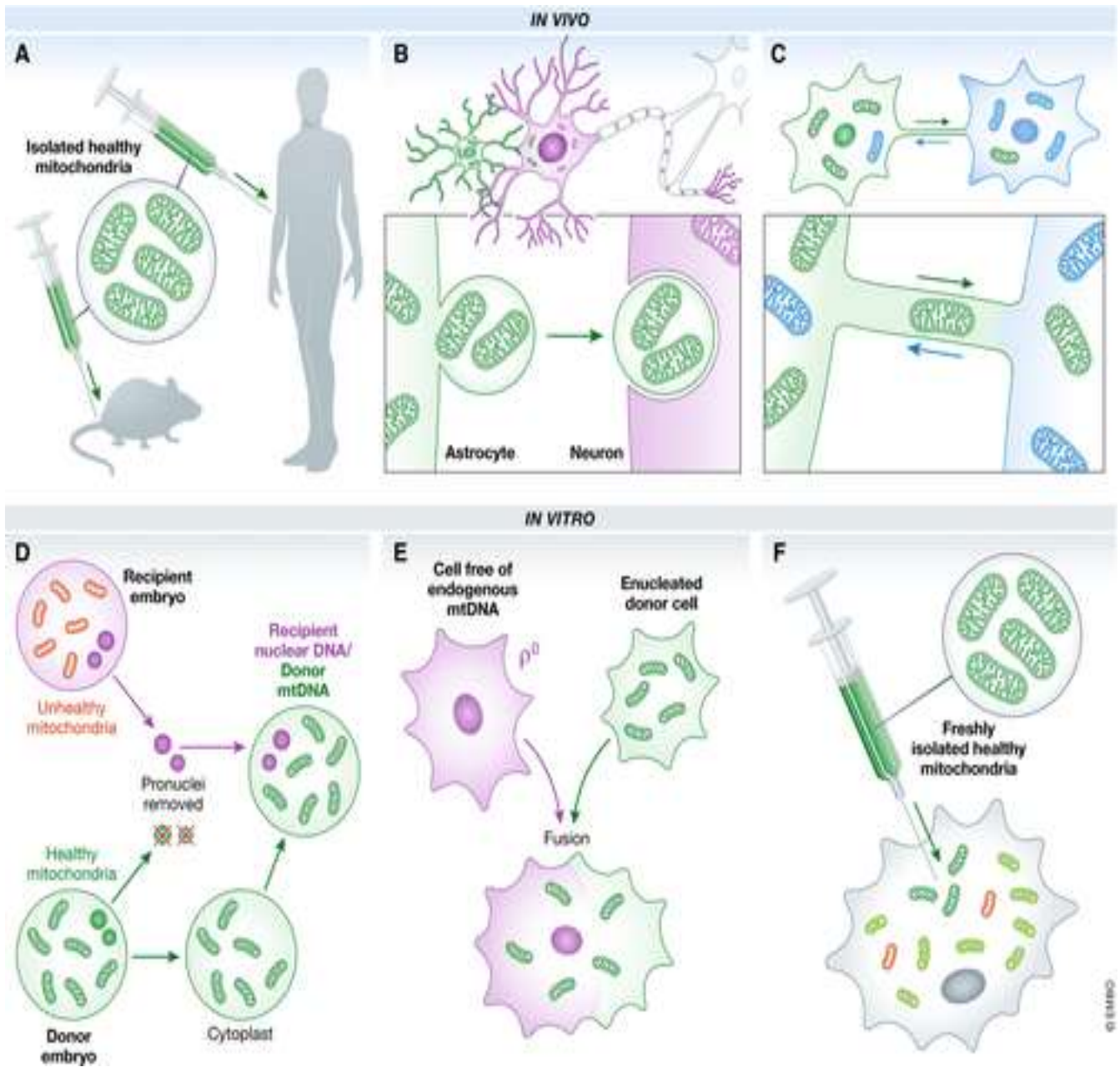
Osservazioni conclusive

Sta diventando sempre più evidente che la disfunzione mitocondriale è associata a molti difetti clinici differenti. Poiché al momento non esiste una terapia affidabile in grado di salvare la

funzione mitocondriale, dovremmo accogliere con favore tutti i progressi che si basano su una ricerca approfondita. Numerosi rapporti indicano che i difetti possono apparentemente essere migliorati dal trapianto mitocondriale endogeno o esogeno. Dovremmo considerare questi approcci con una mente aperta, a condizione che i dati di supporto siano stati completamente convalidati. Per i pazienti con una prognosi sfavorevole, come quei bambini con la sindrome di Pearson, si sostiene che qualsiasi trattamento che mostri un potenziale di successo potrebbe essere preso in considerazione anche se potremmo non capire esattamente come funziona la procedura. La chiave del progresso è che dobbiamo essere convinti che il trattamento stia effettivamente funzionando.

Riferimenti

- Ali Pour P, Kenney MC, Kheradvar A (2020) **Bioenergetics consequences of mitochondrial transplantation in cardiomyocytes.** *J Am Heart Assoc* 9:
- Bertero E, Maack C, O'Rourke B (2018) **Mitochondrial transplantation in humans: "magical" cure or cause for concern?** *J Clin Invest* 128: 5191–
- Emani SM, Piekarski BL, Harrild D, Del Nido PJ, McCully JD (2017) **Autologous mitochondrial transplantation for dysfunction after ischemia-reperfusion injury.** *J Thorac Cardiovasc Surg* 154: 286–289
- Hayakawa K, Esposito E, Wang X, Terasaki Y, Liu Y, Xing C, Ji X, Lo EH (2016) **Transfer of mitochondria from astrocytes to neurons after stroke.** *Nature* 535: 551–
- Islam MN, Das SR, Emin MT, Wei M, Sun L, Westphalen K, Rowlands DJ, Quadri SK, Bhattacharya S, Bhattacharya J (2012) **Mitochondrial transfer from bone-marrow-derived stromal cells to pulmonary alveoli protects against acute lung injury.** *Nat Med* 18: 759–
- Kaza AK, Wamala I, Friehs I, Kuebler JD, Rathod RH, Berra I, Ericsson M, Yao R, Thedsanamoorthy JK, Zurakowski D *et al* (2017) **Myocardial rescue with autologous mitochondrial transplantation in a porcine model of ischemia/reperfusion.** *J Thorac Cardiovasc*
- Kristensen SG, Pors SE, Andersen CY (2017) **Improving oocyte quality by transfer of autologous mitochondria from fully grown oocytes.**
- Murray LMA, Krasnodembskaya AD (2019) **Concise review: intercellular communication via organelle transfer in the biology and therapeutic applications of stem cells.** 25
- Russell OM, Gorman GS, Lightowers RN, Turnbull DM (2020) **Mitochondrial diseases: hope for the future.**



I mitocondri isolati di tipo selvaggio sono stati iniettati direttamente in modelli o pazienti di roditori (A). Rapporti hanno suggerito che nei siti di ischemia cerebrale, i mitocondri possono essere incapsulati come vescicole per il trasferimento dagli astrociti ed endocitati dai neuroni (B). Un altro possibile metodo di *in vivo* traffico di mitocondri tra le cellule avviene attraverso sottili estensioni aperte denominate nanotubi (C). Un metodo autorizzato è il trasferimento pronucleare in base al quale i citoplasti che ospitano mitocondri sani da un embrione sano vengono combinati con i pronuclei di un altro embrione (D). La combinazione di mitocondri con il contenuto di cellule enucleate prive di mitocondri è una tecnica ampiamente utilizzata per generare linee cellulari cibrive (E). I mitocondri sani isolati potrebbero essere iniettati in cellule che ospitano organelli (F) sani (blu) e disfunzionali (rossi).