



UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI PADOVA

Dipartimento di Medicina Animale, Produzioni e Salute

Corso di Laurea magistrale a ciclo unico in

MEDICINA VETERINARIA

**RIPROGRAMMAZIONE DEL PANCREAS ENDOCRINO
NEI GATTI DIABETICI**

Relatore

Prof. Eric Zini

Laureanda

Alice Zanon

Matricola n.

1177048

ANNO ACCADEMICO 2021/2022

SOMMARIO

RIASSUNTO	5
ABSTRACT	7
1. INTRODUZIONE	9
1.1 SVILUPPO EMBRIONALE DEL PANCREAS	9
1.1.1 ASPETTI ANATOMICI DELLO SVILUPPO.....	9
1.1.2 ASPETTI MOLECOLARI DELLO SVILUPPO	9
1.2 ANATOMIA MACROSCOPICA	11
1.2.1 CONFORMAZIONE	11
1.2.2 RAPPORTI.....	12
1.2.3 MEZZI DI FISSITÀ.....	12
1.3 ANATOMIA MICROSCOPICA	12
1.3.1 PANCREAS ESOCRINO	12
1.3.2 PANCREAS ENDOCRINO	13
1.3.3 CONDOTTI ESCRETORI.....	14
1.3.4 VASI E NERVI.....	14
1.4 FISILOGIA	15
1.4.1 PANCREAS ESOCRINO	15
1.4.2 PANCREAS ENDOCRINO	15
1.5 DIABETE MELLITO NEL GATTO	16
1.5.1 EZIOLOGIA	16
1.5.2 FISIOPATOLOGIA DEL DM DI TIPO 2.....	16

1.5.3	DIAGNOSI.....	16
1.5.4	TRATTAMENTO E MONITORAGGIO.....	17
1.6	REPROGRAMMING	17
2.	OBIETTIVI.....	19
3.	MATERIALI E METODI.....	21
3.1	SOGGETTI	21
3.2	PREPARAZIONE DEL TESSUTO	21
3.3	IMMUNOISTOCHEMICA.....	22
3.4	MORFOLOGIA DELLE ISOLE PANCREATICHE E CONTA CELLULARE.....	24
3.5	ANALISI STATISTICA	24
4.	RISULTATI E DISCUSSIONE.....	25
4.1	SOGGETTI	25
4.2	MORFOLOGIA DELLE ISOLE PANCREATICHE	25
4.3	CONTA CELLULARE.....	26
5.	CONCLUSIONE.....	29
6.	BIBLIOGRAFIA.....	31

RIASSUNTO

I fattori di trascrizione sono responsabili dello sviluppo del pancreas endocrino negli umani. In particolare, i geni *paired box-4* (PAX4) e *aristaless-related homeobox* (ARX) codificano per le omonime proteine, che fungono da fattori di trascrizione coinvolti rispettivamente nello sviluppo delle cellule β e α . Si è visto che, in età adulta, PAX4 contribuisce alla riprogrammazione delle cellule α in cellule β , ma anche delle cellule esocrine in cellule endocrine. Invece, l'induzione di ARX porta alla riprogrammazione delle cellule β in cellule α .

Per quanto riguarda il gatto, non esistono informazioni di questo tipo. L'obiettivo dello studio, quindi, era di verificare se i gatti diabetici presentavano un maggior numero di cellule pancreatiche in grado di esprimere i marcatori di sviluppo delle cellule α e β , suggerendo una possibile riprogrammazione delle cellule stesse.

La ricerca si è basata su campioni di tessuto pancreatico proveniente da 18 gatti, di cui 9 diabetici e 9 che fungevano da controllo. Il tessuto prelevato è stato fissato in formalina, incluso in paraffina e sezionato. In ogni sezione è stata valutata la presenza di insulina, glucagone, PAX4, ARX e delle diverse combinazioni degli stessi. Sono state conteggiate le cellule risultate positive o doppiamente positive per i marcatori precedentemente elencati ed è stato eseguito un confronto tra gatti diabetici e controlli.

Rispetto ai controlli, i gatti diabetici presentavano un minor numero di cellule positive per l'insulina all'interno delle isole pancreatiche ($p=0.001$ vs $p=0.038$), mentre non differiva il numero di cellule positive per il glucagone. A livello di pancreas endocrino, i gatti diabetici mostravano un maggior numero di cellule positive per la combinazione insulina e glucagone ($p=0.024$), per la proteina PAX4 ($p=0.038$) e per la combinazione PAX4 e insulina ($p=0.027$). Infine, per quanto concerne il pancreas esocrino, i gatti diabetici presentavano un aumento del numero di cellule positive contemporaneamente per ARX e glucagone ($p=0.029$).

In conclusione, l'aumento delle cellule che esprimono PAX4 suggerisce che le cellule β presenti nel pancreas endocrino dei gatti diabetici siano in grado di rigenerarsi o di passare ad un precedente stadio di differenziazione. Inoltre, l'aumento del numero di cellule

positive sia per insulina che per glucagone può indicare una possibile riprogrammazione delle cellule α in β o viceversa. È stato dunque provato che nei gatti diabetici avviene una riprogrammazione delle cellule pancreatiche, soprattutto nel pancreas endocrino. Il motivo alla base della riduzione delle cellule positive per ARX e glucagone nei gatti diabetici non è chiaro.

ABSTRACT

Paired box-4 (PAX4) and aristaless-related homeobox (ARX) are two transcription factors involved in the development of endocrine pancreas in humans. PAX4 and ARX are responsible for the development of β -cells and α -cells respectively.

In adulthood PAX4 contributes to reprogramming of exocrine into endocrine cells and α -cells into β -cells; the induction of ARX in β -cells leads to reprogramming into α -cells.

Information is not available in diabetic cats.

The study aim was to verify if diabetic cats have increased number of pancreatic cells expressing developmental markers of α - and β -cells, suggesting reprogramming.

The research was based on pancreatic tissue samples from 18 cats, 9 were diabetic cats and 9 were well-matched control cats. The collected tissues were fixed in formalin, embedded in paraffin and sectioned. Tissue sections were labelled for insulin, glucagon, PAX4 and ARX. The number of positive-cells for each marker and double-positive for their combinations was counted in the pancreas and compared between groups.

Compared to controls, diabetic cats had less insulin-positive cells in the islet and exocrine pancreas ($p = 0.001$, $p = 0.038$); no differences were found in the number of glucagon-positive cells.

In the endocrine pancreas, diabetic cats had more insulin/glucagon-positive cells ($p = 0.024$), PAX4-positive cells ($p = 0.038$) and PAX4/insulin-positive cells ($p = 0.027$). In the exocrine pancreas, diabetic cats had less ARX/glucagon-positive cells ($p = 0.029$).

In conclusion, the increased number of islet cells expressing PAX4 in diabetic cats suggests that β -cells may change to an earlier stage of differentiation or new β -cells are formed. Moreover, the increased number of islet insulin/glucagon-positive cells may indicate that α -cells are transforming into β -cells or vice versa. Hence, reprogramming occurs in diabetic cats, specifically in the islets. The reason behind the lower count of cells concurrently expressing ARX and glucagon in the exocrine pancreas of diabetic cats is unclear.

1. INTRODUZIONE

1.1 SVILUPPO EMBRIONALE DEL PANCREAS

1.1.1 ASPETTI ANATOMICI DELLO SVILUPPO

Il pancreas origina dalla parete duodenale, in particolare da due abbozzi, uno ventrale e uno dorsale.

L'abbozzo dorsale è il primo e il più rapido a svilupparsi e si porta al mesentero dorsale; l'abbozzo ventrale, caudalmente alla cistifellea, cresce più lentamente assieme all'abbozzo epatico. Entrambe le gemme pancreatiche daranno origine ad un condotto che le manterrà in comunicazione con l'intestino. Crescendo, il meso porta i due abbozzi ad incontrarsi ed unirsi durante lo sviluppo; questo avvenimento porta successivamente alla formazione di un'unica ghiandola con due condotti pancreatici e diverse anastomosi tra i condotti minori.

Durante lo sviluppo, possono verificarsi delle anomalie con la formazione di pancreas accessori.

1.1.2 ASPETTI MOLECOLARI DELLO SVILUPPO

L'abbozzo dorsale si sviluppa a seguito della repressione specifica dei geni Shh (Sonic hedgehog) ed Ihh (Indian hedgehog), che favorisce l'espressione di FGF (Fibroblast Growth Factor) favorendo la crescita dell'abbozzo stesso.

L'abbozzo ventrale deriva da un meccanismo opposto, in grado di bloccare l'espressione di FGF. Il fattore di trascrizione PDX1 (Pancreatic and Duodenal Homeobox 1) risulta essere di fondamentale importanza per la formazione di tutte cellule pancreatiche; una sua assenza, si traduce nell'assenza del pancreas fin dalla nascita (Jonsson, et al. 1994; Offield, et al. 1996). PDX1 risulta importante anche in fasi successive, infatti è responsabile della differenziazione

delle cellule β e del mantenimento della loro identità. Le cellule multipotenti dell'abbozzo ventrale iniziano a compartimentarsi e a differenziarsi seguendo vie genetiche differenti. Le cellule esocrine derivano da cellule pro-acinari che si sviluppano grazie all'attivazione del gene NOTCH e di altri fattori di trascrizione. Le restanti cellule si differenziano in cellule bipotenti che daranno origine alle cellule duttali e alle cellule endocrine. Queste ultime derivano dall'espressione dell'NGN3 (neurogenina 3) durante una fase di trascrizione secondaria. NGN3 è indispensabile per lo sviluppo di tutte le cellule endocrine, ma a seconda di quando viene espresso può dare origine alle cellule α , β , PP o δ (Gu G, et al., 2002).

Le cellule endocrine iniziano ad esprimere ulteriori fattori di trascrizione che favoriscono la loro proliferazione e la differenziazione. Tra questi troviamo PAX6 (paired box 6), NeuroD1, FOXO1 (forkhead box O1), NKX2.2 (NK2 homeobox 2) ed NKX6.1 ed NKX6.2 (NK6 homeobox 1 e 2) che guidano le cellule progenitrici verso un lignaggio più specifico. Due fattori di trascrizione importanti nella differenziazione dei precursori in cellule α e cellule β sono rispettivamente ARX (Aristaless related homeobox) e PAX4 (Paired box 4).

PAX4 è implicato nello sviluppo delle cellule β e δ ; infatti, una sua assenza porta ad una differenziazione delle cellule progenitrici in cellule α e in cellule secernenti grelina. In seguito, si ha l'attivazione di altri fattori di trascrizione come MAFB, che porta alla produzione dell'insulina. I fattori PAX4, NKX6.1 E PDX1 sono responsabili dell'inibizione dell'espressione del glucagone da parte delle cellule β . Il fattore ARX risulta sostanziale per lo sviluppo delle cellule α , soprattutto nei primi stadi di differenziazione, ma non è direttamente coinvolto nell'espressione del glucagone (Gosmain, et al. 2011). PAX6 è un ulteriore fattore di trascrizione che risulta presente sia nelle cellule α che nelle β ; esso è coinvolto nella produzione di

insulina nelle cellule β e nella produzione del glucagone nelle cellule α . Inoltre, sembra essere coinvolto nella morfogenesi delle isole pancreatiche (St-Onge, et al., 1997).

1.2 ANATOMIA MACROSCOPICA

1.2.1 CONFORMAZIONE

Il pancreas è un organo ghiandolare che si trova in addome, più precisamente nella zona più dorsale della regione epigastrica, caudalmente al fegato, ma cranialmente ai reni. Il pancreas ha un aspetto lobulato, con i lobuli lassamente uniti dal tessuto connettivo. La forma è molto irregolare e variabile a seconda della specie. Nel gatto si presenta allungato trasversalmente e con la porzione destra più voluminosa.

Si possono riconoscere un corpo, un lobo destro ed un lobo sinistro. Il corpo è in rapporto con diversi organi addominali e con la parete lombare; i suoi margini presentano diverse impronte, qui passano strutture importanti come il tronco celiaco, l'arteria mesenterica craniale e la vena porta.

Il lobo destro è in stretto rapporto con l'intestino, in particolare con la parete del duodeno discendente. Da qui, nel gatto, dipartono i due condotti escretori: il dotto escretore principale o del Wirsung ed il dotto pancreatico accessorio o del Santorini, che raggiungono il duodeno sfociando rispettivamente nella papilla duodenale maggiore assieme al coledoco e nella papilla duodenale minore indipendentemente.

Infine, il lobo sinistro è la parte più compatta della ghiandola e raggiunge la milza.

1.2.2 RAPPORTI

Il pancreas prende rapporti con diversi organi, in particolare con il duodeno con cui ha uno stretto rapporto, con i reni e le ghiandole surrenali, con il fegato, con lo stomaco, con la milza e con diversi vasi sanguigni, tra cui la vena porta, le vene renali, le vene mesenteriche, la vena cava caudale, l'arteria mesenterica craniale e l'aorta.

1.2.3 MEZZI DI FISSITÀ

Il pancreas è ricco di mezzi di fissità e questo lo rende uno degli organi meno mobili. Tra questi troviamo i dotti escretori che lo collegano al duodeno, l'aderenza del lobo destro al duodeno discendente, il peritoneo che lo copre in parte e i vari visceri con cui prende contatto.

1.3 ANATOMIA MICROSCOPICA

Il pancreas è una ghiandola mista suddivisa in una parte esocrina e una parte endocrina che si uniscono a formare i diversi lobuli.

1.3.1 PANCREAS ESOCRINO

Il pancreas esocrino è una ghiandola acinosa composta di tipo sieroso, molto simile alle ghiandole salivari. Gli acini presenti si uniscono a formare i lobuli primari e successivamente i lobuli secondari; i vari lobuli sono delimitati da setti di tessuto connettivo contenenti al loro interno vasi e nervi. Gli acini sono di forma allungata e sono rivestiti da una membrana basale molto sottile. Essi presentano un unico strato di cellule secernenti e uno strato discontinuo di cellule centro-acinose che delimitano un lume molto limitato e solitamente pieno di secreto.

Le cellule acinose secernenti hanno una forma piramidale; la parte basale è ricca di ribosomi e mitocondri, la parte centrale presenta un apparato di Golgi ben sviluppato ed infine la parte apicale contiene granuli di zimogeno.

Le cellule centro-acinose sono appiattite e formano la prima parte del dotto escretore. Queste cellule sono in grado di secernere bicarbonato.

1.3.2 PANCREAS ENDOCRINO

Il pancreas endocrino è formato da gruppi di cellule diffusi tra gli acini del pancreas esocrino, questi ammassi vengono denominati isolotti pancreatici, isole pancreatiche o isole del Langerhans.

Avendo scarsa affinità tintoriale, le isole pancreatiche, nei preparati istologici, appaiono come aree più chiare, ovalari e ben delimitate.

Questi ammassi sono formati da cordoni cellulari solidi e anastomizzati tra loro e tra i quali si trova una rete capillare sinusoidale. Gli insulociti si presentano piccoli e poliedrici e presentano diverse caratteristiche.

Le cellule α o A sono molto voluminose, secernono glucagone e rappresentano il 25% circa di tutte le cellule del pancreas endocrino.

Le cellule β o B rappresentano il 75% delle cellule totali e sono responsabili della produzione di insulina.

Le cellule δ o D sono argentaffini e rassomigliano alle cellule enterocromaffini, producono somatostatina.

Le cellule F sembrano in grado di produrre il polipeptide pancreatico che regola la funzione e la secrezione esocrina del pancreas.

Si è visto che il rapporto dei diversi tipi di cellule e la loro collocazione nelle isole variano in base alla specie e all'età dell'animale.

1.3.3 CONDOTTI ESCRETORI

I condotti intercalari si dipartono dall'adenomero e si congiungono tra loro formando condotti con diametro sempre più grande fino a formare il condotto principale o canale di Wirsung e il condotto accessorio o canale di Santorini. Proseguendo verso i condotti pancreatici, i tessuti che compongono i condotti si modificano; la mucosa presenta cellule via via più alte e la tonaca esterna contiene sempre più fibre elastiche e cellule muscolari lisce.

1.3.4 VASI E NERVI

Il pancreas è irrorato da numerose arterie che dipartono dal tronco celiaco, in particolare dall'arteria mesenterica craniale, dall'arteria splenica, dall'arteria gastrica di sinistra e dall'arteria gastroduodenale. Queste arterie si diramano e anastomizzano per permettere un'adeguata vascolarizzazione dell'organo. Le vene sono satelliti delle arterie e sfociano nella vena porta.

Per quanto concerne il sistema linfatico, i vasi linfatici sono numerosi e afferiscono ai linfonodi pancreatico-duodenali, lienali, epatici e nel gatto anche a livello di linfonodi mesenterici craniali.

L'innervazione del pancreas è deputata al plesso celiaco e ai plessi secondari da esso derivanti; l'organo viene raggiunto anche dal plesso mesenterico craniale, dal plesso epatico e dal plesso lienale. Nei pressi delle isole pancreatiche esistono dei complessi neuro-insulari.

Il sistema simpatico ha un'azione vasomotrice e di depressione della secrezione; il sistema parasimpatico attiva la secrezione.

1.4 FISIOLOGIA

1.4.1 PANCREAS ESOCRINO

Le cellule acinose nel pancreas esocrino si occupano della secrezione del “succo pancreatico”. Questo secreto ha un pH alcalino e permette di neutralizzare l’acidità dei prodotti della digestione; inoltre, contiene enzimi fondamentali per la digestione.

1.4.2 PANCREAS ENDOCRINO

Le isole pancreatiche producono ormoni importanti per il metabolismo dei nutrienti. Le cellule α producono glucagone, le cellule β sono importanti per la secrezione di insulina, le cellule δ producono la somatostatina ed infine le cellule PP producono il polipeptide pancreatico. Gli ormoni prodotti vengono rilasciati a livello dei capillari presenti attorno alle isole del Langerhans e da qui poi raggiungono il fegato e altre cellule target.

L’insulina e il glucagone hanno un effetto di controllo sul metabolismo di carboidrati, amminoacidi e acidi grassi, ma sono tra loro antagonisti.

L’insulina viene rilasciata quando c’è un aumento delle concentrazioni di glucosio e di amminoacidi presenti nel sangue e ha un effetto ipoglicemizzante. Il glucagone risponde ad una condizione di ipoglicemia.

Quindi, insulina e glucagone lavorano assieme attraverso meccanismi opposti tra loro per raggiungere uno stato di euglicemia che nel gatto presenta valori tra i 70 e i 120 mg/dL.

In particolare, nel gatto il metabolismo del glucosio è meno efficiente e questo porta ad una ridotta tolleranza al glucosio e quindi ad una maggior probabilità di sviluppare il diabete mellito.

1.5 DIABETE MELLITO NEL GATTO

Il diabete mellito (DM) è una patologia abbastanza comune caratterizzata da uno stato di iperglicemia cronica causata da una ridotta produzione e/o attività dell'insulina prodotta dalle cellule β del pancreas.

1.5.1 EZIOLOGIA

Il DM è una patologia ad eziologia multifattoriale. Il DM di tipo 1 è molto raro nel gatto ed è causato da disordini auto-immuni. Molto più frequente, è un tipo di diabete molto simile al DM di tipo 2 umano. I fattori di rischio di quest'ultimo sono: l'età, l'obesità, il sesso maschile e una predisposizione genetica.

1.5.2 FISIOPATOLOGIA DEL DM DI TIPO 2

La ridotta sensibilità all'insulina, detta insulino-resistenza, è correlata a diversi fattori. Si è visto che l'obesità riduce del 30% la sensibilità all'insulina e che le cellule di gatti obesi presentano un minor numero di recettori leganti l'insulina e di recettori deputati alla captazione del glucosio (Zini E, 2009). Questo implica che a parità di insulina prodotta, i gatti obesi tendono a rispondere meno efficacemente. L'insulino-resistenza porta ad una condizione di iperglicemia e stimola le cellule β a secernere maggiori quantità di insulina e con l'avanzare dell'età questo porta ad un esaurimento delle cellule β . Inoltre, il glucosio in eccesso risulta essere tossico per le cellule pancreatiche, portando quindi ad un danneggiamento del parenchima che risulta essere reversibile solo in un primo momento (Rands J.S., 2000).

1.5.3 DIAGNOSI

La diagnosi viene effettuata tenendo conto di diversi fattori.

I segni clinici di un animale con DM di tipo 2 sono soprattutto: poliuria/polidipsia, dimagrimento e polifagia. A questi devono essere associati gli esami di laboratorio che dimostrano una persistente

iperglicemia (>180 mg/dl), glicosuria ed un aumento delle fruttosamine. È fondamentale in questi casi ricercare eventuali patologie concomitanti. Nel gatto si deve tenere presente l'iperglicemia da stress.

1.5.4 TRATTAMENTO E MONITORAGGIO

Il trattamento ha come obiettivi ridurre i segni clinici, riportare l'animale ad uno stato di euglicemia, evitando di raggiungere l'ipoglicemia, ed infine di raggiungere la remissione ove possibile. La somministrazione di insulina esogena risulta il trattamento più efficace per il controllo glicemico. Esistono diversi tipi di insulina in commercio e variano in base alla potenza e alla durata d'azione. Oltre all'insulina esogena, risulta fondamentale una gestione dietetica, proprio perché l'obesità è una delle principali cause di DM di tipo 2. Infine, questi animali devono essere sottoposti a continui monitoraggi dei segni clinici, della glicemia e delle fruttosamine per valutare l'andamento della patologia e l'efficacia della terapia in atto.

1.6 REPROGRAMMING

Diversi studi, incentrati sull'uomo e sul ratto affetti da diabete mellito, si sono concentrati sulle cellule pancreatiche e in particolare, sulla loro eventuale capacità di rimpiazzare le cellule β . (Habener, Stanojevic, 2012, Cinti et al., 2016; Kim et al., 2016). È stato dimostrato che cellule esocrine possono essere riprogrammate in cellule secernenti insulina (Corritore et al., 2016), ma assieme ad esse, anche altre cellule endocrine hanno la stessa capacità (Collombat et al., 2009; Habener and Stanojevic, 2012). Si è dimostrato che le cellule α adulte sono in grado di essere riprogrammate in cellule β funzionanti attraverso l'espressione del gene PAX4, così come le cellule esocrine.

In studi effettuati su uomini affetti da diabete mellito di tipo 2, si è visto che oltre ad una riprogrammazione da cellule α a cellule β , vi è anche

una riprogrammazione opposta. Infatti, le cellule β possono riprogrammarsi in cellule α attraverso l'espressione del gene ARX (Cinti et al., 2016). Si pensa che questo meccanismo possa essere presente anche nel gatto, ma non ci sono abbastanza studi.

2. OBIETTIVI

Lo scopo dello studio era dimostrare la presenza di una possibile riprogrammazione cellulare pancreatica in gatti con diabete mellito di tipo 2. Per dimostrare una possibile riprogrammazione cellulare si è valutata la presenza di ARX e PAX4, marcatori dello sviluppo e del differenziamento cellulare, all'interno delle cellule α e β e l'eventuale espressione concomitante di ARX e PAX4 con l'insulina e il glucagone.

3. MATERIALI E METODI

3.1 SOGGETTI

Sono stati selezionati 18 gatti morti spontaneamente o tramite eutanasia tra gennaio 2016 e giugno 2017. L'ispezione post-mortem è stata effettuata entro un'ora dalla morte e sono stati collezionati dei campioni di tessuto pancreatico di circa 1 cm dal lobo sinistro. Sono stati scelti per primi 9 gatti con diabete mellito diagnosticato; successivamente sono stati scelti casualmente altri 9 gatti con una distribuzione d'età, peso, razza e genere simili ai gatti diabetici. Questi ultimi non soffrivano di DM.

3.2 PREPARAZIONE DEL TESSUTO

I campioni di tessuto pancreatico sono stati fissati in formalina al 10% per 5 giorni e successivamente inclusi nella paraffina. I campioni sono stati tagliati in 10 sezioni da 3-4 μ m e successivamente montati sui vetrini da microscopio. Per quanto riguarda la colorazione ematossilina-eosina, è stato utilizzato un sistema automatico (Leica Autostainer XL, Leica Biosystems, Milano, Italia).

Successivamente, le sezioni sono state rimosse dalla paraffina e reidratate in soluzioni alcoliche decrescenti. Dopo essere state risciacquate con acqua distillata, le sezioni sono state sottoposte a una colorazione contenente il 25% di ematossilina Mayer e il 75% di ematossilina Carazzi per 7 minuti. Successivamente sono state sciacquate sotto acqua corrente per 5 minuti, colorate con eosina per 1 minuto ed infine, sono state deidratate in soluzioni crescenti di alcol e chiarificate con lo xilene.

Ulteriori sezioni sono state rimosse dalla paraffina e idratate con acqua distillata, successivamente sono state colorate con la soluzione rosso Congo per 30-60 minuti, sciacquate in acqua distillata, posta in una

soluzione alcalina e subito risciacquata sotto acqua corrente per 5 minuti. A questo punto è stata contro-colorata con ematossilina di Gill per 30 secondi e risciacquata sotto acqua corrente per 1 minuto. Infine, le sezioni sono state immerse in idrossido d'ammonio per 30 secondi, risciacquata sotto acqua corrente per 5 minuti, disidratata con una soluzione al 95% di alcol ed infine chiarificato con lo xilene.

3.3 IMMUNOISTOCHEMICA

Gli anticorpi primari utilizzati per l'immunoistochimica sono stati i seguenti: anticorpo policlonale di coniglio anti-insulina (#4590, Cell Signaling Technology, Danvers, MA, USA), anticorpo policlonale di coniglio anti-glucagone (#2760, Cell Signaling Technology), anticorpo policlonale di coniglio anti-PAX4 (PA5-13649, Thermo Fisher Scientific Invitrogen, Waltham, MA, USA) ed infine l'anticorpo monoclonale di topo anti-ARX (11F6.2, Merck).

Sono state studiate le seguenti combinazioni: insulina e glucagone, insulina e PAX4, insulina ed ARX, glucagone e ARX, glucagone e PAX4 ed infine PAX4 ed ARX.

Per poter amplificare il segnale degli anticorpi primari, sono stati utilizzati degli anticorpi biotinilati; in particolare l'anticorpo di capra anti-IgG di coniglio (BA-1000, Vector Laboratories, Burlingame, CA, USA) e l'anticorpo di capra anti-IgG di ratto (BA-9200, Vector Laboratories). Per il legame, è stato utilizzato il sistema perossidasi avidina/biotina (PK-6100, Vectastain Elite ABC HRP Kit, Vector Laboratories). Inoltre, i vetrini sono stati incubati con una soluzione di tirammide biotinilata per raggiungere una maggior amplificazione del segnale. Successivamente, per gli anticorpi primari che mostravano un'amplificazione del segnale si utilizzava l'anticorpo secondario Alexa Fluor 647 coniugato con la streptavidina (#016-600-084, Jackson ImmunoResearch Laboratories Inc. West Grove, PA, USA), mentre per gli anticorpi che non mostravano l'amplificazione del segnale è stato usato l'anticorpo Alexa Fluor 555 di asino anti-coniglio (A-31572,

Thermo Fisher Scientific Invitrogen). Come agenti bloccanti sono stati utilizzati il siero di capra e il siero di asino sia con gli anticorpi primari e secondari che durante l'amplificazione di segnale. La soluzione bloccante è stata ottenuta dalla diluizione di 100 µl di siero in 10 ml di PBTx allo 0,3% e per ogni vetrino sono stati applicati 500 µl. Infine, è stata applicata una colorazione di contrasto DAPI (art. n. 6335.1, Carl Roth, Karlsruhe, Germania), incubando i vetrini per 4 minuti con una soluzione 1:1000 in PBS.

La tecnica di recupero dell'antigene è mediata dal calore. I vetrini sono stati incubati con un tampone in contenitori con la colorazione Coplin per 20 minuti a 95°C. Come tampone, si è scelto il tampone Tris-EDTA pH 9,0 (10mM Tris base, 1mM EDTA, 0,05% Tween 20) per le reazioni contenenti antigeni anti-ARX; mentre, per tutte le altre reazioni è stato usato il tampone di citrato di sodio, pH 6,0 (10mM di citrato di sodio, 0,05% Tween 20).

Gli anticorpi per ARX e PAX4 non sono mai stati utilizzati prima nel gatto, per questo motivo sono state effettuate delle prove di specificità utilizzando dei tessuti pancreatici sani di coniglio e topo come controllo. Il microscopio utilizzato per tutte le prove è il microscopio Zeiss Axio Imager e sono stati utilizzati filtri diversi in base alla colorazione. Per l'anticorpo secondario Alexa Fluor 555 è stato usato il set Zeiss 50 con eccitazione BP 640/30, beam splitter FT 660 ed emissione BP 690/50, per l'Alexa Fluor 647 il set Zeiss 43 con eccitazione BP 545/25, beam splitter FT 570 ed emissione BP 605/70, infine, per il contro-colorante DAPI il set Zeiss 49 con eccitazione G 365, beam splitter FT 395 ed emissione BP 445/50.

Per ogni vetrino sono state scattate 10 immagini diverse da campi contenenti un'isola pancreatica e 10 immagini prive di isole pancreatiche spostando casualmente il microscopio sul vetrino, utilizzando un ingrandimento 400× e i tre filtri precedentemente descritti. Sono state escluse sia le immagini di isole con un numero di cellule endocrine

inferiore a 5, che le immagini contenenti grossi vasi sanguigni, dotti o eccessivo tessuto interlobulare.

3.4 MORFOLOGIA DELLE ISOLE PANCREATICHE E CONTA CELLULARE

Le sezioni colorate con ematossilina ed eosina sono state valutate per identificare eventuali lesioni pancreatiche, quelle rosso Congo per valutare la presenza di amiloidosi.

Il software ImageJ (<http://rsb.info.nih.gov/ij>) è stato utilizzato per quantificare le cellule positive con l'immunoistochimica. Il software presenta anche un plugin per la conta manuale delle cellule che è stato utilizzato come metodo di conta delle cellule risultanti positive. Per ogni immagine, sono state contate le cellule positive per l'insulina, il glucagone, PAX4, ARX e le combinazioni viste precedentemente e sono state calcolate le medie.

3.5 ANALISI STATISTICA

Le analisi statistiche sono state effettuate con il software commerciale SPSS 24.0. L'età, il sesso, la razza e il peso corporeo dei gatti diabetici e dei controlli sono stati confrontati tra loro attraverso il test di Fisher e il test di Mann-Whitney U.

Il test Mann-Whitney U è stato utilizzato anche per valutare le differenze, tra i due gruppi, nel numero di cellule marcate singolarmente per insulina, glucagone, PAX4 e ARX e delle loro combinazioni sia nel pancreas esocrino che nel pancreas endocrino.

Inoltre, è stato valutato anche il rapporto tra cellule risultate positive sia all'insulina che a PAX4 e le cellule risultate positive solo all'insulina all'interno dello stesso gruppo.

La significatività dei risultati è stata considerata in caso di $p < 0,05$ e i risultati relativi all'immunoistochimica sono stati riportati come mediana e range di riferimento.

4. RISULTATI E DISCUSSIONE

4.1 SOGGETTI

Il gruppo di gatti diabetici era formato da 2 femmine sterilizzate e 7 maschi castrati, di cui 7 erano gatti domestici a pelo corto e 2 erano di razza, un Siamese ed un Maine Coon. L'età mediana dei soggetti era di 11 anni, con range tra 7 e 16 anni, mentre il peso mediano era 4.5 kg, range 3.3-5.8 kg. In questi gatti sono state riscontrate ulteriori patologie concomitanti al diabete mellito; in particolare acromegalia, chetoacidosi, insufficienza renale, iperadrenocorticismo, pancreatite, colangite e meningioma.

Per quanto concerne i gatti di controllo, erano presenti 4 femmine, di cui 3 castrate, e 5 maschi castrati; tutti e 9 erano gatti domestici a pelo corto. L'età mediana dei soggetti era di 11.8 anni, range 8-17 anni; il peso mediano dei soggetti era 4.1 kg, range 2.2-6.1 kg. Le patologie riscontrate all'esame autoptico erano: chilotorace idiopatico, carcinoma epatico, carcinoma polmonare, strongilosi polmonare, miosite idiopatica, carcinoma nasale, cardiomiopatia destra e crisi da sospetta intossicazione.

Le patologie riscontrate nel gruppo di controllo non hanno alterato i risultati dei test effettuati, poiché non incidevano sulla funzionalità pancreatica.

Le due popolazioni scelte erano tra loro simili; ciò è risultato importante per il confronto dei risultati tra gatti diabetici e controlli.

4.2 MORFOLOGIA DELLE ISOLE PANCREATICHE

In 3 gatti diabetici è stata riscontrata la presenza di cellule pancreatiche dal citoplasma chiaro, compatibile con la degenerazione idropica. Questo riscontro è abbastanza comune nei gatti affetti da diabete mellito e sembra collegato ad un danno cellulare dato dalla persistente iperglicemia.

In 3 gatti diabetici e 2 gatti di controllo si sono trovati segni di amiloidosi delle isole pancreatiche. Il rapporto tra l'amiloidosi e il diabete mellito non è ancora del tutto chiaro. Ci sono diversi studi al riguardo, sembrerebbe essere collegato all'età del soggetto ed avere un ruolo nella progressione della patologia più che nella patogenesi primaria.

I nuclei cellulari risultavano essere simili sia nei gatti diabetici che nel gruppo di controllo all'interno delle isole del Langerhans.

In 2 gatti diabetici e in 2 gatti di controllo è stata riscontrata un'iperplasia nodulare pancreatica delle cellule acinose nel tessuto pancreatico esocrino. Questa lesione si riscontra accidentalmente e la causa sembra non essere del tutto nota, anche se potrebbe essere una risposta ad eventuali insulti.

4.3 CONTA CELLULARE

I gatti diabetici mostravano un minor numero di cellule positive per l'insulina comparati ai controlli sia nel pancreas endocrino (mediana: 14.8, range: 2.4-51, vs mediana: 64, range: 33.4-71.4, $p = 0.001$), che nel pancreas esocrino (mediana: 5, range: 1.8-14.6, vs mediana: 10, range 4.4-19, $p = 0.038$). Questi riscontri sono correlati alla patogenesi del DM, l'iperglicemia persistente porta ad un iniziale aumento della richiesta e ad un successivo esaurimento delle cellule β , già danneggiate dall'eccessiva presenza di glucosio. Per quanto riguarda le cellule positive al glucagone, non c'erano differenze tra i due gruppi. Recenti studi condotti in pazienti umani affetti da DM di tipo 2 hanno evidenziato la presenza di iperplasia delle cellule α , le quali risultano essere importanti per la protezione e la proliferazione delle cellule β . Questo tipo di dato non si è riscontrato in questo studio.

All'interno delle isole del Langerhans, i gatti diabetici avevano un maggior numero di cellule positive sia per l'insulina che per il glucagone (mediana: 0.2, range: 0-11, vs mediana: 0, range: 0-0.4, $p = 0.024$).

Questo risultato è molto interessante, una cellula secernente entrambi gli

ormoni potrebbe essere frutto di una riprogrammazione a seguito dell'espressione di geni coinvolti nello sviluppo dei diversi lignaggi. Negli uomini con DM è stato dimostrato che le cellule insulari mature tendono a riprogrammarsi da α a β e viceversa e sembra essere vero anche per i gatti affetti dalla stessa patologia.

Per quanto concerne le cellule positive per PAX4, queste si riscontravano in numero maggiore nelle isole pancreatiche dei gatti diabetici (mediana: 9.6, range: 0-29.6, vs mediana: 2.2, range: 0.2-6.4, $p = 0.038$). La presenza del marker di sviluppo PAX4 a livello cellulare è correlata alla presenza di cellule β immature e quindi alla presenza di una possibile riprogrammazione delle cellule pancreatiche o alla formazione di nuove cellule β a partire da cellule progenitrici presenti nel tessuto. Questa teoria è supportata anche dalla presenza di un maggior numero di cellule positive sia per PAX4 che per l'insulina nei gatti diabetici rispetto ai controlli (mediana: 4.4, range: 0-12, vs mediana: 0.2, range 0-1, $p = 0.027$). È stato successivamente calcolato il rapporto tra cellule positive sia per insulina che per PAX4 e cellule positive solo per l'insulina, che si è visto essere maggiore nei gatti diabetici in confronto ai controlli (mediana: 0.2, range: 0-4.2, vs mediana: 0, range 0-0, $p = 0.015$).

Per quanto riguarda le cellule positive per ARX, non c'erano differenze tra i due gruppi né a livello di pancreas endocrino né a livello di pancreas esocrino, ma si è vista una riduzione del numero di cellule che esprimevano ARX e glucagone nel pancreas esocrino dei gatti diabetici (mediana: 0, range 0-0 vs mediana: 0, range: 0-0.8, $p = 0.029$).

Riprendendo anche il risultato precedente relativo al glucagone, i gatti diabetici non differiscono dai controlli per quanto concerne il numero di cellule esprimenti glucagone o di cellule positive per ARX, ma hanno un minor numero di cellule positive per ARX e glucagone contemporaneamente. Le cellule che esprimono ARX e glucagone sono solitamente cellule α ancora immature e visti i risultati precedenti, ci si aspetterebbe un numero simile di cellule doppiamente positive ARX-

glucagone tra gatti diabetici e controlli. La ragione di questi risultati non è del tutto chiara e andrebbe ricercata con ulteriori studi.

Infine, non sono state trovate differenze nel numero di cellule positive per PAX4 e glucagone, ARX ed insulina ed infine ARX e PAX4.

Basandosi su studi umani, è stato visto come delle cellule secernenti insulina, ma che allo stesso tempo erano in grado di esprimere markers come ARX, potevano rappresentare cellule β che si stavano riprogrammando in cellule α . Il fatto che ci siano cellule positive per insulina e glucagone, ma non per le combinazioni sopracitate, può far pensare che nel gatto vi siano altri markers coinvolti nella riprogrammazione delle cellule pancreatiche e che non vi siano cellule con doppio lignaggio ARX e PAX4.

5. CONCLUSIONE

In conclusione, i risultati hanno dimostrato un aumento delle cellule che esprimono il fattore di trascrizione PAX4 e delle cellule positive per PAX4 ed insulina nel pancreas endocrino dei gatti diabetici rispetto ai controlli. Questo implica la presenza di un maggior numero di cellule β immature che possono derivare da un evento rigenerativo o eventualmente da un passaggio delle cellule β mature ad un precedente stadio di differenziazione.

Un altro risultato importante è l'aumento del numero di cellule positive sia per insulina che glucagone; infatti, può rappresentare una possibile riprogrammazione delle cellule α in cellule β o viceversa.

Questi risultati sono indicativi di una riprogrammazione delle cellule pancreatiche, in particolare nel pancreas endocrino, in gatti affetti da diabete mellito.

Esiti analoghi sono stati ottenuti in diversi studi condotti negli ultimi anni su topi e umani, in cui si è dimostrata la presenza di riprogrammazione cellulare e la formazione di due possibili linee cellulari. Infatti, si può avere una riprogrammazione diretta con la produzione di cellule che sono positive sia per insulina e glucagone (Yang et al., 2011), oppure cellule simili ai precursori durante lo sviluppo, quindi cellule esprimenti PAX4 da solo o PAX4 ed insulina (Wang et al., 2014). Se questi fenotipi originino da diversi meccanismi o se sono solo diversi stadi dello stesso meccanismo è ancora da valutare (van der Meulen T., Huisin M.O., 2015).

La scoperta della riprogrammazione cellulare pancreatica ha spinto molti ricercatori a studiare nuove terapie geniche per la cura del diabete mellito.

La carenza di organi disponibili per il trapianto e le possibili complicazioni hanno portato allo sviluppo di nuove strategie basate sull'utilizzo di cellule staminali che possono essere riprogrammate in cellule β (Pan et al., 2019).

Questi studi sono ancora in fase iniziale e non ci sono ancora abbastanza dati sull'effettiva efficacia e sicurezza legate all'impianto di queste cellule.

In questo studio, si è notata una riduzione del numero di cellule positive per ARX e glucagone nei gatti diabetici rispetto ai controlli. Questo risultato non è chiaro, infatti servirebbero ulteriori studi.

Nel gatto non ci sono studi per quanto concerne l'utilizzo della riprogrammazione come nuova possibile terapia. Servirebbero ulteriori studi non solo per comprendere meglio la riprogrammazione pancreatica nel gatto e valutare la possibile somiglianza con l'uomo, ma anche per sviluppare nuove terapie che permetterebbero un miglior controllo della patologia se non addirittura la cura.

6. BIBLIOGRAFIA

1. Aguayo-Mazzucato, C., e Bonner-Weir, S. (2018). Pancreatic β Cell Regeneration as a Possible Therapy for Diabetes. In *Cell Metabolism* (Vol. 27, Issue 1, pp. 57–67). Cell Press.
2. Appleton, D. J., Rand, J. S., e Sunvold, G. D. (2001). Insulin sensitivity decreases with obesity, and lean cats with low insulin sensitivity are at greatest risk of glucose intolerance with weight gain. *Journal of Feline Medicine and Surgery*, 3(4), 211–228.
3. Barone R. 2003. CAP VII – Ghiandole Annesse all’Intestino. ed. R. Bortolami, 472-479. In: *Anatomia Comparata dei Mammiferi Domestici, volume 3° Splancnologia, Apparecchio Digerente e Respiratorio*. Milano: Edagricole New Business Media
4. Bonnavion, R., Jaafar, R., Kerr-Conte, J., Assade, F., van Stralen, E., Leteurtre, E., Pouponnot, C., Gargani, S., Pattou, F., Bertolino, P., Cordier-Bussat, M., Lu, J., e Zhang, C. X. (2013). Both PAX4 and MAFA Are Expressed in a Substantial Proportion of Normal Human Pancreatic Alpha Cells and Dereglated in Patients with Type 2 Diabetes. *PLoS ONE*, 8(8).
5. Brun, T., Franklin, I., St-Onge, L., Biason-Lauber, A., Schoenle, E. J., Wollheim, C. B., e Gauthier, B. R. (2004). The diabetes-linked transcription factor PAX4 promotes β -cell proliferation and survival in rat and human islets. *Journal of Cell Biology*, 167(6), 1123–1135.
6. Brun, T., e Gauthier, B. R. (2008). A focus on the role of Pax4 in mature pancreatic islet β -cell expansion and survival in health and disease. In *Journal of Molecular Endocrinology* (Vol. 40, Issues 1–2, pp. 37–45).
7. Chakravarthy, H., Gu, X., Enge, M., Dai, X., Wang, Y., Damond, N., Downie, C., Liu, K., Wang, J., Xing, Y., Chera, S., Thorel, F., Quake, S., Oberholzer, J., MacDonald, P. E., Herrera, P. L., e Kim, S. K. (2017). Converting Adult

Pancreatic Islet α Cells into β Cells by Targeting Both Dnmt1 and Arx. *Cell Metabolism*, 25(3), 622–634.

8. Chera, S., Baronnier, D., Ghila, L., Cigliola, V., Jensen, J. N., Gu, G., Furuyama, K., Thorel, F., Gribble, F. M., Reimann, F., e Herrera, P. L. (2014). Diabetes recovery by age-dependent conversion of pancreatic δ -cells into insulin producers. *Nature*, 514(7253), 503–507.
9. Cinti, F., Bouchi, R., Kim-Muller, J. Y., Ohmura, Y., Sandoval, P. R., Masini, M., Marselli, L., Suleiman, M., Ratner, L. E., Marchetti, P., e Accili, D. (2016). Evidence of β -cell dedifferentiation in human type 2 diabetes. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, 101(3), 1044–1054.
10. Collombat, P., Mansouri, A., Hecksher-Sørensen, J., Serup, P., Krull, J., Gradwohl, G., e Gruss, P. (2003). Opposing actions of Arx and Pax4 in endocrine pancreas development. *Genes and Development*, 17(20), 2591–2603.
11. Collombat, P., Xu, X., Ravassard, P., Sosa-Pineda, B., Dussaud, S., Billestrup, N., Madsen, O. D., Serup, P., Heimberg, H., e Mansouri, A. (2009). The Ectopic Expression of Pax4 in the Mouse Pancreas Converts Progenitor Cells into α and Subsequently β Cells. *Cell*, 138(3), 449–462.
12. Corritore, E., Lee, Y. S., Sokal, E. M., e Lysy, P. A. (2016). β -cell replacement sources for type 1 diabetes: a focus on pancreatic ductal cells. In *Therapeutic Advances in Endocrinology and Metabolism* (Vol. 7, Issue 4, pp. 182–199). SAGE Publications Ltd.
13. Ettinger S. J., Feldman E. C. e Coté E., 2019. Capitolo 305 – Diabete mellito nel gatto, ed J. Rand e S. A. Gottlieb, 1781-1795. In: *Trattato di CLINICA MEDICA VETERINARIA Malattie del cane e del gatto (8^a ed.), Volume 2^o*. Roma: Antonio Delfino Editore medicina-scienze
14. Gosmain Y., Cheyssac C., Heddad Masson M., Dibner C., e Philippe J., (2011). Glucagon gene expression in the endocrine pancreas: the role of the

transcription factor PAX6 in alpha-cell differentiation, glucagon biosynthesis and secretion. *Diabetes Obes Metab.* 13(1), 31-38.

15. Gu G., Dubauskaite J., e Melton DA. (2002). Direct evidence for the pancreatic lineage: NGN3+ cells are islet progenitors and are distinct from duct progenitors. *Development*, 129, 2447-2457.
16. Habener, J. F., e Stanojevic, V. (2012). α -cell role in β -cell generation and regeneration. In *Islets* (Vol. 4, Issue 3, pp. 188–198).
17. Harvey A. e Tasker S., 2013. Diabete Mellito, ed. S. Bo, 392-396. In: *BSAVA Manuale di Medicina Felina. Trattamento dei disordini endocrini*. Milano: Edra – S.p.A.
18. Jonsson J., Carlsson L., Edlund T., e Edlund H. (1994). Insulin-promoter-factor 1 is required for pancreas development in mice. *Nature*, 371(6498), 606-9.
19. Kim, H. S., e Lee, M. K. (2016). β -Cell regeneration through the transdifferentiation of pancreatic cells: Pancreatic progenitor cells in the pancreas. *Journal of Diabetes Investigation*, 7(3), 286–296.
20. Lima, M. J., Muir, K. R., Docherty, H. M., McGowan, N. W. A., Forbes, S., Heremans, Y., Heimberg, H., Casey, J., e Docherty, K. (2016). Generation of functional beta-like cells from human exocrine pancreas. *PLoS ONE*, 11(5).
21. Lorenzo, P. I., Fuente-Martín, E., Brun, T., Cobo-Vuilleumier, N., Jimenez-Moreno, C. M., G. Herrera Gomez, I., López Noriega, L., Mellado-Gil, J. M., Martin-Montalvo, A., Soria, B., e Gauthier, B. R. (2015). PAX4 defines an expandable β -cell subpopulation in the adult pancreatic islet. *Scientific Reports*, 5.
22. Lorenzo, P. I., Juárez-Vicente, F., Cobo-Vuilleumier, N., García-Domínguez, M., e Gauthier, B. R. (2017). The diabetes-linked transcription factor PAX4: From gene to functional consequences. In *Genes* (Vol. 8, Issue 3). MDPI AG.

23. Mezza, T., Cinti, F., Cefalo, C. M. A., Pontecorvi, A., Kulkarni, R. N., e Giaccari, A. (2019). B-cell fate in human insulin resistance and type 2 diabetes: A perspective on islet plasticity. In *Diabetes* (Vol. 68, Issue 6, pp. 1121–1129). American Diabetes Association Inc.
24. Napolitano, T., Avolio, F., Courtney, M., Vieira, A., Druelle, N., Ben-Othman, N., Hadzic, B., Navarro, S., e Collombat, P. (2015). Pax4 acts as a key player in pancreas development and plasticity. In *Seminars in Cell and Developmental Biology* (Vol. 44, pp. 107–114). Academic Press.
25. Nishizawa, M., Nakabayashi, H., Uehara, K., Nakagawa, A., Uchida, K., e Koya, D. (2013). Intraportal GLP-1 stimulates insulin secretion predominantly through the hepatoportal-pancreatic vagal reflex pathways. *J Physiol Endocrinol Metab*, 305, 376–387.
26. O'Brien, T. D. (n.d.). *Pathogenesis of feline diabetes mellitus*.
27. O'Brien, T. D., Hayden, D. W., Johnson, K. H., e Fletcher, T. F. (1986). Immunohistochemical morphometry of pancreatic endocrine cells in diabetic, normoglycaemic glucose-intolerant and normal cats. *Journal of Comparative Pathology*, 96(4), 357–369.
28. Offield M. F., Jetton T. L., Labosky P. A., Ray M., Stein R. W., Magnuson M. A., Hogan B. L. M. e Wright C. V. E. (1996). PDX-1 is required for pancreatic outgrowth and differentiation of the rostral duodenum. *The Company of Biologists*, 122(3), 983-955.
29. Pan, G., Mu, Y., Hou, L., e Liu, J. (2019). Examining the therapeutic potential of various stem cell sources for differentiation into insulin-producing cells to treat diabetes. *Annales d'Endocrinologie*, 80(1), 47–53.
30. Pelagalli G.V., Castaldo L., Lucini C., Patruno M.V., e Scocco 2008. Aspetti Molecolari dello Sviluppo, 39-63. In: *Embriologia, Morfogenesi e Anomalie dello Sviluppo*. III edizione. Perugia: Idelson-Gnocchi s.r.l.

31. Pelagalli G.V., Castaldo L., Lucini C., Patruno M.V., e Scocco, 2008. Sviluppo dell'apparato digerente, 329-348. In: Embriologia, Morfogenesi e Anomalie dello Sviluppo. III edizione. Perugia: Idelson-Gnocchi s.r.l.
32. Rand, J. S. (2000). *LA PATOGENESI DEL DIABETE FELINO** (Vol. 14, Issue 1). Orange Frazer Press.
33. St-Onge L., Sosa-Pineda B., Chowdhury K, Mansouri A, e Gruss P. (1997). PAX6 is required for differentiation of glucagon producing alpha-cells in mouse pancreas. *Nature*, 387, 406-409.
34. Talchai, C., Xuan, S., Lin, H. v., Sussel, L., e Accili, D. (2012). Pancreatic β cell dedifferentiation as a mechanism of diabetic β cell failure. *Cell*, 150(6), 1223–1234.
35. van der Meulen, T., e Huising, M. O. (2015). Role of transcription factors in the transdifferentiation of pancreatic islet cells. In *Journal of Molecular Endocrinology* (Vol. 54, Issue 2, pp. R103–R117). BioScientifica Ltd.
36. Wang, Z., York, N. W., Nichols, C. G., e Remedi, M. S. (2014). Pancreatic β cell dedifferentiation in diabetes and redifferentiation following insulin therapy. *Cell Metabolism*, 19(5), 872–882.
37. White, M. G., Marshall, H. L., Rigby, R., Huang, G. C., Amer, A., Booth, T., White, S., e Shaw, J. A. M. (2013). Expression of mesenchymal and α -cell phenotypic markers in Islet β -cells in recently diagnosed diabetes. *Diabetes Care*, 36(11), 3818–3820.
38. Yang, Y. P., Thorel, F., Boyer, D. F., Herrera, P. L., e Wright, C. V. E. (2011). Context-specific α -to- β -cell reprogramming by forced Pdx1 expression. *Genes and Development*, 25(16), 1680–1685.
39. Zhang, Y., Fava, G. E., Wang, H., Mauvais-Jarvis, F., Fonseca, V. A., e Wu, H. (2016). PAX4 gene transfer induces α -to- β cell phenotypic conversion and confers therapeutic benefits for diabetes treatment. *Molecular Therapy*, 24(2), 251–260.

40. Zhou, Q., e Melton, D. A. (2018). Pancreas regeneration. In *Nature* (Vol. 557, Issue 7705, pp. 351–358). Nature Publishing Group.
41. Zini, E. (2009). PARTE I: AGGIORNAMENTI SULLA PATOGENESI DEL DIABETE MELLITO NEL GATTO CON RIFERIMENTI CLINICI PRATICI DEFINIZIONI. In *Veterinaria* (Vol. 23, Issue 2).
42. Zini, E., Ferro, S., Lunardi, F., Zanetti, R., Heller, R. S., Coppola, L. M., Guscetti, F., Osto, M., Lutz, T. A., Cavicchioli, L., e Reusch, C. E. (2016). Exocrine Pancreas in Cats With Diabetes Mellitus. *Veterinary Pathology*, 53(1), 145–152.
43. Zini, E., Lunardi, F., Zanetti, R., Heller, R. S., Coppola, L. M., Ferro, S., Guscetti, F., Osto, M., Lutz, T. A., Reusch, C. E., e Cavicchioli, L. (2016). Endocrine Pancreas in Cats With Diabetes Mellitus. *Veterinary Pathology*, 53(1), 136–144.