



UNIVERSITÀ
DEGLI STUDI
DI PADOVA

Sede Amministrativa: Università degli Studi di Padova

Dipartimento di Medicina Molecolare

CORSO DI DOTTORATO DI RICERCA IN: MEDICINA MOLECOLARE

CURRICOLO: MEDICINA RIGENERATIVA

CICLO: XXX

**ANGIOGENESI E POPOLAZIONI MIELOIDI CD33
POSITIVE NELLE COMPLICANZE AGLI ARTI
INFERIORI NEL DIABETE DI TIPO 2**

Tesi redatta con il contributo finanziario di **AIL**- Associazione Italiana
contro le leucemie-linfomi e mieloma ONLUS, Sezione di Treviso.

Coordinatore: Ch.mo Prof. Stefano Piccolo

Supervisore: Ch.mo Prof. Maria Teresa Conconi

Co-Supervisore: Dott.ssa Maria Sambataro

Dottorando: ENRICA TREVISIOL

INDICE

RIASSUNTO	I
OVERVIEW	1
a. Il diabete mellito	1
b. Il piede diabetico	2
c. Il processo angiogenico e la riparazione vascolare nel diabete	3
CAPITOLO 1	9
1.1. INTRODUZIONE	9
1.1.1. La proteina S100B	9
1.1.2. La funzione di S100B: ruolo intracellulare	10
1.1.3. Il ruolo extracellulare e il recettore RAGE	13
1.1.4. S100B e diabete	16
1.2. SCOPO DELLA TESI	19
1.3. MATERIALI E METODI	21
1.3.1. Colture cellulari	21
1.3.2. Silenziamento genico e blocco della cascata di segnale	21
1.3.3. Western Blot	23
1.3.4. Saggio di proliferazione cellulare	25
1.3.5. Saggio di migrazione cellulare	26
1.3.6. Morfogenesi <i>in vitro</i>	27
1.3.7. Saggio <i>in vivo</i> con Plug di Matrigel	28
1.3.8. Analisi statistica	30

1.4. RISULTATI E DISCUSSIONE	31
CAPITOLO 2	39
2.1. INTRODUZIONE	39
2.1.1. Popolazioni mieloidi e attività vascolare	39
2.1.2. Il marcatore CD33	41
2.1.3. CD33 come marcatore di patologia	44
2.1.3. CD33 e diabete	45
2.2. SCOPO DELLA TESI	47
2.3. MATERIALI E METODI	49
2.3.1. Selezione dei pazienti	49
2.3.2. Valutazione dei parametri clinici	49
2.3.3. Colture cellulari	50
2.3.4. Determinazione plasmatica di Interleuchina-10	51
2.3.5. Analisi citofluorimetrica	51
2.3.6. Analisi statistica	52
2.4. RISULTATI E DISCUSSIONE	53
CONCLUSIONI	71
BIBLIOGRAFIA	73

RIASSUNTO

Il diabete di tipo 2 rientra tra le patologie di maggior impatto sanitario nel mondo occidentale, con costi elevati sia in termini di spesa sanitaria sia in termini di benessere e sopravvivenza del paziente. La malattia infatti è caratterizzata da complicanze a carico di diversi distretti, in particolar modo neurologico e vascolare.^{1,2} La compromissione a livello dei vasi può causare deficit in organi importanti quali il rene e l'occhio ed essere parte integrante dei meccanismi che causano il fenomeno del piede diabetico, insieme a neuropatia ed infezione.

Tra i processi che controllano la rigenerazione vascolare e che sono disregolati nel diabete rientra l'angiogenesi. La formazione di nuovi vasi infatti è accentuata sulla retina mentre si riduce drasticamente a livello degli arti inferiori, con una marcata deplezione di precursori endoteliali in pazienti con lesioni ai piedi.³

S100B è una proteina a basso peso molecolare espressa in cellule di diversa origine, sia neuronale che muscolare che vascolare. La sua azione dipende dalla concentrazione di proteina e dal legame con il recettore RAGE, esercitando effetti sia di tipo intracellulare che extracellulare.⁴ È stato evidenziato un possibile ruolo di S100B nel regolare alcuni processi chiave nell'angiogenesi, ad esempio proliferazione e migrazione cellulare, ma il ruolo esatto, la concentrazione di utilizzo e i pathway coinvolti ancora non sono stati pienamente dimostrati. La prima parte di questa tesi si propone pertanto di mettere in luce il ruolo della proteina in diverse tappe del processo angiogenico quali proliferazione, migrazione e capacità di formare strutture capillaro-simili *in vitro* su cellule endoteliali da vena di cordone ombelicale e *in vivo*, verificando la necessità del legame S100B-RAGE e valutando il coinvolgimento del pathway mediato dalla chinasi ERK1/2.

Una componente importante della complicanza agli arti inferiori è la presenza di un corretto funzionamento del sistema immunitario, per prevenire e debellare le eventuali infezioni in corso.

La popolazione cellulare mieloide è attivamente coinvolta a livello

sanguigno nel promuovere meccanismi di difesa di tipo infiammatorio, in particolar modo con l'ausilio di monociti circolanti e la loro interazione con le cellule endoteliali vascolari.⁵ La popolazione dendritica invece si rivela indispensabile nei processi di presentazione dell'antigene batterico o virale ai linfociti, inducendo una successiva risposta cellulo-mediata.

Un marcatore di origine midollare presente sulla superficie delle cellule di linea mieloide è CD33, molecola utilizzata come marcatore di immaturità ma dal ruolo non ancora chiaro. La proteina infatti contiene dei motivi detti ITIM, con funzione inibitoria, ed è stato riportato come possa controllare la risposta infiammatoria prevenendo il signaling dato dalle citochine e l'attivazione dei monociti, ma non sono ancora disponibili sufficienti evidenze per quanto riguarda il link con la patologia diabetica. La seconda parte di tesi si propone pertanto di evidenziare la presenza di CD33 su sangue periferico di pazienti con diabete di tipo 2 non complicato o con complicanze per capire se può essere considerato un marcatore di interesse nella progressione della lesione. La ricerca si propone inoltre di valutare il comportamento di CD33 su diverse classi di popolazioni cellulari mieloidi isolate da controlli sani o da pazienti diabetici con lesioni agli arti inferiori, in particolar modo monociti classici e non classici e cellule dendritiche, mimando *in vitro* l'ambiente iperglicemico protratto nel diabete.

OVERVIEW

a. Il diabete mellito

Il diabete mellito è una patologia cronica debilitante che coinvolge circa 400 milioni di individui in tutto il mondo, in particolar modo nei paesi europei e negli USA. In Italia, la prevalenza della patologia è di circa il 6,2%, dato raddoppiato rispetto gli anni '80. Il numero dei casi noti è aumentato del 70% negli ultimi 20 anni, con un numero di diabetici attorno ai 4 milioni e 250000 nuovi casi ogni anno.

La malattia può essere divisa in due diverse categorie: diabete mellito di tipo 1 (T1DM) e di tipo 2 (T2DM). Il primo è caratterizzato da una distruzione autoimmune delle cellule β a livello del pancreas, deputate alla produzione di insulina. Viene diagnosticato principalmente in giovane età e l'unica terapia attualmente disponibile per consentire uno stile di vita normale è l'insulina sintetica, iniettata nel sottocute con diverse cinetiche di azione: in forma ultrarapida in pre-pasto o ad azione prolungata basale nelle 24 ore. Il diabete di tipo 2 è la forma più comune di diabete, presente prevalentemente in adulti ed anziani. La popolazione maggiormente interessata dalla patologia comprende una fascia d'età tra 50 e 80 anni, con prevalenza nei soggetti di sesso maschile. L'aumento della popolazione diabetica e il coinvolgimento di un sempre maggior numero di soggetti non anziani in età lavorativa ha provocato un incremento nella spesa sostenuta dal Servizio Sanitario Nazionale, assestando il budget dedicato ad una cifra pari a circa 15 miliardi annui, oltre il 10% del totale.^{1,6}

L'eziopatogenesi è correlata con molteplici fattori predisponenti, ad esempio la familiarità, l'obesità e lo stile di vita sedentario. L'iperglicemia spesso si verifica in presenza di dislipidemia e ipertensione arteriosa; il fumo rientra tra i fattori di rischio, in particolar modo delle complicanze a livello vascolare.

Il meccanismo esatto di insorgenza del diabete di tipo 2 ancora non è chiaro, ma coinvolge una disfunzione delle cellule β e un fenomeno di insulino-resistenza a livello di molteplici organi, che provocano uno stato

di iperglicemia protratta nel tempo e dannosa per l'organismo. La diagnosi di malattia si può formulare esaminando la glicemia a digiuno e post-prandiale e l'esposizione glicemica nel tempo, che viene quantificata analizzando i livelli di glicazione di alcune proteine, tra cui la più importante è la catena alfa dell'emoglobina (HbA1c).²

Il diabete è associato ad alcune complicanze croniche, sia micro- che macro-vascolari: nefropatia, retinopatia, malattie cardiovascolari e disfunzione erettile, ed è spesso causa di morte cardiovascolare. È stato dimostrato infatti nello studio SMART (Second Manifestation of ARterial disease) che i pazienti con diabete di tipo 2 e complicanze vascolari rientrano nella categoria a rischio più elevato di sviluppare nuovi eventi cardiovascolari anche mortali se confrontati con pazienti non diabetici con complicanze vascolari. Il diabete di tipo 2 inoltre è associato ad una probabilità più che doppia di incorrere in infarto miocardico, CAD (Coronary artery disease), PAD (Peripheral Artery disease) e ischemia critica agli arti inferiori.⁷

Tra le complicanze a lungo termine la neuropatia diabetica presenta meccanismi patogenetici e clinici complessi, aumentando il rischio di ulcere o lesioni periferiche a livello tale da essere la prima causa mondiale di amputazioni maggiori non traumatiche agli arti inferiori (AAII).^{8,9}

b. Il piede diabetico

Il fenomeno del piede diabetico è una delle complicanze a prognosi più infausta. È definito come una ulcerazione o distruzione dei tessuti profondi che si associa ad anomalie neurologiche e a vari gradi di vasculopatia periferica. La prevalenza di ulcere, nei pazienti diabetici, è pari allo 0.6-0.8% e la probabilità di incorrere in una lesione ai piedi, per un paziente con T2DM, è all'incirca del 15%. Nonostante il numero totale di amputazioni maggiori sia diminuito dal 2001 al 2010, spesso è l'evento risolutivo in presenza di necrosi di più tessuti (cute, strutture tendinee, osso).

Inoltre la mortalità del paziente amputato a 5 anni dall'intervento e la probabilità di recidiva sono molto elevate: è stato dimostrato infatti che il 30% dei pazienti amputati va incontro a morte entro un anno, il 50% entro 3 anni e il 70% entro 5 anni. La probabilità di recidiva inoltre si attesta tra

il 25% a 1 anno dalla comparsa della prima lesione e il 100% a 4 anni.¹⁰

Un buon flusso sanguigno ed una corretta perfusione sono due condizioni necessarie per preservare gli arti inferiori dalla comparsa di lesioni ed evitare l'amputazione. L'aterosclerosi e le calcificazioni vascolari rientrano tra le maggiori cause di morbidità e mortalità associate alla malattia; la vasculopatia periferica è un fattore predisponente la lesione, è presente nel 50% dei casi e ne condiziona la prognosi.¹¹

La macroangiopatia diabetica periferica può coinvolgere diversi distretti ed ha alcuni aspetti tipici: calcificazioni longitudinali della tunica media, frequenti occlusioni vascolari al di sotto del ginocchio e rarefazione dei vasi collaterali. Le conseguenze spesso sono fenomeni ischemici che richiedono interventi di rivascularizzazione e/o angioplastica percutanea. L'adeguato flusso di ossigeno, misurabile tramite ossimetria transcutanea (valore desiderabile >50 mmHg) è un fattore necessario per la corretta risoluzione della lesione e per supportare il processo riparativo.¹²

Una componente non trascurabile del piede diabetico è anche la presenza di infezioni frequenti in sede di lesione, che si possono presentare con segni di infiammazione o con secrezioni purulente. Le infezioni sono spesso severe e di difficile eradicazione, con germi resistenti alle più comuni terapie antibiotiche. L'infezione coinvolge non solo la cute e i tessuti molli ma anche le ossa del piede, portando a fenomeni di osteomielite di difficile eradicazione con frequente necessità di bonifica chirurgica o amputazione.¹³

c. Il processo angiogenico e la riparazione vascolare nel diabete

L'angiogenesi è uno dei meccanismi fondamentali, in età adulta, per la formazione di nuovi vasi sanguigni. A differenza della vasculogenesi, in cui il vaso si forma a partire da una popolazione di precursori indifferenziati, l'angiogenesi prevede la formazione di nuovi vasi a partire da strutture preesistenti. È un processo indispensabile per garantire il corretto flusso sanguigno in sede di lesione, nonché un meccanismo fisiologico anche se poco frequente nell'adulto. Perché questo processo sia funzionale e non

diventi patologico, favorendo ad esempio la crescita di una massa tumorale, deve essere finemente regolato: il meccanismo, infatti, è dipendente da un ben definito pattern di fattori pro- ed anti-angiogenici, che devono essere bilanciati per poter portare alla formazione di vasi in numero adeguato, integri e funzionali.

Tra i fattori proangiogenici, si possono annoverare VEGF (Vascular Endothelial Growth Factor), FGF (Fibroblast Growth Factor), Angiopietina 2 e HIF-1 (Hypoxia-inducible Factor 1), che promuovono la proliferazione e la migrazione delle cellule endoteliali, con conseguente crescita di nuovi capillari, migrazione dei fibroblasti e successiva sintesi di collagene. I fattori anti-angiogenici invece sono responsabili del corretto rimodellamento del tessuto vascolare, favorendo l'eliminazione dei vasi in eccesso, la stabilizzazione dei circoli neo-formati, e la maturazione del collagene. Tra i fattori anti-angiogenici si possono annoverare Angiopietina 1 e PEDF (Pigment Epithelium Derived Factor).¹⁴

Il meccanismo di regolazione del processo angiogenico subisce delle alterazioni in presenza di diabete mellito, che si riflette sia in angiogenesi eccessiva, ad esempio a livello di retina, sia in angiogenesi ridotta in corrispondenza del circolo coronarico, cerebrale e degli arti inferiori, in particolar modo sul piede.

Le popolazioni di cellule coinvolte in questo meccanismo sono di due tipi: le cellule mieloidi, in particolare i macrofagi, e le cellule endoteliali e i loro precursori. La prima popolazione, come dimostrato in letteratura,^{15,16} sembra essere alterata in test *in vivo* su topi diabetici, incapace di traslare da un fenotipo di tipo pro-infiammatorio ad un fenotipo riparativo, impedendo la corretta riparazione tissutale delle ferite. Su modello umano invece è stata riportata una spiccata propensione allo sviluppo di monocitosi in pazienti con sindrome metabolica e diabete, con conseguente incremento della progressione di disordini vascolari e di tipo infiammatorio.¹⁷ Si è inoltre rilevata una diminuzione nella produzione di VEGF da parte di questa popolazione alterata, con un effetto diretto sull'angiogenesi.

La popolazione endoteliale invece è stata oggetto di molteplici studi, in particolar modo nella forma di precursori, definiti come cellule di origine midollare ma presenti in circolo che esprimono i marcatori di superficie

CD34, tipico delle cellule staminali emopoietiche, KDR (recettore per VEGF) e alcuni marcatori come CD31 e/o CD133. La popolazione esprime a bassi livelli il marcatore CD45, caratteristico della linea ematologica. Questa particolare popolazione è responsabile, unitamente ad altri fattori, della formazione di nuovi vasi in caso di insulto o di tumore. È stato dimostrato un decremento sia del numero che della funzionalità di queste cellule circolanti sia su topo che su pazienti diabetici.^{18,19} I pazienti diabetici con neuroischemia periferica sembrano riflettere questa alterata omeostasi midollare del ricambio endoteliale endovasale a livello di circolo distale. In particolare modo è stata dimostrata una riduzione degli stessi precursori endoteliali con positività del recettore per VEGF in pazienti con lesioni agli arti inferiori e neuroischemia periferica distale.³

Le cause di questa riduzione di precursori endoteliali circolanti sono molteplici:

1) Minor produzione di precursori midollari, funzionalità ridotta e alterato rilascio a livello di midollo. È stato dimostrato infatti che in presenza di diabete il midollo osseo va incontro ad una riduzione nella produzione di queste cellule.²⁰ La popolazione cellulare ha inoltre dimostrato un'alterata funzionalità in termini di proliferazione, migrazione e adesione a strutture vascolari già esistenti *in vitro*.²¹ La mobilizzazione di precursori dal midollo a seguito di trattamento con G-CSF, (Granulocyte-Colony Stimulating Factor) è una metodica utilizzata di frequente per i trapianti di cellule staminali in pazienti con patologie ematologiche per la sua efficacia e sicurezza. È stato dimostrato che questa tecnica può essere efficace anche su pazienti diabetici con ulcere di difficile guarigione: la lesione sembra risolversi più velocemente se un maggior apporto di cellule staminali midollari CD34+ viene veicolato in periferia.²² Sia su modelli umani che murini però questo tipo di mobilizzazione risulta compromessa dalla patologia diabetica.²³⁻²⁵

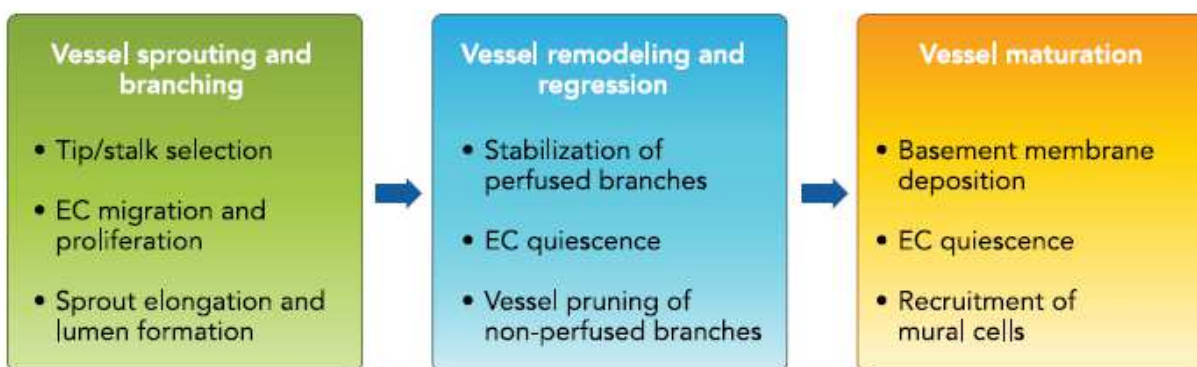
Anche la carenza di ossigeno, come accade in presenza di ischemia agli arti inferiori in modelli murini, può modificare l'omeostasi midollare endoteliale. In condizioni fisiologiche infatti la risposta all'ischemia prevede una sovraespressione di HIF-1 (Hypoxia Inducible Factor 1) e VEGF, per ripristinare i vasi e provvedere al corretto apporto di ossigeno al

tessuto sofferente. In presenza di diabete invece si è osservata una produzione carente di HIF-1, con conseguente ridotta mobilitazione di precursori dal midollo e danno vascolare irreversibile.²⁶

Infine, la carenza di fibre nervose sensitive a livello midollare dovuta alla neuropatia diabetica sembra concorrere al mancato o limitato rilascio di precursori a seguito di segnali nocicettivi.²⁵

2) mancato homing periferico: in modelli animali di diabete è stato evidenziato come la componente infiammatoria, in particolar modo la presenza di macrofagi attivati, blocchi la secrezione di CXCL12, citochina indispensabile per il reclutamento di precursori endoteliali midollari a livello della lesione agli arti inferiori, con conseguente impatto negativo sulla guarigione.²⁷

3) cause intrinseche alla cellula stessa. A livello della cellula endoteliale sembra essere coinvolta anche la componente metabolica: il glucosio in eccesso causato dal diabete viene convertito in sorbitolo nel pathway dei polioli, con successiva produzione di specie radicaliche dell'ossigeno (ROS). Il sorbitolo a sua volta viene trasformato in fruttosio, producendo metaboliti in grado di generare AGE (Advance Glycation End-products), che vanno incontro ad un fenomeno di cross-linking con i componenti della membrana basale vascolare e alterano la matrice cellulare. Il legame poi con il loro recettore, RAGE, promuove ulteriormente uno status infiammatorio e la produzione di ROS.²⁸



Fasi del processo angiogenico.

Durante i tre anni di dottorato l'approfondimento su diabete e angiogenesi ha seguito due diversi filoni, per approfondire due aspetti diversi ma ugualmente importanti della patologia.

Il primo approccio ha concentrato la sua attenzione sulle proprietà pro-angiogeniche di una molecola, S100B, di cui è stato dimostrato un ruolo chiave in alcune patologie del sistema nervoso nonché nei processi infiammatori, in particolar modo in seguito al legame con il recettore RAGE, presente in forma iperattivata nel diabete.

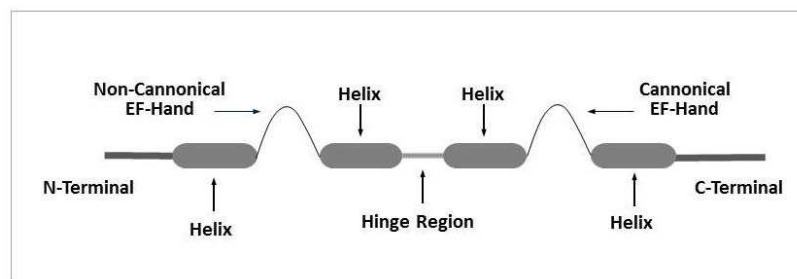
Il secondo approccio invece ha posto il focus su un possibile coinvolgimento del midollo osseo come sede in cui avviene la maturazione delle cellule staminali sia endoteliali che della linea mieloide, e che potrebbe essere compromesso dal prolungato ambiente iperglicemico. Vi sarebbe quindi un link tra progressione della malattia diabetica e la componente vascolare, ridotta maturazione delle cellule stesse in situ, e compromesso rilascio in circolo dal midollo osseo. Per approfondire parte di questa tematica è stata valutata una classe di cellule mieloidi di origine midollare caratterizzate dal marcatore CD33, di cui è stato identificato il livello di espressione *in vivo* in pazienti diabetici con o senza complicanze di tipo neuropatico e vascolare.

CAPITOLO 1

1.1. INTRODUZIONE

1.1.1. La proteina S100B

Le proteine S100 sono una famiglia di proteine a basso peso molecolare (9-13 kDa) che legano Ca^{2+} , con diversa espressione sia cellulare che tissutale. Presentano un motivo strutturale particolare denominato EF-hand e hanno la capacità di formare omodimeri, eterodimeri e oligomeri, ma sono prevalentemente presenti in forma dimerica. Sono costituite da subunità di tipo α e di tipo β , i dimeri formati da due subunità α o una subunità α e una β prendono il nome di S100A, l'omodimero formato da due subunità β S100B. Ad ora sono stati individuati 25 tipi di S100, codificati da geni diversi, presenti soprattutto nel cromosoma 1q21.²⁹



Struttura della proteina S100B

S100B è stata la prima di esse ad essere individuata, nel 1965, nel tessuto cerebrale bovino e deve il suo nome alla solubilità del 100% in ammonio solfato a pH neutro. La proteina è espressa in diversi tipi di cellule, soprattutto in popolazioni neurali (astrociti e oligodendrociti), ma anche in condrociti, adipociti, melanociti, cellule gliali dell'apparato gastrointestinale, cellule di Schwann e cellule muscolari, sia lisce vascolari che scheletriche.³⁰

S100B è costitutivamente secreta dagli astrociti, ma anche dagli adipociti a seguito di stimolazione con catecolammine. È stato inoltre dimostrato che viene rilasciata passivamente da cellule danneggiate o in necrosi, tanto che i livelli di proteina nel fluido cerebrospinale, nel liquido amniotico o nel siero possono assumere valore diagnostico e prognostico in alcune patologie, ad esempio il melanoma. Oltre ad esercitare un'azione di tipo extracellulare, S100B funziona anche come un mediatore intracellulare: a seguito del legame con Ca^{2+} avviene un cambiamento conformazionale che consente l'interazione con alcuni target proteici, provocando diversi effetti a valle quali il coordinamento della proliferazione e della differenziazione cellulare, il controllo dell'omeostasi del calcio e la regolazione di alcune attività enzimatiche.⁴

1.1.2. La funzione di S100B: ruolo intracellulare

Le funzioni di S100B sono molteplici all'interno dell'organismo, a volte contrastanti a seconda del tipo cellulare e della concentrazione di proteina.

1) S100B e proliferazione cellulare

L'effetto della proteina sulla proliferazione è stato ipotizzato a seguito dell'osservazione di alti livelli di S100B in alcune cellule tumorali o in fenomeni di astrogliosi. La proteina interagisce con p53, fattore di trascrizione coinvolto nella regolazione del ciclo cellulare e molecola chiave in alcuni meccanismi anti-tumorali, quali l'induzione di apoptosi o il blocco della replicazione. Se mutato o inattivato vengono compromessi il ciclo cellulare, l'apoptosi, l'amplificazione genica, la duplicazione dei centrosomi e la ploidia. S100B sembra interagire in maniera Ca^{2+} -dipendente con p53, inibendone la fosforilazione. Quest'ultima è indispensabile per poter attivare p53 e innescare il processo di soppressione tumorale, ed è inibita in particolar modo nel melanoma maligno.³¹

Oltre all'interazione con p53, S100B agisce sulla proliferazione cellulare anche con altri meccanismi: in linee cellulari neurali e astrociti in coltura S100B attiva l'enzima fosfatidilinositolo-3-chinasi (PI3K), stimolando la crescita cellulare ed inibendo la differenziazione. L'enzima infatti sembra essere strettamente coinvolto nei processi di crescita, proliferazione e differenziazione.⁴

Effetto simile è stato evidenziato anche sui mioblasti *in vitro*: un incremento di S100B ha come conseguenza un aumento del numero di cellule e ne aumenta la sopravvivenza. Una down-regolazione invece di S100B è necessaria per l'acquisizione di un fenotipo quiescente e per una differenziazione di tipo terminale.³²

2) S100B e citoscheletro

S100B è stata dimostrata in molte strutture del citoscheletro: centrosomi, microtubuli citoplasmatici, tropomiosina, actina e filamenti di tipo III. L'effetto di S100B si ha nella modulazione dell'assemblaggio dei microtubuli e nell'induzione del disassemblaggio Ca^{2+} e pH-mediato. È stato inoltre dimostrato che S100B aumenta la sensibilità dei microtubuli al calcio.³³

I target di S100B a livello del citoscheletro sono tubulina e proteina τ , ma è stata evidenziata anche una interazione con il caldesmone, di cui inibisce la fosforilazione. Il caldesmone fosforilato è responsabile dell'inibizione dell'attività ATPasica dell'actomiosina. S100B blocca questa inibizione, favorendo quindi la stabilizzazione dei filamenti di actomiosina *in vitro*.³⁴ È stato ipotizzato anche un coinvolgimento di S100B nei processi di migrazione cellulare attraverso l'attivazione di una specifica proteina denominata IQGAP1, favorendo quindi la riorganizzazione citoscheletrica e la successiva migrazione attraverso un pathway di chinasi che comprende anche P13-K e Akt.³⁰

3) S100B e differenziazione cellulare

La proteina sembra avere un ruolo inibitorio nei confronti del differenziamento cellulare, come evidenziato in linee cellulari neuronali: S100B, infatti, sembra contrastare la differenziazione indotta da NGF. È stato anche evidenziato però che il ruolo di S100B sembra essere inibitorio solo sulle prime fasi del processo: la molecola infatti non favorisce tanto la regressione di cellule già differenziate ma ne rallenta la differenziazione quando immature.³⁵

Anche gli astrociti, popolazione cellulare che più esprime S100B, risentono della sua influenza sulla differenziazione. È stato dimostrato, infatti, che vi è una riduzione nell'espressione della proteina nel momento in cui avviene

la differenziazione, con riduzione della migrazione e acquisizione di un fenotipo più maturo. La riduzione di S100B sembra essere transitoria, ripristinando i valori iniziali nelle fasi più tardive.

Le cellule neuronali non sono le uniche però ad essere regolate da S100B nel processo di differenziazione. È stato dimostrato infatti che la proteina è attivamente coinvolta nella modulazione della maturazione dei mioblasti, precursori delle fibre scheletriche. La sovraespressione di S100B infatti ha come conseguenza un blocco della differenziazione in senso miogenico indotta da MyoD, fattore di trascrizione specifico del muscolo, che da S100B viene inibito.³⁶

4) S100B e omeostasi del calcio

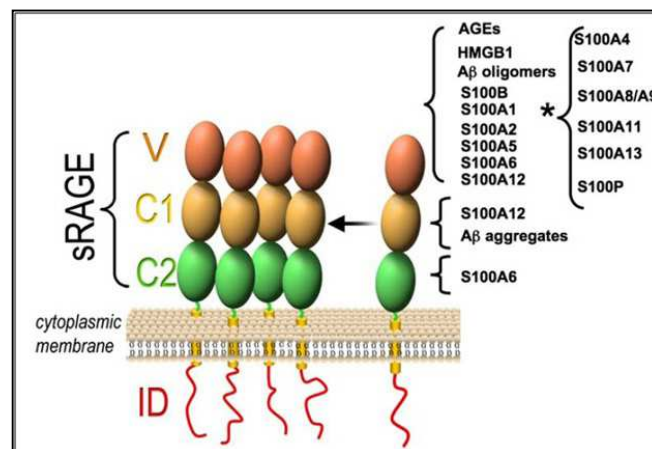
Studi sugli astrociti hanno evidenziato il ruolo di S100B nel mantenimento dell'omeostasi di Ca^{2+} : è stato dimostrato infatti che topi knockout per la proteina presentavano un'aumentata concentrazione di Ca^{2+} a seguito di stimolazione con KCl o caffeina. È stato poi valutato un possibile collegamento tra S100B e AHNAK, proteina implicata nella regolazione del flusso di calcio e presente nei desmosomi. L'interazione infatti potrebbe spiegare il meccanismo di regolazione dell'omeostasi dello ione, non solo a livello astrocitario ma anche in altre popolazioni cellulari, ad esempio i cardiomiociti. Non è ancora chiaro però il meccanismo molecolare che regola questo processo; è necessario approfondire quali siano i mediatori cellula-specifici che possono regolare tale meccanismo nei diversi tipi cellulari.³⁷

5) S100B e attività enzimatica

La proteina sembra svolgere un ruolo da protagonista nella regolazione di molteplici attività enzimatiche dell'organismo, che coinvolgono alcuni enzimi del metabolismo quali fruttosio-1,6-bisfosfato aldolasi e fosfoglucomutasi. Sono state ampiamente dimostrate le interazioni di S100B e Ndr e gli effetti regolatori su PI3-K/Akt, IKK β e ERK1/2 e di recente è stato individuato un link tra S100B e il recettore D2 per la dopamina, con conseguente attivazione di ERK1/2 e inibizione dell'attività dell'adenilato ciclasi, facendo ipotizzare un ruolo della proteina nella progressione e risoluzione di danno cerebrale.³⁸

1.1.3. Il ruolo extracellulare e il recettore RAGE

Il recettore transmembrana RAGE è deputato a legare gli AGE, prodotti di glicosilazione caratterizzati da strutture molto diverse tra loro. Può unirsi inoltre ad altri ligandi quali amfoterina, β -amiloide e piccoli peptidi appartenenti alla famiglia S100. È una proteina appartenente alla superfamiglia delle immunoglobuline di superficie, collocata su molti tipi cellulari, tra cui le cellule muscolari lisce vascolari e le cellule endoteliali. L'interazione di RAGE con i suoi molteplici ligandi provoca la fosforilazione di differenti protein-chinasi, coinvolte nella trasduzione di segnali diversi e nell'attivazione di alcuni particolari fattori di trascrizione, avente come fine ultimo l'attivazione del fattore NF- κ B.³⁹ RAGE è costituito da tre regioni immunoglobulino-simili a livello extracellulare, denominate V, C1 e C2, una regione transmembrana ed una piccola regione intracellulare. Il legame con i suoi specifici ligandi avviene a livello del dominio V, dotato di grande plasticità per potersi adattare nel modo migliore ad una ampia varietà di molecole. Per poter trasdurre il segnale, una volta avvenuto il legame recettore-ligando, il recettore forma degli oligomeri a livello della membrana cellulare. Ne esiste anche una forma solubile, sRAGE, in cui non sono presenti le porzioni intracellulare e transmembrana. Questa variante di splicing è circolante a livello plasmatico, dove compete per i ligandi di RAGE avendo quindi un ruolo inibitorio sulla trasduzione del segnale.⁴⁰



Struttura del recettore RAGE

La proteina S100B può esercitare un effetto regolatorio anche una volta

rilasciata a livello extracellulare. Viene liberata dagli astrociti, dagli adipociti a seguito di stimolazione lipolitica, da cellule pituitarie dell'ipofisi e da altre popolazioni cellulari. La maggior parte dell'attività extracellulare della proteina è strettamente collegata al suo legame con il recettore RAGE e sulla cascata di segnale che questo legame attiva. Il rilascio di S100B provoca infatti una molteplicità di effetti su diverse tipologie di cellule.

1) Effetto su neuroni e microglia

La funzione che S100B esercita sulle cellule neuronali è principalmente di tipo neurotrofico, stimolando la crescita di neuriti e la rigenerazione cellulare sia *in vitro* che *in vivo*, potenziando la sopravvivenza dei neuroni sia durante lo sviluppo che a seguito di danno e prevenendone la degenerazione in modelli di ratti neonati.⁴¹

Esercita inoltre un effetto protettivo contro gli stimoli tossici, favorendo la sovraespressione del fattore anti-apoptotico Bcl2 attraverso il legame con RAGE e la successiva attivazione del pathway regolato da Ras/MEK/ERK1/2/NF-κB. Il meccanismo protettivo di S100B può avvenire anche per via indiretta, attraverso la stimolazione dell'uptake di molecole neurotossiche da parte degli astrociti, la riduzione dell'attivazione di microglia e astrociti neurotossina-dipendente e l'abbassamento della citotossicità neuronale e gliale a seguito di ipotermia.⁴²

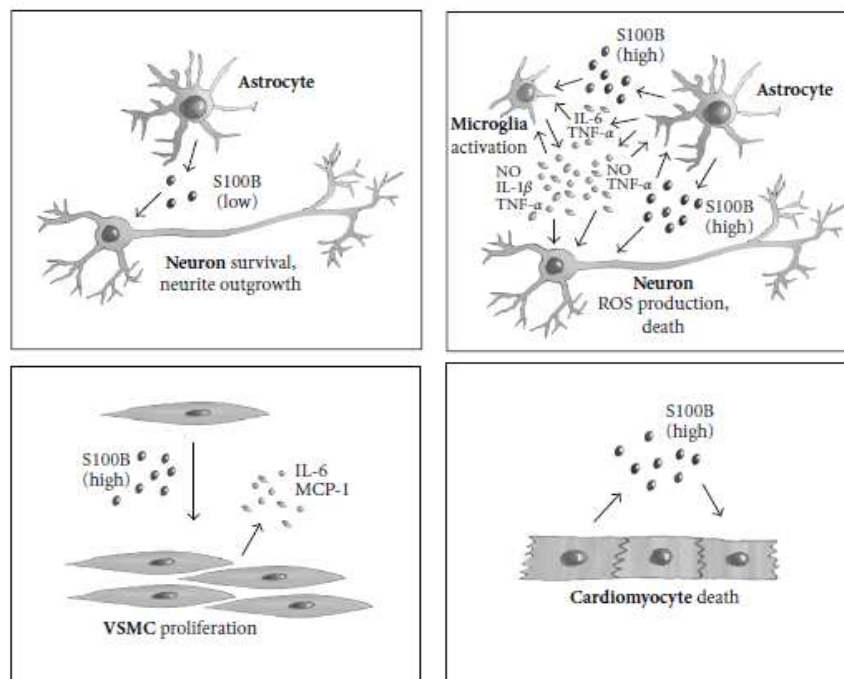
La formazione di neuriti sembra dipendere dal legame S100B-RAGE, anche se è stato dimostrato come una attivazione cronica del recettore possa contribuire alla rigenerazione neuronale periferica difettosa che si riscontra in pazienti diabetici.⁴³

La concentrazione di molecola rilasciata però risulta essere determinante per evidenziare un effetto neuroprotettivo, nonostante le evidenze sulla concentrazione limite siano contrastanti.

È stato dimostrato poi che la proteina risulta essere più elevata in presenza di alcune patologie neurodegenerative, in particolar modo nel morbo di Alzheimer, e in alcune condizioni cerebrali patologiche, quali la sindrome di Down e la schizofrenia, sebbene non siano ancora del tutto noti i livelli cerebrali esatti di S100B in condizioni normali e patologiche.^{44,45}

A concentrazioni micromolari è stato ipotizzato che S100B possa agire

come citochina proinfiammatoria: l'attivazione di RAGE a queste concentrazioni infatti si traduce in una iper produzione di radicali liberi dell'ossigeno, dannosi per il comparto cerebrale. A livello della microglia, è stata evidenziata una certa sinergia tra S100B, LPS e IFN- γ che provoca la stimolazione della secrezione di ossido nitrico e la sovraregolazione dell'enzima proinfiammatorio COX-2, con effetto tossico.⁴⁶



Effetto di concentrazioni elevate di S100B su differenti popolazioni cellulari

2) Effetto su linfociti T, monociti/macrofagi e neutrofili

Il legame di S100B e RAGE sia in linee cellulari mieloidi che in monociti derivanti da sangue periferico sembra up-regolare l'espressione di COX-2 e la produzione di prostaglandine, con conseguente generazione di ROS e attivazione di PKC, ERK1/2, p38 MAPK e NF- κ B. S100B può inoltre potenziare il fenomeno di adesione dei monociti alle cellule muscolari lisce ed incrementare il rilascio di TNF- α da monociti di sangue periferico. La proteina inoltre sembra avere un effetto sulla generazione di O $_2^-$, stimolare la produzione di NO da parte dei macrofagi e aumentare la sensibilità dei neutrofili ad agenti chemoattrattivi. In tal modo si conferma un ruolo attivo di S100B nella prima linea di difesa nelle infezioni batteriche, ma anche un potenziale ruolo dannoso per l'induzione dell'espressione di geni

proinfiammatori e del burst ossidativo.⁴⁷

In un modello sperimentale di encefalomielite autoimmune inoltre è stato dimostrato che S100B promuove l'infiltrazione di cellule T nel sistema nervoso centrale, chemoattraendo le cellule CD4+ encefalitogeniche che esprimono RAGE. Sembra inoltre che S100B possa avere un ruolo importante nella patogenesi della sclerosi multipla, sia per l'effetto chemoattrattivo nei confronti delle cellule T RAGE+ sia per l'attivazione di astrociti e microglia RAGE-dipendente.⁴⁸

3) Effetto su cellule endoteliali, cellule muscolari lisce vascolari e cellule della retina

Nelle cellule endoteliali, popolazione chiave nei meccanismi angiogenici, S100B sembra legare il recettore RAGE ed indurre l'attivazione del fattore di trascrizione NF- κ B, con conseguente aumento dell'espressione di VCAM-1 (Vascular Cell Adhesion Molecule-1) e di MCP-1 (Monocyte Chemoattractant Protein-1), aumentando l'adesione dei leucociti alle cellule endoteliali stesse.^{49,50}

Il legame S100B-RAGE a livello delle cellule muscolari lisce vascolari (VSMC) del comparto arterioso provoca un aumento della generazione di ROS attraverso la stimolazione dell'enzima NADPH-ossidasi e la fosforilazione della chinasi JAK a seguito dell'attivazione della fosfolipasi D2. Nel complesso, questi effetti si traducono in un aumento della proliferazione e della migrazione delle VSMC. S100B aumenta *in vitro* la secrezione del fattore di crescita endoteliale VEGF nelle cellule pigmentate della retina, favorendo la propagazione della degenerazione maculare in un processo simil-angiogenico. L'interazione S100B/RAGE sembra avere una funzione importante nei fenomeni correlati all'angiogenesi e nelle patologie che presentano difetti microcircolatori, tra cui infarto miocardico, danni cerebrali e diabete.⁵¹

1.1.4. S100B e diabete

Come già accennato in precedenza, la patologia ha un notevole impatto su diversi distretti dell'organismo. La presenza di S100B con azione sia intra che extra cellulare su diversi tipi di cellule ha dato origine a numerosi studi in cui è stato approfondito il potenziale legame tra S100B e i distretti

chiave nelle complicanze del diabete. In primo luogo è stato indagata la presenza di un link tra la proteina e la neuropatia diabetica: è infatti più che confermato il ruolo fondamentale che S100B svolge sul comparto nervoso. Il gruppo di Vincent et al⁵² ha dimostrato che l'iperglicemia acuta e cronica può provocare e promuovere l'avanzamento della neuropatia diabetica, in particolar modo legata allo stress ossidativo. I livelli circolanti di S100B sono stati valutati come possibile marcatore di effetti neurodegenerativi sulla glia, ed è stato dimostrato un calo di proteina sierica in pazienti diabetici. Nonostante l'associazione diretta con la complicanza non sia pienamente dimostrata, S100B potrebbe esercitare un effetto protettivo a livello nervoso in questa categoria di pazienti.

I dati su modelli sperimentali di T1DM hanno evidenziato un aumento di S100B tissutale, ipotizzandone un ruolo come autoantigene responsabile della secrezione di IL-10 e IFN- γ e candidandolo come parametro utile per verificare la prognosi a seguito di immunoterapia. Un'ulteriore ipotesi coinvolge invece gli adipociti, che sembrano contribuire attivamente al mantenimento di elevati livelli sierici di S100B in pazienti con BMI \geq 25, caratteristica che spesso è propria dei pazienti con T2DM.⁵³

È stato inoltre evidenziato un calo nell'espressione della proteina nel miocardio di topi diabetici a seguito di infarto miocardico, con successiva esacerbazione della funzionalità cardiaca, aumento dell'ipertrofia ventricolare, diminuzione dell'apoptosi e del rimodellamento miocardico. Questi dati sembrano quindi suggerire un ruolo protettivo della proteina in modelli di diabete e complicanza cardio-vascolare.⁵⁴

La sovra espressione di RAGE e la sua eccessiva attivazione mediata dal legame con S100B sembrano influire sulle cellule muscolari lisce vascolari. È stato dimostrato infatti che in modelli sperimentali di diabete di tipo 2 l'attivazione di RAGE potenzia lo stato infiammatorio e aumenta la capacità migratoria delle VSMC, rendendole iperattivate e disfunzionali, con conseguente aumento del rischio di sviluppo di disordini cardio-vascolari.⁵⁵

L'attivazione di RAGE indotta da S100B svolge un ruolo notevole in caso di disfunzione endoteliale. Sembra infatti che il legame con S100B riduca la vasodilatazione NO-mediata indotta da acetilcolina nelle arteriole

coronariche, compromettendo la risposta vascolare nel diabete. In questo modo si innescano una serie di eventi micro e macrovascolari che compromettono ulteriormente il sistema vascolare nel diabete, già minato da una dimostrata carenza di precursori endoteliali.⁵⁶

Nel complesso, queste evidenze risultano essere contrastanti: il legame tra S100B e complicanze del diabete non è pienamente confermato, si rendono quindi necessari nuovi studi per poter evidenziare il ruolo della proteina sia intra che extracellulare, definirne la concentrazione normale e valutare l'effetto finale di S100B sul comparto vascolare.

1.2. SCOPO DELLA TESI

I dati contrastanti sul ruolo di S100B a livello cardiovascolare, i molteplici effetti della proteina sia a livello intra che extra cellulare, le diverse vie di segnale attivate, le differenti concentrazioni d'uso richiedono ulteriori approfondimenti.

In questa tesi è stato quindi

1. verificato l'effetto di S100B sull'angiogenesi sia *in vitro* che *in vivo*, utilizzando, rispettivamente, cellule endoteliali da vena ombelicale umana (HUVEC) e i plug di Matrigel nel topo;
2. valutato l'effetto del recettore RAGE sull'angiogenesi, studiando la chinasi ERK1/2 coinvolta nella cascata di segnale attivata dal legame con S100B.

1.3. MATERIALI E METODI

1.3.1. Colture cellulari

Le cellule HUVEC sono state estratte mediante digestione enzimatica da vena di cordone ombelicale umano. Il cordone è stato sottoposto a ripetuti lavaggi con tampone sodio-fosfato (PBS, Gibco, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) contenente l'1% di soluzione antibiotica (Penicillina/Streptomicina, Sigma Aldrich, Saint Louis, MO, USA) all'interno e all'esterno della vena per rimuovere eventuali residui indesiderati e coaguli di sangue. Una soluzione allo 0,1% di Collagenasi IV (Sigma Aldrich) in PBS è stata inoculata internamente alla vena e lasciata in incubazione 15 min a +37°C in atmosfera umidificata. Successivamente è stato eseguito un lavaggio con 5 mL di terreno base specifico per cellule endoteliali (MV2, Promocell GmbH, Heidelberg, Germany) consentendo l'eluizione delle cellule desiderate.

La sospensione cellulare è stata centrifugata 5 min a 1500 rpm e risospesa in terreno MV2 completo contenente i seguenti fattori: 5% Fetal Calf Serum (FCS), 5,0 ng/mL Human Epidermal Growth Factor (EGF), 0,2 µg/mL Idrocortisone, 0,5 ng/mL Vascular Endotelial Growth Factor (VEGF), 10 ng/mL Human Basic Fibroblast Growth Factor (FGF), 20 ng/mL Insulin-like Growth Factor-1 (IGF), 1 ng/mL Acido Ascorbico, 1% antibiotico/antimicotico (Endothelial MV2 medium kit, Promocell GmbH). Le cellule sono state seminate in piastra Petri condizionata con 1 µg/cm² di fibronectina (Becton, Dickinson and Company, BD, Franklin Lakes, NJ, USA), per mimare l'effetto della matrice extracellulare (ECM). Gli esperimenti sono stati effettuati con cellule al secondo o terzo passaggio di subcoltura

1.3.2. Silenziamento genico e blocco della cascata di segnale

Il recettore RAGE è stato silenziato per definirne il ruolo nelle HUVEC a seguito di stimolazione con S100B. Sono stati utilizzati specifici small interfering RNA (siRNA), molecole di RNA a doppio filamento lunghe 21-

25 nucleotidi in grado di inibire l'espressione di alcuni geni target. Queste ultime derivano da molecole di RNA a doppio filamento necessarie alla cellula per la regolazione del suo pool proteico. Una volta tagliate da un enzima specifico danno origine ai siRNA, che sono dotati di una sequenza identica a quella del gene bersaglio. Il meccanismo prevede che il filamento antisenso sia separato dal filamento senso da una apposita elicasi e si associ al complesso RISC (RNA-Induced Silencing Complex) attivandolo. RISC esegue quindi una selezione dell'mRNA presente nel citosol individuando il frammento complementare al filamento antisenso del siRNA incorporato in precedenza. I due filamenti si appaiano e vengono tagliati da Ago, componente enzimatica di RISC e successivamente degradati, impedendo la traduzione in proteina. I siRNA utilizzati per gli esperimenti erano prodotti di sintesi, transfettati nelle cellule in coltura.⁵⁷

La valutazione della cascata di segnale è stata invece effettuata utilizzando PD980591, inibitore della fosforilazione di ERK1/2 prodotto dalla ditta Tocris (Tocris Bioscience, Bristol, UK)

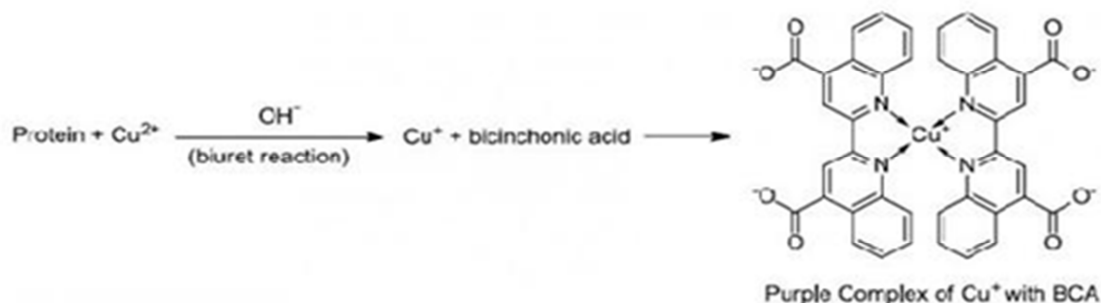
Trasfezione di cellule HUVEC con siRNA ON-TARGETplus e INTERFERin™ Transfection reagent. Per il silenziamento dell'espressione del gene RAGE è stato utilizzata una miscela di quattro siRNA specifici (ON-TARGETplus SMARTpool, Dharmacon Inc, Lafayette, CO, USA). La trasfezione è stata eseguita utilizzando INTERFERin™ (Polyplus-Transfection SA, Illkirch-Graffenstaden, France), polimero sintetico che lega i siRNA e stimola l'endocitosi cellulare. Sono stati preparati anche un controllo positivo ON-TARGETplus GAPDH Control siRNA, diretto contro il gene housekeeping gliceraldeide-3-fosfato deidrogenasi (GAPDH), e un controllo negativo ON-TARGETplus Non-targeting pool. $1,5 \times 10^4$ cellule/cm² sono state seminate in piastra da 24 pozzetti e, al raggiungimento di una confluenza del 30-50%, trattate con una soluzione 1 nM di ON-TARGETplus SMARTpool. La trasfezione è stata eseguita trattando le cellule con una miscela di ON-TARGETplus SMART siRNA (1 nM) e reagente INTERFERin™ in terreno MV2 completo precedentemente incubata a temperatura ambiente (Tamb). Il silenziamento di RAGE è stato poi verificato con metodica Western Blot a 24, 48 e 72 h di trattamento.

Inibizione della via di segnale di ERK1/2 Le cellule HUVEC sono state incubate per 1 h con 7,5 μ M PD980591 per ottenere l'inibizione dell'attivazione di ERK1/2. In seguito, il trattamento con l'inibitore è proseguito per 0, 2, 4, 18, 24 h in presenza di 0,1 nM S100B. La verifica dell'efficacia del trattamento è stata eseguita tramite Western Blot.

1.3.3. Western Blot

Le cellule in coltura sono state staccate dalle piastre con 0,025% Tripsina/0,01% EDTA (Sigma Aldrich) e centrifugate a 1500 rpm per 5 min. Il pellet è stato quindi trattato con Ripa buffer + inibitori di proteasi per 10 min in ghiaccio. Il Ripa buffer conteneva 50 mM Tris-HCl, pH 7,4 (Sigma Aldrich) per prevenire la denaturazione delle proteine, 150 mM NaCl (Sigma Aldrich) per prevenire l'aggregazione proteica aspecifica, 1% Nonyl Phenoxypolyethoxylethanol (NP-40, Sigma Aldrich) detergente per l'estrazione. Il lisato ottenuto è stato centrifugato a 13200 rpm per 10 min a +4°C, il surnatante recuperato e conservato a -20°C.

La quantificazione delle proteine è stata effettuata utilizzando il Pierce BCA Protein Assay Kit (Thermo Fisher Scientific). Questo metodo combina la riduzione del rame ($\text{Cu}^{2+} \rightarrow \text{Cu}^{1+}$), effettuata dalle proteine in un mezzo alcalino (reazione del biureto), con la determinazione colorimetrica del catione Cu^{1+} da parte dell'acido bicinconinico (BCA). In particolare, la reazione colorimetrica è data dalla chelazione di due molecole di BCA con uno ione rame. L'assorbanza di tale complesso idrosolubile a 570 nm è lineare con la concentrazione proteica.



Reazione di chelazione dell'acido bicinconinico con Cu^{1+} .

Sono stati preparati nove standard partendo da una soluzione madre di Bovine Serum Albumin (BSA) contenuta nel kit, aventi una concentrazione

nota in un intervallo compreso tra 0 mg/mL e 2 mg/mL (0; 0,025; 0,125; 0,25; 0,50; 0,75; 1; 1,5; 2 mg/mL).

In seguito, ogni diluizione dello stock di BSA e di ogni campione da quantificare è stato diluito 1:20 con il Working Reagent (WR). Quest'ultimo è stato preparato miscelando 50 parti del Reagente A (Sodio Carbonato, Sodio Bicarbonato, reagente per la detenzione della BSA e Sodio Tartrato in NaOH 0.2 N), con una parte del reagente B (soluzione di solfato di rame al 4%) forniti dal kit. La piastra è stata poi incubata per 30 min a +37°C. La determinazione dell'assorbanza mediante Microplate Autoreader EL 311 (Bio Tek Instruments, Winooski, VT, USA) è avvenuta a $\lambda = 570$ nm. La retta di taratura è stata preparata riportando in ascissa del sistema grafico le concentrazioni degli standard e in ordinata le relative assorbanze. Mediante analisi di regressione lineare, è stata calcolata l'equazione della retta per estrapolare le concentrazioni proteiche (mg/mL) dei singoli campioni.

Per separare le proteine a seconda delle loro dimensioni e della loro carica è stato utilizzato un gel preparato per copolimerizzazione di acrilammide e di N,N'-metilene bisacrilammide, monomero bifunzionale che forma legami trasversali e consente di ottenere un reticolo tridimensionale. La reazione viene dalla base N,N,N',N'-tetraetilendiammina (TEMED). Sulla base di questo procedimento, si ottengono due diversi tipi di gel, posti uno sopra l'altro: lo stacking gel, la parte superiore, ha la funzione di concentrare il campione proteico e far arrivare il campione in modo uniforme sul fronte di corsa. Il running gel invece è deputato alla separazione proteica in base al peso molecolare della proteina. Per valutare il silenziamento di RAGE e l'inibizione dell'attivazione di ERK1/2 nelle HUVEC è stato utilizzato stacking gel al 4% e running gel al 12%. Lo stacking gel era composto da 4% Acrylamide and bis-Acrylamide solutions (Bio-Rad Laboratories Inc, Hercules, CA, USA), 12,5% Tris-HCl 1M pH 6,81, 72,4% Acqua mQ, 0,1% p/v SDS (Sigma Aldrich), 0,1% p/v APS (Sigma Aldrich), 1,6% TEMED (Bio-Rad). Il running gel conteneva 12% Acrylamide and bis-Acrylamide solutions, 37,5% Tris-HCl 1M pH 8,81, 29,3% Acqua mQ, 0,1% p/v SDS, 0,035% p/v APS, 0,075% TEMED. Per ogni campione è stata caricata una quantità di lisato corrispondente a 10 μ g di proteine totali addizionati con SDS e loading buffer (Bio-Rad) in un volume totale di 25 μ L. Parallelamente sono stati caricati 5 μ L di Precision Plus Protein TM Dual

Color (Bio-Rad) per la definizione dei pesi molecolari di riferimento. La corsa elettroforetica è stata eseguita a 130 Volt per 2 h in Running buffer 1M (25 mM Trizma base, 192 mM Glicina, 0,1% SDS; Sigma Aldrich).

Alla conclusione della corsa elettroforetica il gel è stato trasferito nell'apposito apparato a contatto con la membrana di polivinildenfluoruro (PVDF) precedentemente attivata in metanolo (Sigma Aldrich) per consentire il trasferimento delle proteine separate. Il trasferimento è avvenuto per 4 h a 400 mA. Per verificare l'avvenuto trasferimento delle proteine alla membrana di PVDF, quest'ultima è stata immersa per pochi minuti nella soluzione colorante Red Ponceau (Sigma Aldrich) e poi sciacquata con acqua distillata.

La membrana ottenuta è stata saturata in BSA (Sigma Aldrich) al 10% in acqua mQ per 1 h in agitazione per impedire eventuali interazioni non specifiche con l'anticorpo. La membrana è stata quindi incubata una notte a +4°C con i seguenti anticorpi primari: rabbit anti-human RAGE (1:500, Epitomics, Abcam, Cambridge, UK), oppure rabbit anti-human Phospho-44/42 MAPK (ERK1/2 (Thr202/Tyr204) Antibody (1:1000, Cell Signaling Technology Inc, Danvers, MA, USA), diluiti in BSA al 5% in acqua mQ. Dopo l'incubazione la membrana è stata lavata con Tris-buffered saline (TBS, Tris-HCl 0,05 M, NaCl 0,15M, pH 7,5) e incubata per 1 h in agitazione al riparo dalla luce diretta con una soluzione di anticorpo secondario Anti rabbit-HRP (1:5000, Bio-Rad) diluito in BSA al 5% in acqua mQ. La membrana incubata con l'anticorpo secondario è stata ripetutamente lavata con TBS e a seguire incubata con Chemiluminescent Peroxidase Substrate (Sigma Aldrich) ottenuto unendo le soluzioni A (Chemiluminescent Reagent) e B (Chemiluminescent Reaction Buffer) forniti dal kit in proporzione 1:1. La membrana è stata quindi inserita in una cassetta di autoradiografia a contatto con una lastra autoradigrafica (Sigma Aldrich) al buio il tempo necessario ad essere impressionata. La lastra è stata sviluppata tramite incubazione in liquido di sviluppo X-OMAT EX II e di fissaggio RP X-OMAT LO (Kodak, Rochester, NY, USA).

1.3.4. Saggio di proliferazione cellulare

Per verificare la vitalità cellulare è stato utilizzato il saggio colorimetrico che utilizza il 3-[4,5-dimetiltiazolo-2-il]-2,5-

difeniltetrazoliobromuro, noto come MTT. Il composto, di colore giallo, una volta messo a contatto con le cellule viene ridotto a cristalli di formazano, di colore viola, per mezzo delle deidrogenasi presenti nelle cellule vitali. I cristalli vengono poi estratti dalle cellule con propan-2-olo acido (0,04 M HCl in propan-2-olo) e quantificati tramite spettrofotometria a 570 nm. Le cellule HUVEC wild type, silenziate o trattate con inibitore sono state seminate in piastre da 96 pozzetti in terreno completo ad una densità di $1,4 \times 10^5$ cell/cm² per 24 h a +37 °C. Le cellule sono poi state lavate con PBS ed è stata aggiunta la proteina S100B a concentrazioni 0,01, 0,1, 100 nM in un volume finale di 200 µL per 2 h. È stato allestito anche un controllo con cellule in terreno completo non trattate. Allo scadere delle 2 h, le cellule sono state incubate con terreno MV2 completo addizionato del 10% di MTT (5 mg/mL in PBS, Sigma Aldrich) per 4 h. I cristalli di formazano sono stati poi solubilizzati con 75 µL di isopropanolo acido (CARLO ERBA Reagents Srl, Milano, Italia), in blanda agitazione al buio per 20 min. È stata quindi letta l'assorbanza a 570 nm con spettrofotometro Microplate autoreader EL 13 (Bio Tek Instruments). I risultati, media di almeno 3 esperimenti, sono stati espressi come variazione percentuale rispetto alle colture di controllo non trattate.

1.3.5. Saggio di migrazione cellulare

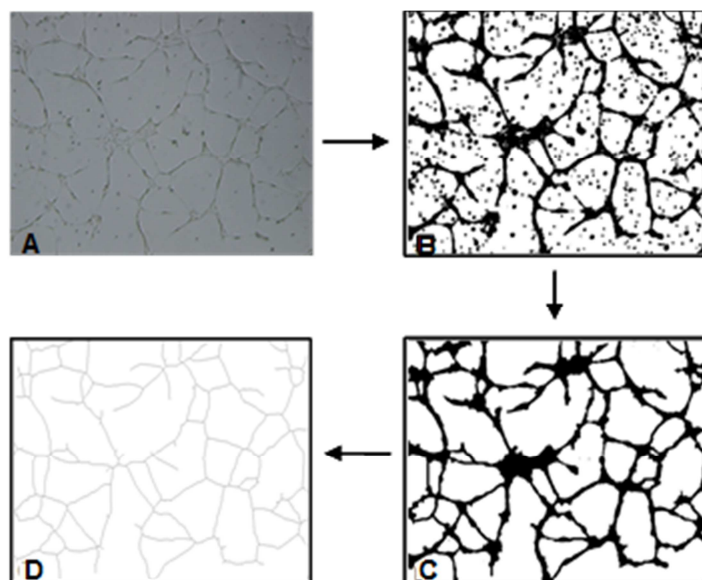
Per eseguire la valutazione dell'effetto di S100B sulla migrazione cellulare, evento chiave nel processo angiogenico, le HUVEC sono state seminate su un filtro poroso di tipo Transwell per piastre a 24 pozzetti, con membrana di policarbonato di 6,5 mm e pori di 5 µm (Corning Inc, Corning, NY, USA). Brevemente, 5×10^4 cellule wild type, silenziate o trattate con inibitore sono state seminate sulla membrana microporosa in terreno base contenente 1% FCS con o senza S100B in concentrazione di 0,01, 0,1, 100 nM, in presenza o assenza dell'inibitore. Ogni filtro è stato posizionato in un pozzetto contenente 400 µL di terreno base con 1% FCS e le cellule sono state lasciate ad incubare per 4 h a +37 °C. Le cellule sono state quindi fissate con formaldeide 10% per 24 h, il filtro è stato lavato con PBS ed è stato posizionato su vetrino portaoggetti. I nuclei delle

cellule migrate al di là della membrana sono state identificate con DAPI (4,6-diamino-2-fenilindolo, VECTASHIELD Mounting Medium for fluorescence with DAPI, Vector Laboratories, Burlingame, CA, USA), fotografando 5 campi della parte inferiore di ogni filtro con microscopio a fluorescenza (Leica, Wetzlar, Germania, ingrandimento x100). Le cellule migrate sono state quindi contate e rapportate al numero di cellule migrate nel controllo non trattato.

1.3.6. Morfogenesi *in vitro*

La capacità di formare nuovi capillari è un requisito indispensabile per supportare il processo angiogenico. Le cellule HUVEC possono formare strutture tubulari capillaro-simili dopo un periodo di 4-6 settimane in coltura in assenza di mitogeni, oppure in tempi più brevi se le cellule sono seminate su superfici condizionate con componenti della matrice extracellulare. Tra queste, un ruolo importante viene assunto da collagene IV, proteoglicani ad eparan solfato (HSPG) glicoproteine. La laminina, ad esempio, promuove l'adesione cellulare e sembra stimolare i processi di crescita, differenziamento e migrazione.^{58,59} Per mimare l'ECM, è stato scelto di condizionare le piastre con Matrigel GFR, un estratto di lamina basale del sarcoma murino di Engelbreth-Holm-Swarm (EHS), ricco in proteine della matrice extracellulare, quali laminina, collagene IV, entactina, HSGP. Il prodotto, liquido a +4 °C, polimerizza irreversibilmente a Tamb e produce una matrice biologicamente attiva simile a quella presente nei mammiferi, ideale per gli studi di angiogenesi. Ciascun pozzetto di piastra da 24 pozzetti è stato condizionato con 50 µL di Matrigel Growth Factor Reduced (BD), scongelato in precedenza per una notte in ghiaccio a +4 °C, utilizzando pipette, puntali e altro materiale utile preraffreddato a -20 °C e mantenendo la piastra in ghiaccio per tutta la durata del condizionamento. La piastra è stata quindi lasciata a +37 °C per minimo 1 h per indurre la polimerizzazione del Matrigel. A seguire sono state seminate $2,5 \times 10^4$ cell/cm² in terreno base addizionato di FCS 1% in presenza o assenza di S100B e/o inibitore e mantenute a +37 °C per 18 h. Le cellule sono state poi lavate con PBS e fissate con glutaraldeide 4%

(Merck Millipore, Burlington, MA, USA) in tampone sodio cacodilato 0,1 M (Sigma Aldrich). Sono stati poi fotografati, per ogni pozzetto, 5 campi ad ingrandimento x50 seguendo uno schema a croce e le immagini ottenute sono state analizzate con il Software ImageJ-Matrigel Assay. Sono stati valutati nell'analisi sia alcuni parametri topologici, ad esempio il numero di maglie chiuse formate dalle cellule, sia parametri dimensionali, ad esempio l'area percentuale racchiusa all'interno delle strutture capillaro-simili formate dalle cellule. I risultati ottenuti dalla media di almeno 3 esperimenti sono stati espressi come variazione percentuale rispetto al campione non trattato.



Analisi delle immagini ottenute con il software "IMAGEJ ANGIOJ- MATRIGEL ASSAY". Partendo dall'immagine ottenuta al microscopio (A), grazie al software, si ottiene dapprima l'immagine di contrasto in bianco e nero (B), quindi l'immagine viene corretta manualmente (C) ed infine si ottiene lo scheletro della rete di maglie (D).

1.3.7. Saggio *in vivo* con Plug di Matrigel

Poiché i saggi *in vitro* sono caratterizzati da molti benefici ma anche da molte limitazioni, è stato utilizzato anche un modello *in vivo*. Le EC coltivate *in vitro* infatti hanno caratteristiche fenotipiche diverse date dall'origine micro e macrovascolare e dall'organo di provenienza, sono quiescenti all'interno del vaso e si attivano una volta poste in coltura, ma la proliferazione spesso porta con sé stati di attivazione diversi e variazioni del cariotipo e degli antigeni di superficie. Non sono, inoltre, l'unica

popolazione coinvolta nei processi di angiogenesi, che è piuttosto il frutto di un coordinamento serrato tra diversi tipi cellulari (periciti, fibroblasti, cellule muscolari lisce, cellule mesenchimali, cellule sanguigne) e molteplici fattori pro e antiangiogenici.⁶⁰

I modelli *in vivo* utilizzati per lo studio dell'angiogenesi comprendono test su membrana corioallantoidea di pollo (CAM test), saggio su mesentero di ratto, saggi con impianto di plug di Matrigel e modelli di angiogenesi tumorale. L'impianto sottocutaneo di plug di Matrigel in topi C57 Black è un saggio molto utilizzato per verificare la formazione di nuovi vasi sanguigni all'interno del gel inoculato. Nel plug poi possono essere sospesi cellule o fattori pro- o anti-angiogenici.⁶¹ Ad una temperatura di +4 °C, al Matrigel può essere aggiunta eparina con le sostanze di cui testare le proprietà angiogeniche, viene quindi inoculato sottocute e, a temperatura corporea, forma un plug gelatinoso e compatto. Dopo un adeguato periodo di tempo si può quantificare la neoangiogenesi verificando marker specifici delle EC su microsezioni di matrice oppure tramite microscopia a fluorescenza, oppure misurando il contenuto di emoglobina (Hb). Per eseguire quest'ultimo test è possibile utilizzare il kit Drabkin's Reagent (Sigma Aldrich), saggio colorimetrico utilizzato per determinare quantitativamente l'emoglobina nel sangue intero. Il kit permette di ossidare Hb e suoi derivati a metaemoglobina (metaHb) in presenza di ferricianuro di potassio, composto alcalino. Le reazioni di metaHb con questo composto porta alla formazione di cianometabHb, con un massimo di assorbimento a 540 nm. L'assorbimento risulta essere proporzionale al contenuto di Hb. Per ogni animale (Topi C57 Black), sono stati quindi usati 500 µL di Matrigel, utilizzando strumenti precedentemente preraffreddati a -20 °C. Al Matrigel è stata aggiunta eparina Vister 12 U.I./plug, S100B a diverse concentrazioni (0,01, 0,1, 100 nM) oppure FGF-2 200 ng/mL (Sigma Aldrich). I topi sono stati anestetizzati con anestesia gassosa ed è stata eseguita la somministrazione sottocutanea di Matrigel. Sono stati allestiti anche dei controlli negativi (topi trattati solo con Matrigel ed eparina) e dei controlli positivi (topi trattati con Matrigel e FGF-2). A 7 giorni dall'iniezione i topi sono stati sacrificati attraverso inalazione di CO₂ e i plug sono stati rimossi e conservati con PBS + 0,1% Brij-35 una notte a +4 °C. Il giorno successivo, sono stati centrifugati per 5 min a

13500 rpm e tramite Drabkin's Reagent è stato determinato il contenuto di Hb nel surnatante. È stata costituita una retta di taratura utilizzando una soluzione madre di Hb con concentrazione 10 mg/mL in Drabkin's Reagent, da cui sono stati ricavati 7 standard di cianometemoglobina a concentrazioni note (0,25, 0,5, 1, 2, 4, 8, 10, mg/mL). L'assorbanza degli standard è stata letta a 540 nm. Dalla retta di taratura così ottenuta sono state determinate le concentrazioni dei campioni (mg/mL), espressi come media di almeno 3 animali.

1.3.8. Analisi statistica

I dati sono stati espressi come media \pm deviazione standard di almeno tre esperimenti. La significatività statistica tra diversi gruppi è stata determinata usando l'analisi della varianza ad una coda (ANOVA) seguita dal test t di Student.

1.4. RISULTATI E DISCUSSIONE

Il processo angiogenico coinvolge molti attori ed è il frutto di un equilibrio tra differenti popolazioni cellulari e diversi fattori regolatori pro- e anti- angiogenici;⁶⁰ tra questi, i risultati raccolti in questa tesi suggeriscono si possa inserire S100B, che sembra avere una attività nella regolazione endogena del processo angiogenico tramite una attivazione diretta del comparto endoteliale. Il ruolo della proteina è stato valutato in più tappe del processo di formazione di nuovi vasi, in particolar modo nella fase proliferativa e nelle successive fasi migratoria e differenziativa (Figura 1.1).

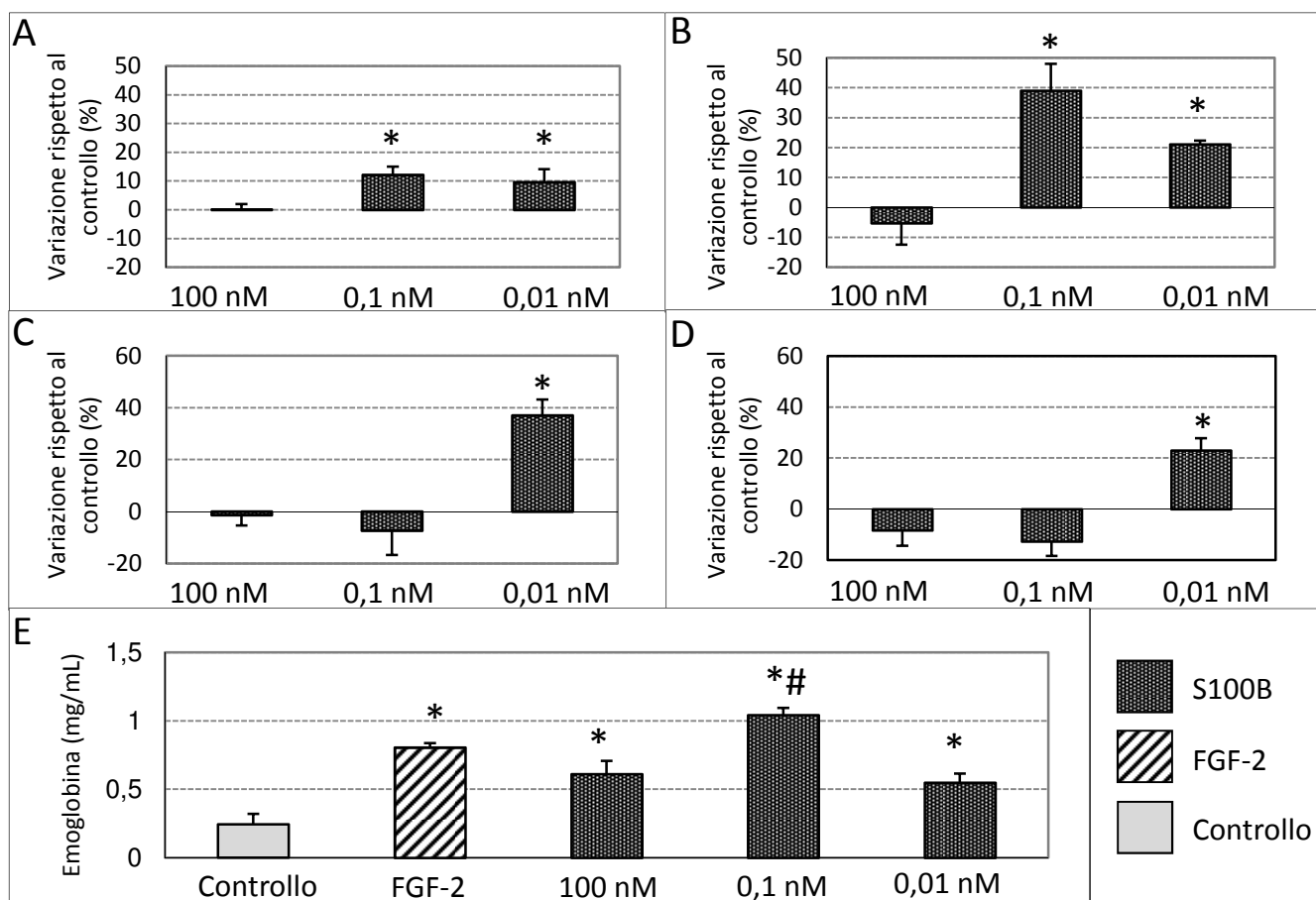


Figura 1.1. Effetti di S100B su vitalità cellulare (A), migrazione (B) e morfogenesi (C e D) espressa come numero di maglie formate dalle cellule (C) e area delimitata dalle strutture capillaro-simili (D). Concentrazione di emoglobina nei plug di matrigel trattati con FGF-2 o S100B (E). I risultati, media \pm deviazione standard di 3 esperimenti separati, sono espressi come variazione percentuale rispetto al controllo non trattato. * $p < 0,05$ vs Controllo

non trattato, # $p < 0,05$ vs FGF-2, test t di Student.

L'effetto proliferativo di S100B è stato testato utilizzando concentrazioni crescenti di proteina: 0,01 nM, 0,1 nM e 100 nM. Il saggio di proliferazione eseguito con MTT (Fig. 1.1 A) e il saggio di migrazione (Fig 1.1 B) hanno messo in luce un aumento significativo della vitalità cellulare in presenza di 0,1 e 0,01 nM S100B rispetto al controllo non trattato. A conferma delle evidenze sperimentali del gruppo di Sorci,⁶² la concentrazione più elevata di proteina non induceva un aumento di proliferazione cellulare. S100B aumentava in modo significativo anche la migrazione cellulare, effetto già evidenziato *in vitro* in cellule gliali⁶³ e astrociti,⁶⁴ cellule tumorali di adenocarcinoma polmonare⁶⁵ e di melanoma,⁶⁶ con meccanismi mediati dal legame con il recettore RAGE. La capacità di induzione della fase differenziativa, tappa successiva nel processo angiogenico, è stata valutata utilizzando le medesime concentrazioni di S100B, contando il numero di maglie chiuse (Fig 1.1 C) e l'area da esse delimitata (Fig 1.1 D). I risultati ottenuti hanno messo in luce un incremento significativo di entrambi i parametri unicamente in presenza di S100B 0,01 nM, facendo ipotizzare un limitato coinvolgimento della proteina in questa fase. La proteina esercitava effetti pro-angiogenici anche *in vivo*. Infatti, tutte le concentrazioni di S100B inducevano un significativo aumento di emoglobina rispetto al controllo, e, nel caso di 0,1 nM S100B, anche rispetto al trattamento con FGF-2 (Fig. 1.1 E). I risultati ottenuti unitamente alle note capacità chemoattrattive della proteina nei confronti delle popolazioni leucocitarie, all'induzione della produzione di ROS e di citochine proinfiammatorie³⁰ delineano un possibile ruolo di S100B nelle patologie infiammatorie che coinvolgono il comparto vascolare.

Per valutare se gli effetti pro-angiogenici di S100B fossero mediati dall'interazione con RAGE, il recettore è stato silenziato tramite un sistema transfettante non virale, di natura lipidica cationica. Dopo trattamento per 24 e 48 ore, l'analisi tramite Western Blot ha dimostrato la presenza di RAGE come dimero glicosilato (110 kDa) e non (95 kDa) nelle colture di controllo, mentre nelle colture trasfettate, dopo 24 h di incubazione, si notava un'unica blanda banda a 110 kDa, non presente a 48 e 72 ore. L'efficacia della procedura e la specificità della trasfezione è stata

dimostrata dall'espressione del gene housekeeping GAPDH in tutti i campioni ad esclusione di quello trattato con siRNA-GAPDH (Fig. 1.2). Le HUVEC trasfettate presentavano morfologia e capacità proliferativa paragonabili alle cellule non silenziate (dati non mostrati).

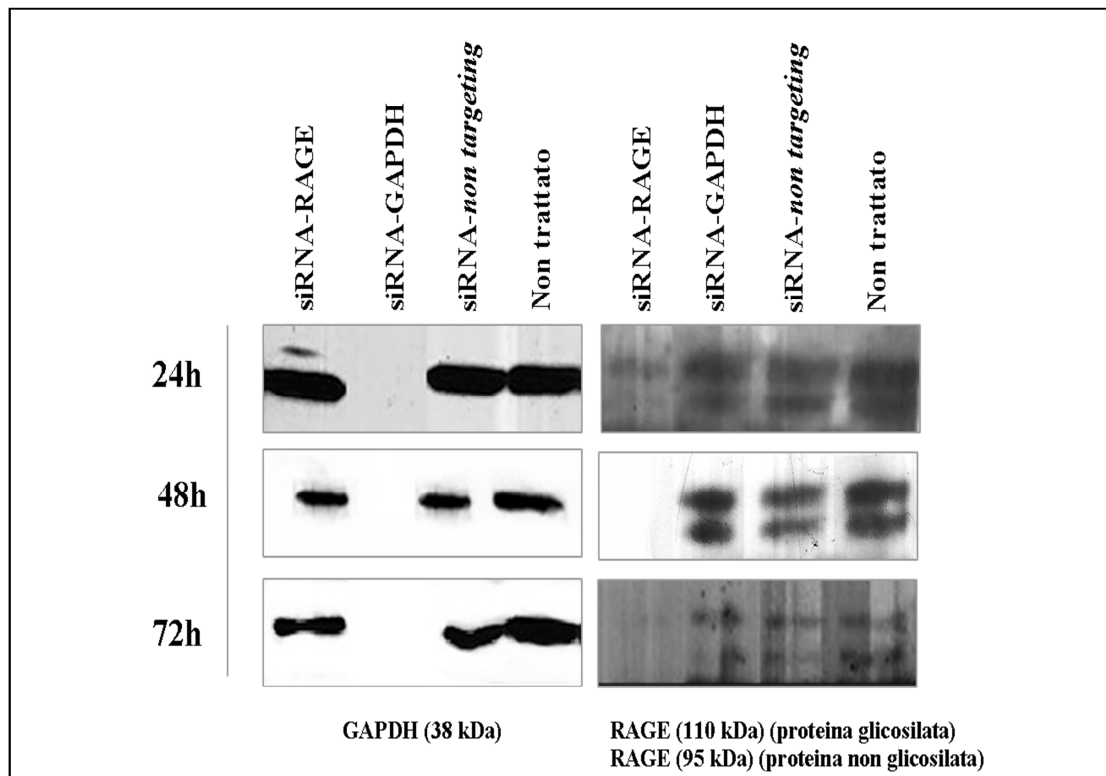


Figura 1.2. Valutazione tramite Western Blot dell'espressione di RAGE a seguito di silenziamento del recettore. Le cellule HUVEC silenziate sono state paragonate a cellule non trasfettate utilizzate come controllo non trattato. La corsa è stata eseguita su gel di poliaccrilammide utilizzando l'anticorpo rabbit anti-human RAGE (1:500).

Sulla base dei risultati ottenuti, le cellule sono state trattate con siRNA e agente transfettante per 48 ore e incubate poi con 0,1 e 0,01 nM S100B, concentrazioni dimostratesi più efficaci nei saggi *in vitro* sopra riportati. I dati raccolti suggeriscono che gli effetti della proteina siano dipendenti da RAGE. Il silenziamento del recettore infatti inibiva la stimolazione della proliferazione (Figura 1.3 A) e della migrazione (figura 1.3 B) indotte da S100B in concentrazione pari a 0,1 nM, ma non a 0,01 nM. Tuttavia, l'induzione della morfogenesi da parte di quest'ultima concentrazione veniva quasi completamente annullata dal trattamento con siRNA-RAGE (Figura 1.3 C e 1.3 D).

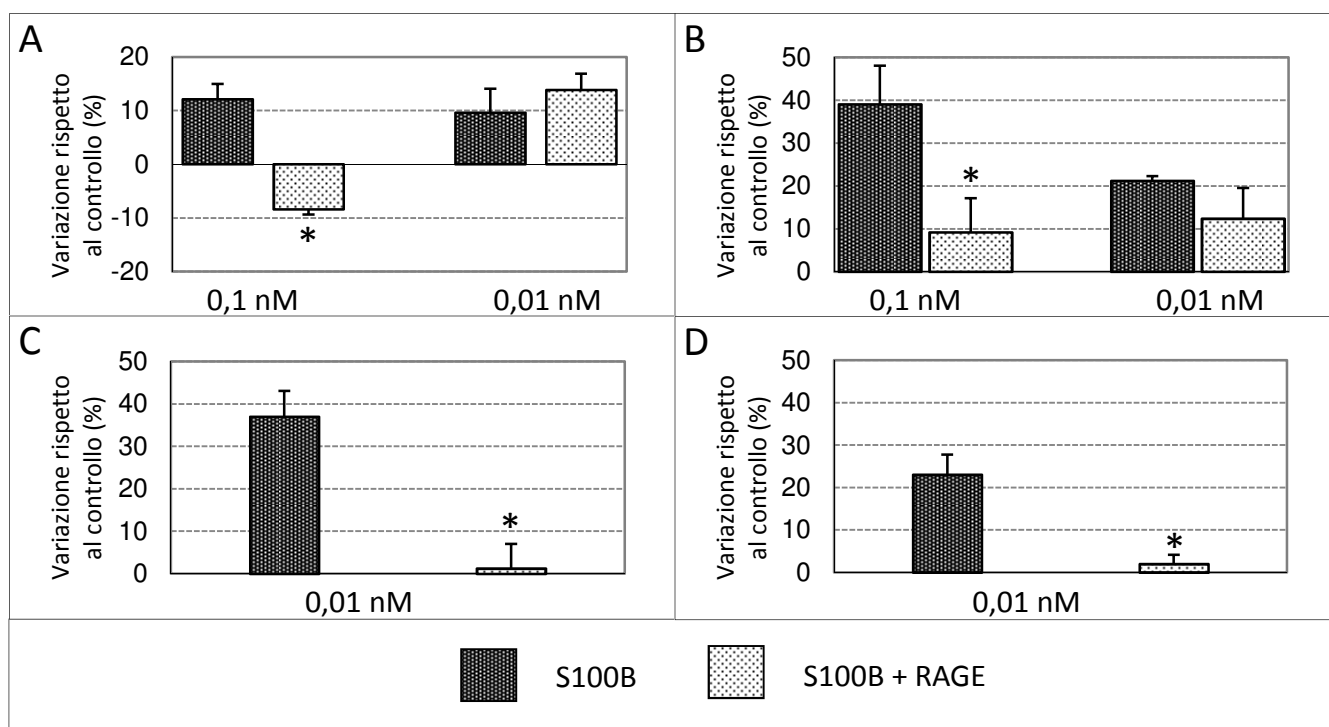


Figura 1.3. Effetti di S100B prima e dopo il silenziamento di RAGE su vitalità cellulare (A), migrazione (B) e morfogenesi (C e D) espressa come numero di maglie formate dalle cellule (C) e area delimitata dalle strutture capillaro-simili (D). I risultati, media \pm deviazione standard di 3 esperimenti separati, sono espressi come variazione percentuale rispetto alle colture corrispondenti. * $p < 0,05$ vs colture non silenziate e trattate con S100B, t-test di Student.

L'interazione di S100B con il recettore RAGE porta alla fosforilazione di numerose MAP chinasi, quali p44/42 (ERK1/2), MEK1/2, p38, C-Jun, JNKs e p90RSK. La fosforilazione di ERK1/2 e MEK1/2 è stata dimostrata da Bianchi et al.⁶³ ed è direttamente correlata alla migrazione di cellule della microglia a seguito della stimolazione con S100B, in maniera dipendente da RAGE. È stato dimostrato come la fosforilazione di ERK1/2 sia indispensabile nell'indurre la proliferazione dei precursori endoteliali e l'espressione di VEGF a livello endometriale, con conseguente aumento dell'angiogenesi.⁶⁷

In questa tesi, la via di segnale Ras-MEK-ERK1/2 è stata inibita utilizzando PD980591 ad una concentrazione pari a 7,5 μ M, non citotossica dopo 24 ore di incubazione (dati non mostrati). L'analisi effettuata tramite Western Blot ha evidenziato che l'inibizione di ERK1/2 con PD980591 era efficace unicamente entro le prime 4 ore di incubazione. In figura 1.4,

infatti, si nota come la forma attiva fosforilata (42 e 44 kDa, visualizzabile con una doppia banda) fosse visibile nelle colture trattate con 0,01 nM S100B a tutti i timepoint. Al contrario, non era presente dopo 2 ore di trattamento con S100B e inibitore e a 4 ore si notava una doppia banda di bassa intensità. Dopo 18 e 24 ore, pERK1/2 era di nuovo in forma attiva anche in presenza di inibitore.

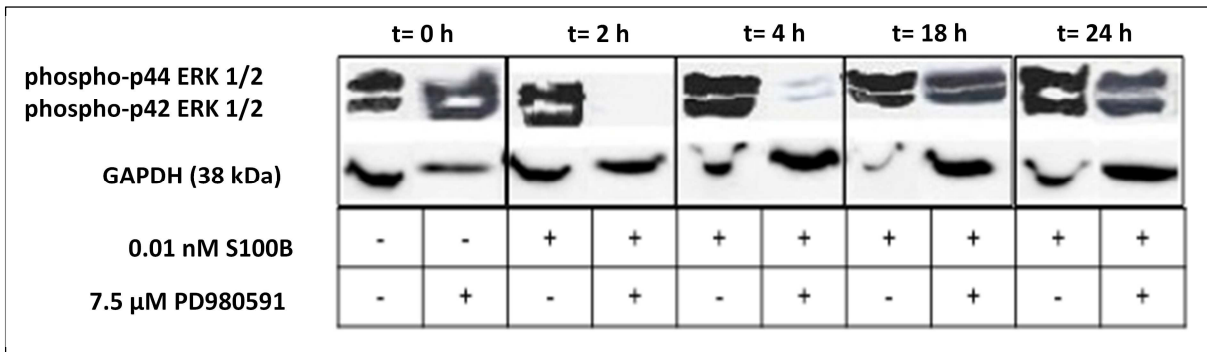


Figura 1.4. Valutazione tramite Western Blot della fosforilazione di ERK1/2 in HUVEC trattate con 7,5 μM PD980591 e 0,01 nM S100B per 0, 2, 4, 18 e 24 ore oppure trattate unicamente con 0,01 nM S100B. La corsa è stata eseguita su gel di poliaccrilammide utilizzando l'anticorpo rabbit anti-human phospho-p44/42 MAPK (ERK1/2, 1:1000).

Sulla base di questi risultati, le colture sono state pretrattate per 1 ora con PD980591 e in seguito incubate in presenza di 0,01 e 0,1 nM S100B e di inibitore. I risultati suggeriscono che gli effetti pro-angiogenici di S100B siano solo parzialmente mediati dall'attivazione di ERK1/2. Infatti, sia il trattamento con S100B e PD980591 che quello con il solo inibitore inducevano significative diminuzioni della proliferazione, migrazione e differenziazione rispetto alle colture trattate con la proteina (Fig. 1.5). Differenze significative tra i due tipi di trattamento sono state osservate nei dati relativi alla migrazione cellulare, con una maggiore capacità inibitoria in presenza contemporanea della proteina e dell'inibitore.

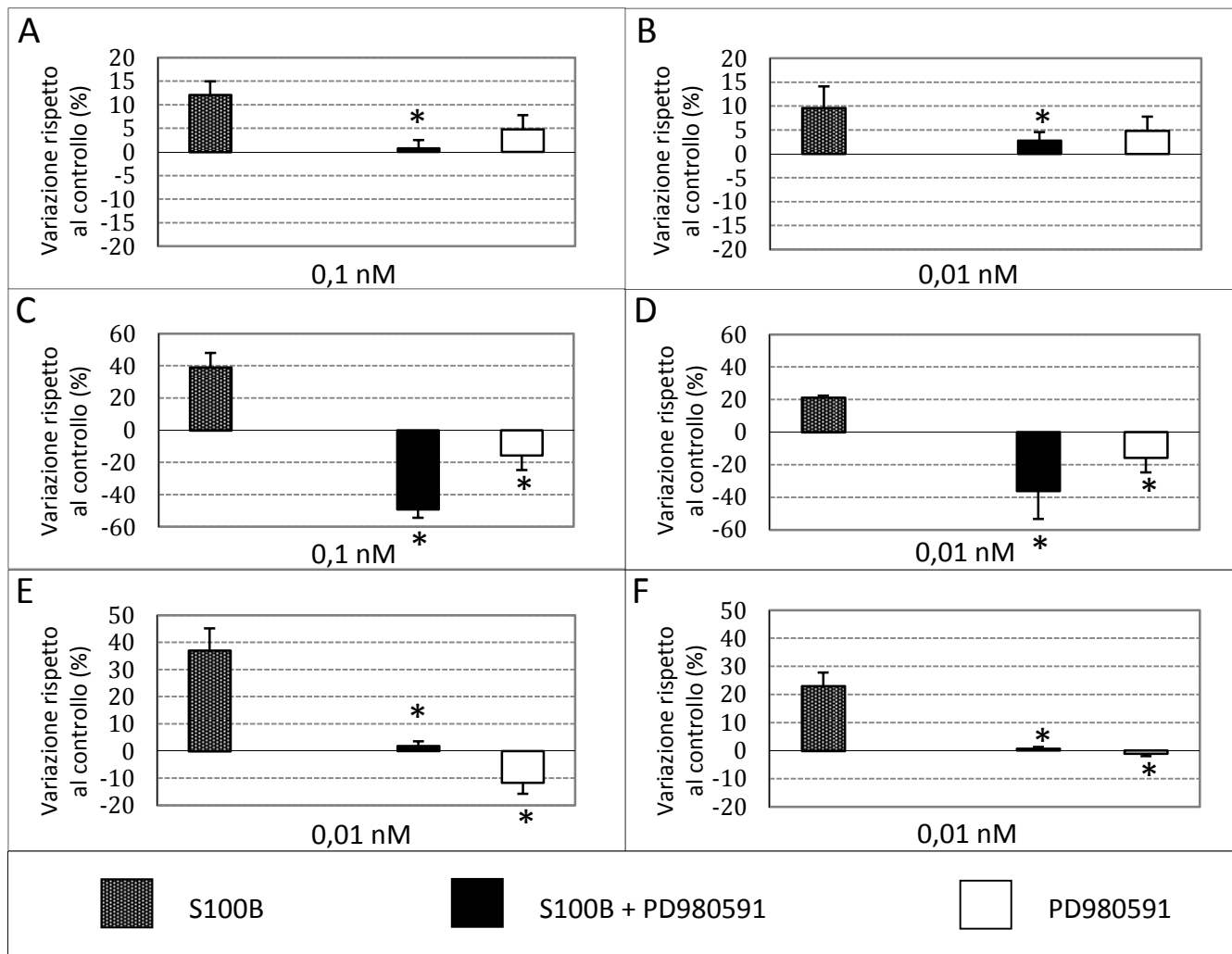


Figura 1.5. Effetti di S100B prima e dopo il trattamento con 7,5 μ M PD 980591 su vitalità cellulare (A e B), migrazione (C e D) e morfogenesi (E e F) espressa come numero di maglie formate dalle cellule (E) e area delimitata dalle strutture capillari-simili (F). I risultati, media \pm deviazione standard di 3 esperimenti separati, sono espressi come variazione percentuale rispetto al controllo. * $p < 0,05$ vs colture trattate con S100B, t-test di Student.

Collettivamente, i dati raccolti evidenziano che:

1. Sia *in vitro* che *in vivo*, la proteina S100B agisce in maniera diretta sulle cellule endoteliali esercitando un effetto pro-angiogenico. L'efficacia della stimolazione con S100B si rende evidente principalmente nei processi di proliferazione e di migrazione cellulare;
2. L'attività angiogenica della proteina appare essere legata all'interazione con RAGE e, in modo parziale, all'attivazione della MAP chinasi ERK1/2.

Ulteriori studi si rendono necessari per poter approfondire *in vivo* l'effetto di S100B, la concentrazione più idonea all'attivazione di RAGE e le vie di segnale coinvolte, in condizioni fisiologiche e patologiche. Il focus, in particolare, potrebbe essere incentrato sul diabete di tipo 2, patologia in cui è stata dimostrata l'attivazione di RAGE da parte di elevate quantità di AGE in presenza di un ambiente fortemente pro-infiammatorio.⁶⁸

CAPITOLO 2

2.1. INTRODUZIONE

2.1.1. Popolazioni mieloidi e attività vascolare

Le popolazioni mieloidi sembra possano avere un ruolo importante nella progressione della malattia diabetica, in particolar modo sulle complicanze correlate al comparto vascolare. L'adesione alla parete dei vasi, l'alterazione della permeabilità vascolare, la risposta infiammatoria cronica data dai macrofagi e lo sbilanciamento della risposta immunitaria sono tutti fattori che concorrono nella patogenesi dell'aterosclerosi. La patologia infatti è presente nel diabete di tipo 2 con frequenza di circa il 90% e l'iperglicemia sembra potenziare la disfunzione endoteliale che alcuni fattori, quali ipertensione e fumo, concorrono a mantenere attivata da citochine proinfiammatorie, LDL ossidate e angiotensina II. Questi stimoli incrementano l'espressione di molecole di adesione sulle stesse EC, aumentando l'adesione e la migrazione dei monociti nell'intima. Una volta attraversata la barriera endoteliale, i monociti differenziano in macrofagi, che a loro volta potenziano la risposta infiammatoria cronica rilasciando numerosi mediatori proinfiammatori (citochine, quali TNF- α , IL-12p70 e specie attivate dell'ossigeno) e chemochine per monociti e cellule T. I macrofagi inglobando colesterolo si trasformano in cellule schiumose, che formano placche aterosclerotiche ostruenti le arterie. La popolazione costituita da monociti/macrofagi orchestra la destabilizzazione della placca che si presenta instabile e può peggiorare la cascata coagulativa con trombizzazione a distanza.⁶⁹

È stato dimostrato, in pazienti diabetici, come questo meccanismo sia amplificato e l'espressione di citochine pro-infiammatorie in questa categoria di cellule mieloidi, in particolar modo TNF- α e IL-8, sia più elevata, con aumentata tras migrazione di monociti/macrofagi attraverso la barriera vascolare.⁵

a) Monociti

I monociti sono la categoria di cellule mieloidi circolanti più conosciuta. Sono presenti in una percentuale compresa tra il 4 e il 10% dei globuli bianchi totali nel sangue periferico, dove circolano per circa due giorni prima di migrare a livello tissutale. Possono essere suddivisi in tre differenti categorie, usando due marcatori di superficie espressi sulla loro membrana cellulare, CD14 e CD16. CD14 è un recettore ancorato al glicofosfatidilinositolo di membrana presente sulla superficie di monociti, macrofagi e cellule dendritiche e viene considerato come un recettore sentinella nella risposta immunitaria. Riconosce alcune porzioni batteriche, tra cui il Lipopolisaccaride (LPS), funzionando come PRR (Pattern Recognition Receptor) nei confronti di alcuni componenti del microorganismo infettante denominati PAMPs (Pathogen Associated Molecular Patterns). Insieme al complesso TLR4-MD-2 (Toll-Like Receptor 4), CD14 sembra essere in grado di regolare il metabolismo attraverso la modulazione della lipogenesi, dell'infiammazione del tessuto adiposo e della resistenza all'insulina.⁷⁰

CD16 (Fc γ R type III) lega la porzione costante (Fc) delle immunoglobuline di tipo G (IgG) e può essere espresso a diversi livelli nella popolazione monocitaria.

Utilizzando questi due marcatori superficiali è quindi possibile identificare tre distinti subset monocitari: i monociti "classici" CD14⁺⁺CD16⁻, i monociti "non-classici" CD14⁺CD16⁺⁺ e i monociti "intermedi" CD14⁺⁺CD16⁺.⁷¹

Tra queste categorie, i monociti non classici svolgono un ruolo attivo nei meccanismi di formazione del tessuto di granulazione, esprimono quindi un potenziale rigenerativo sia per la loro somiglianza alla popolazione macrofagica, sia per la capacità di differenziarsi nei macrofagi M2, attivamente coinvolti nei processi di modellamento e riparazione tissutale, attraverso la secrezione attiva di citochine, in particolar modo Interleuchina-10 (IL-10).⁶⁹

b) Cellule dendritiche (DC)

Tra le cellule mieloidi coinvolte nella risposta immunitaria si possono annoverare anche le cellule dendritiche. Questa popolazione origina a livello del midollo osseo da un precursore comune anche a monociti e macrofagi e migra attraverso il circolo sanguigno a livello tissutale, dove

va incontro a maturazione e attivazione. In periferia, le DC svolgono il loro ruolo di APC (Antigen Presenting Cells) riconoscendo i patogeni e processando gli antigeni per renderli visibili ai linfociti T e innescare la risposta immunitaria cellulo-mediata. Le DC circolanti sono considerate una forma immatura, che viene attivata nel tessuto dal contatto diretto con il patogeno. Sono dotate infatti di un complesso sistema di TLR, lectine e PRR per poter provvedere all'uptake, al trasporto e alla presentazione efficace di un ampio spettro di antigeni, sia di origine batterica che virale. Tutte le DC umane esprimono ad alti livelli il complesso maggiore di istocompatibilità di tipo II (HLA-DR) e non esprimono i marcatori specifici di alcune linee cellulari note, tra cui CD3 (espresso dalle cellule T), CD19 e CD20 (linfociti B), CD56 (cellule Natural Killer). Possono quindi essere definite come cellule HLA-DR+Lineage-.

La popolazione può essere suddivisa in 3 categorie:

- Cellule dendritiche mieloidi (mDC): esprimono i marcatori tipici della linea mieloide, quali CD33, CD11c, CD13. Possono essere ulteriormente suddivise in mDC1, che esprimono CD1c, deputate all'attivazione delle cellule T CD4+ e mDC2, che generalmente sono meno numerose e attivano preferenzialmente le cellule T CD8+.
- Cellule dendritiche plasmacitoidi (pDC): possono essere identificate dalla presenza dei marcatori CD123, CD303 e CD304. Si trovano generalmente nei tessuti linfoidei e sono deputate al riconoscimento e alla presentazione di antigeni virali. Rilasciano grandi quantità di Interferone di tipo 1. Di recente sono state identificate come popolazione coinvolta nei meccanismi infiammatori a carico della cute⁷² e nei processi di risoluzione di lesioni tissutali, in cui le pDC sembrano attivare una risposta immunitaria che favorisce il processo di rigenerazione cutanea.⁷³
- Cellule dendritiche che esprimono CD14: sono molto simili nella struttura e nella funzione a macrofagi e monociti, da cui possono avere origine.

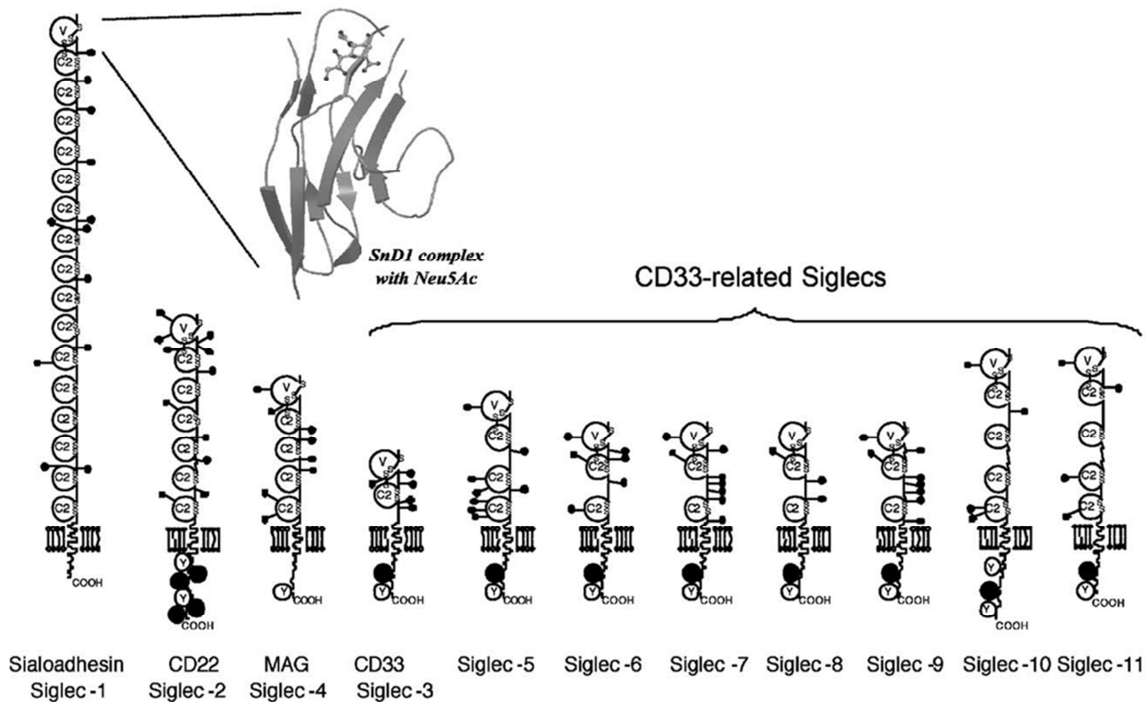
Una volta attivate, le DC circolanti esprimono i marcatori di attivazione CD80, CD83, CD86 e CD40.⁷⁴

2.1.2. Il marcatore CD33

Un marker superficiale espresso a diversi gradi di intensità su quasi tutte le

cellule della linea mieloide è CD33. È una proteina transmembrana di 67 kDa, codificata dal gene 19, che può essere annoverata tra le proteine appartenenti alla famiglia dei SIGLEC (Sialic-acid-binding ImmunoGlobulin-like LECTins). La loro struttura, simile a quella delle immunoglobuline, si compone di un dominio variabile V-set aminoterminale e numerosi domini costanti C2-set. Nell'uomo sono stati identificati 14 differenti Siglec, appartenenti a due diverse famiglie: nella prima rientrano Sialoadesina, CD22, MAG e Siglec 15, nella seconda rientrano invece i cosiddetti CD33-related Siglec, simili per struttura e funzione a CD33.⁷⁵

Questi ultimi si contraddistinguono per la presenza di uno o più ITIM (Immunoreceptor Tyrosine based Inhibitory Motifs), strutture che legano i glicani sialilati presenti su glicoproteine e glicolipidi di cellule infiammatorie e patogeni con funzione inibitoria. La presenza di questi domini inibitori non si riscontra invece nel modello murino, in cui sono presenti solo 5 Siglec non contenenti ITIM.⁷⁶



Struttura delle proteine appartenenti alla famiglia dei Siglec

La principale funzione di CD33 si esplica nella regolazione della risposta infiammatoria e immunitaria mediata dai leucociti. Il controllo esercitato dai Siglec è molto sottile e preciso, possono essere infatti presenti più

molecole sulla stessa cellula, attivate in maniera differente. Generalmente si trovano sulla superficie cellulare in uno stato "mascherato" poiché legati ad acidi sialici propri della cellula in conformazione cis. In questa particolare conformazione CD33 esercita un'attività di tipo inibitorio che previene il signaling delle citochine e l'attivazione monocitaria. In presenza di patogeno invece CD33 si lega agli acidi sialici del microorganismo in conformazione trans, antagonizzando l'azione inibitoria degli ITIM e favorendo la produzione di citochine proinfiammatorie da parte dei monociti.⁷⁷

In ambiente infiammatorio, PAMPs e citochine inducono l'espressione di SOCS3 (Suppressor of cytokine signaling 3), che si lega agli ITIM fosforilati di CD33. L'evento provoca una degradazione proteasomiale sia di CD33 che di SOCS3, interrompendo il segnale inibitorio dato dal Siglec. e potenziando la risposta infiammatoria stessa.⁷⁸

CD33 è inoltre strettamente connesso a CD14: insieme a TLR4 e MD-2 costituiscono, sulla superficie dei monociti, il recettore per LPS (Lipopolisaccaride, componente della membrana di batteri Gram negativi). TLR4 appartiene alla famiglia dei toll-like receptors, molecole essenziali nella risposta all'infezione perché in grado di innescare l'immunità innata, MD-2 è invece una porzione indispensabile nel mediare il riconoscimento e il legame di LPS da parte di TLR4. Una volta avvenuto il legame LPS-CD14, sembra che LPS venga presentato a TLR4, attivando la cascata di segnale di NF-κB e la conseguente produzione di citochine proinfiammatorie. CD33 quindi potrebbe essere attivamente coinvolto nella modulazione della risposta infiammatoria indotta da TLR4.⁷⁹

Insieme, CD33 e CD14 possono rappresentare due marker utili per identificare diverse sottopopolazioni cellulari mieloidi:

- CD33+CD14+ monociti classici
- CD33dimCD14dimCD16+ monociti non classici
- CD33+CD14dim cellule dendritiche immature
- CD33+CD14- cellule dendritiche.

CD33, infatti, viene considerato anche come marcatore di immaturità per le APC circolanti non completamente differenziate e non attivate, che però esprimono HLA-DR.⁸⁰

La presenza di CD33 è stata inoltre evidenziata ad alti livelli su mDC1 e

mDC2, al punto da poter essere utilizzato come marcatore sostitutivo di CD11c per poter riconoscere le cellule dendritiche mieloidi.⁸¹

Come dimostrato da Bueno et al, la presenza di CD33 può essere un indicatore per la capacità delle DC di produrre citochine pro-infiammatorie: le DC CD33dim/neg infatti sembrano produrre minime quantità di citochine pro-infiammatorie, le DC CD33high invece ne producono quantità più elevate, in particolar modo in risposta a LPS.⁸²

2.1.3. CD33 come marcatore di patologia

L'espressione di CD33 e le sue variazioni sono state messe in evidenza in diverse patologie, in particolar modo nella leucemia mieloide acuta. È stato dimostrato infatti che CD33 si trova sulla superficie di circa il 90% dei mieloblasti, ma non sulle cellule staminali ematopoietiche multipotenti, candidandolo come un target efficace per il trattamento della malattia con effetti collaterali ridotti. È stato quindi utilizzato come bersaglio per un farmaco antitumorale, Mylotarg, in cui è stato coniugato un farmaco citotossico ad un anticorpo anti-CD33. Una volta avvenuto il legame anticorpo-CD33, il complesso viene internalizzato per endocitosi, consentendo il rilascio del farmaco Gemtuzumab a livello intracellulare, dove esercita il suo effetto tossico a livello del DNA.⁸³

Il farmaco, potenzialmente innovativo, è stato però ritirato dal mercato per gravi effetti collaterali a livello vascolare, facendo ipotizzare un ruolo di CD33 non ascrivibile solo alla popolazione blastica.

Il link tra CD33 e patologie tumorali è stato anche messo in luce in una popolazione cellulare particolare, le MDSC, Myeloid Derived Suppressor Cells. Questa popolazione è infatti caratterizzata da cellule mieloidi con fenotipo LIN-CD33+HLA-DRdim/neg, che possono esprimere anche CD11b, e che sono coinvolte nella risposta immunitaria. Sebbene siano rare o assenti in individui sani, le MDSCs sembrano accumularsi in situazioni quali cancro, trauma, infezioni severe e sepsi. Favoriscono infatti un comportamento di tipo tolerogenico nei confronti di tumore ovarico, renale, al colon-retto e diversi altri tipi di tumori solidi.⁸⁴

In questi tipi di tumori le MDSC sono maggiormente espresse, vengono indotte dalle cellule tumorali stesse attraverso la secrezione di citochine e induzione di fattori di trascrizione (HIF-1a e STAT3 per esempio) e causano

immunosoppressione e alterazione della funzione delle cellule T effettrici. L'inibizione della funzionalità linfocitaria può avvenire tramite molteplici meccanismi, tra cui la deplezione di L-arginina mediata dall'enzima Arginasi-1, la produzione di specie reattive di ossigeno e azoto da parte degli enzimi ossido nitrico sintetasi inducibile (iNOS) e di NADPH Ossidasi (NOX2), l'overespressione di VEGF, la deplezione di cisteina e l'espansione della popolazione T-regolatoria. La presenza di elevate concentrazioni sieriche di citochine proinfiammatorie quali TNF- α , IL-6 e IL-1 β sembrano poi favorire la formazione di queste cellule.

Il ruolo di questa classe di cellule mieloidi è quindi duplice: in presenza di tumore si rivelano dannose perchè favoriscono la sopravvivenza e la propagazione di cellule neoplastiche, a seguito di trapianto invece sono indispensabili per limitare i fenomeni di rigetto e i meccanismi autoimmuni.

Tra le patologie a carattere autoimmune è stato studiato anche il diabete di tipo 1, i risultati suggeriscono che T1DM sia associato ad un incremento nel numero di MDSCs, ma che questa popolazione non sia pienamente funzionale nella sua capacità soppressiva nei confronti dei linfociti T, favorendo la progressione della malattia.⁸⁵

È stato evidenziato anche un legame tra CD33 e malattia di Alzheimer: l'espressione di CD33 a livello centrale sulla microglia sembra essere più elevato in pazienti che presentano la patologia. CD33 sembra inoltre essere associato ad una inibizione, a livello della microglia, dell'uptake di β -amiloide favorendo l'inasprimento della patologia.⁸⁶

È stato inoltre dimostrata la presenza di un polimorfismo del gene per CD33 correlato con uno ridotto rischio di insorgenza della malattia.⁸⁷

A livello osseo, la presenza di CD33 ha permesso di caratterizzare un fenotipo particolare di cellule multinucleate simili agli osteoclasti CD33+CD14-, riscontrabili nel tumore osseo a cellule giganti. È stato ipotizzato un suo coinvolgimento nell'innescare la fusione cellulare in questo tipo di patologia, caratterizzata da una marcata e dannosa osteoclastogenesi.⁸⁸

2.1.4. CD33 e diabete

La presenza di CD33 è stata valutata in pazienti diabetici, in particolar

modo sulla superficie di monociti esposti a diverse condizioni di coltura, dal gruppo di Gonzalez et al.⁸⁹

In questo studio *in vivo* è stata evidenziata una minor espressione del marcatore su monociti CD14+ di pazienti diabetici non complicati rispetto a controlli sani. Il gruppo di pazienti con T2DM presentava elevato scompenso glicemico, ma nessuna complicanza né di tipo vascolare né di tipo neuropatico. Il gruppo ha poi mimato le condizioni di iperglicemia *in vitro* utilizzando diverse concentrazioni di glucosio nel terreno. I risultati hanno evidenziato un calo nell'espressione di CD33 in coltura e un corrispettivo incremento nella produzione di citochine proinfiammatorie, in particolar modo TNF- α , in terreno ad elevate concentrazioni di glucosio (50 mM), facendo ipotizzare che una deregolazione dell'espressione di CD33 dovuta all'iperproduzione di ROS possa amplificare la risposta infiammatoria.

Un ulteriore studio condotto su monociti di pazienti diabetici con lesione agli arti inferiori e senza lesioni ha messo in luce un aumento di cellule CD33+ nei pazienti con ulcera o lesione di difficile guarigione se comparati ai pazienti con T2DM senza complicanze.⁹⁰

Complessivamente, la letteratura a disposizione sul legame tra CD33 e T2DM risulta essere contrastante e non esaustiva, richiede perciò ulteriori approfondimenti per delineare con maggior precisione il possibile link tra marcatore e patologia.

2.2. SCOPO DELLA TESI

Il midollo osseo è il luogo prevalente in cui avviene la maturazione delle cellule staminali, sia di tipo endoteliale che di tipo mieloide. L'ambiente iperglicemico, come dimostrato in precedenza, ha un impatto negativo sulla maturazione e mobilizzazione in circolo dei precursori endoteliali, non è ancora chiaro però il ruolo dell'iperglicemia a livello sia midollare che periferico sulle popolazioni della linea mieloide in presenza di ischemia.

Per approfondire la tematica, in questo lavoro di tesi è stata esaminata una classe di cellule mieloidi di origine midollare caratterizzate dal marcatore CD33

- valutando l'espressione di CD33 *in vivo* in campioni di pazienti diabetici con o senza complicanze di tipo neuropatico e vascolare;

- mimando *in vitro* l'ambiente iperglicemico su cellule mononucleate di controlli sani e pazienti diabetici con ischemia per evidenziare la popolazione cellulare mieloide maggiormente influenzata dalla condizione iperglicemica e dalla presenza di lesioni agli arti inferiori.

2.3. MATERIALI E METODI

2.3.1. Selezione dei pazienti

I pazienti con T2DM sono stati reclutati nell'unità operativa complessa di Malattie endocrine, del ricambio e della nutrizione dell'ospedale Ca' Foncello di Treviso, rispettando i seguenti criteri di esclusione: fumo, dialisi, stato di gravidanza, insufficienza cardiaca grave, infarto miocardico recente (entro 6 mesi), ictus, età superiore a 75 anni. Il sesso maschile è risultato prevalente. Una volta reclutati, i pazienti sono stati suddivisi nei seguenti gruppi:

1. Pazienti diabetici senza complicanze (D, n=20)
2. Pazienti diabetici con neuropatia periferica (N, n=20)
3. Pazienti diabetici con neuropatia periferica e lesioni ai piedi (ulcera o osteomielite) (N1, n=20)
4. Pazienti diabetici con neuromacroangiopatia periferica e lesioni ai piedi (ulcera o osteomielite) (NV, n=20).

I pazienti diabetici sono stati sottoposti a controllo della glicemia con apposita dieta oppure con l'utilizzo di terapie ipoglicemizzanti e/o iniezioni di insulina. I pazienti del gruppo NV sono stati sottoposti ad angioplastica percutanea o by-pass femoro-popliteo a seguito di diagnosi di ischemia critica agli arti inferiori per garantire il corretto flusso sanguigno in periferia. In presenza di dislipidemia o ipertensione arteriosa, molto frequenti in tutti i gruppi di pazienti diabetici, i soggetti sono stati trattati con apposita terapia farmacologica.

Come popolazione di confronto sono stati reclutati 20 controlli sani (C).

2.3.2. Valutazione dei parametri clinici

I campioni di sangue periferico su cui sono stati eseguiti i test di laboratorio sono stati raccolti a digiuno. La formula leucocitaria è stata calcolata tramite emocitometro ADVIA 2120I (Siemens, Munchen, Germany), il valore di glicemia è stato determinato utilizzando la reazione

dell'enzima glucosio ossidasi (Beckman, Fullerton, CA, USA), la quantificazione dell'emoglobina glicata (il cui valore normale più elevato si attesta a 40 mmol/mol) è stata eseguita con cromatografia liquida ad alta pressione (HPLC, CR4A Bio-Rad, Italy) da sangue capillare.⁹¹ Colesterolo totale, HDL, LDL e Trigliceridi sono stati determinati con metodo enzimatico. Il valore di ossimetria, rappresentato come pressione transcutanea dell'ossigeno (TcPO₂) all'alluce, è stato misurato con lo strumento 4 chambers oximetry/laser-Doppler PERIMED V 5400. Il valore soglia per la determinazione di ischemia critica è stato fissato a 30 mmHg.⁹²

2.3.3. Colture cellulari

Dodici mL di sangue periferico sono stati raccolti in provette sterili vacutainer contenenti EDTA come anticoagulante (BD). Le cellule mononucleate (PBMC) sono state isolate attraverso centrifugazione a favore di gradiente utilizzando Ficoll Hypaque, (Sigma Aldrich). Il sangue intero è stato diluito 1:2 con PBS 1X ed è stato stratificato lentamente su una parte di Ficoll, per garantire la separazione tra le due fasi. Il tubo è stato quindi centrifugato a 1500 rpm per 30 min senza freno, per ottenere la separazione delle popolazioni leucocitarie: globuli rossi e granulociti nello strato inferiore, cellule mononucleate all'interfaccia e plasma nello strato superiore. L'anello di PBMC è stato raccolto e sottoposto ad un lavaggio con PBS 1X. Le cellule sono state quindi state contate con Trypan blue (Sigma Aldrich,) per verificare la vitalità cellulare e seminate in piastre da 6 pozzetti ad una densità di $1,5 \times 10^6$ cellule/pozzetto. Il terreno base utilizzato era composto da RPMI 1640 (Invivogen, San Diego, CA, USA) contenente il 10% di FBS (Fetal Bovine Serum, Invivogen), 1% glutamina (Sigma Aldrich), 1% penicillina/streptomina/amfotericina (Sigma Aldrich), a cui veniva addizionato Glucosio (B.Braun Melsungen AG, Melsungen, Germany) 10mM o 30 mM. Le cellule sono state coltivate in atmosfera umida a +37°C addizionata di 5% CO₂, sostituendo il terreno ogni 2 giorni. A 24h e 5 giorni di coltura le cellule sono state staccate e contate con Trypan Blue. L'espressione di CD33, dei marker monocitari CD14, CD16 e CD45 e dei marcatori dendritici Lineage cocktail, HLA-DR, CD11c e CD123 sono stati valutati tramite citofluorimetria a t=0, t=24h e

t=5 giorni di coltura.

2.3.4. Determinazione plasmatica di Interleuchina-10

I campioni di plasma dei pazienti valutati e dei controlli sani sono stati raccolti il giorno del prelievo e conservati a -80°C . La misurazione della concentrazione plasmatica di IL-10 è stata effettuata tramite Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA) kit (Raybiotech, Norcross, GA, USA) seguendo le istruzioni fornite dal produttore. L'assorbanza a 450 nm è stata letta tramite spettrofotometro ELx800 Microplate Absorbance Reader (Bio Tek Instruments) e analizzata con il software Gen5 (Bio Tek Instruments). I valori di concentrazione sono stati espressi come pg/mL, ottenuti tramite l'utilizzo di una apposita retta di taratura come indicato dal kit. La retta di taratura è stata preparata riportando in ascissa del sistema grafico le concentrazioni degli standard e in ordinata le relative assorbanze. Mediante analisi di regressione lineare, è stata calcolata l'equazione della retta per estrapolare le concentrazioni proteiche (pg/mL) dei singoli campioni.

2.3.5. Analisi citofluorimetrica

L'espressione degli antigeni di superficie è stata analizzata sulle cellule del sangue attraverso citofluorimetria diretta. Prima della marcatura con anticorpi, i globuli rossi sono stati lisati con BD PharM Lyse 10X Concentrate (BD) diluito 1:10 con H₂O, le cellule quindi sono trattate con FBS per 10 min per bloccare i siti aspecifici e lavate con PBS contenente 0.5% BSA. Le cellule sono quindi state incubate con gli anticorpi desiderati e i corrispettivi controlli isotipici IgG1 e IgG2 (Biolegend, San Diego, CA, USA) per 20 min al buio. I campioni non marcati sono stati utilizzati come controllo negativo. Un totale di 1×10^7 eventi sono stati acquisiti per ogni analisi utilizzando lo strumento FACS Canto (BD) e le cellule CD33+ sono state espresse come percentuale sulle cellule mononucleate totali e come numero di cellule su mm³.

La valutazione di cellule dendritiche circolanti è stata eseguita utilizzando gli anticorpi Lineage cocktail 1 FITC, anti-HLA-DR V450, anti-

CD11c APC (tutti acquistati dalla ditta BD) e anti-CD123 PE-Cy7 (Biolegend, San Diego, CA, USA). Le DC sono state identificate come HLA+Lin-, le mDC come HLA+Lin-CD11c+ e le pDC come HLA+Lin-CD123+. I dati sono stati processati ed elaborati con il software FACS Diva (BD) seguendo la strategia di gating indicata dal gruppo di Della Bella.⁹³

Una frazione di cellule isolate e messe in coltura è stata analizzata attraverso citofluorimetria. Brevemente, dopo la centrifugazione il pellet cellulare è stato risospeso in PBS contenente BSA 0,5% e marcato con gli anticorpi monoclonali al buio per 20 min. Dopo incubazione, le cellule sono state lavate con PBS+BSA 0,5% per bloccare i siti aspecifici e risospese in un appropriato volume di PBS+BSA. I campioni sono stati quindi acquisiti con lo strumento FACS Canto e elaborati con il software FACS Diva.

I monociti sono stati identificati utilizzando gli anticorpi anti-CD33 PE (Biolegend), Anti-CD14 FITC (Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Germany) anti-CD16 PE-Cy7 (Biolegend) e anti CD45 PerCp-Cy5.5 (Biolegend). Le DC sono state identificate utilizzando anti-CD33 PE (Biolegend), Lineage cocktail 1 FITC, anti-HLA-DR V450, anti-CD11c APC (tutti acquistati dalla ditta BD) e anti-CD123 PE-Cy7 (Biolegend). I controlli isotopici IgG1 e IgG2 sono stati ottenuti dalla ditta Biolegend.

2.3.6. Analisi statistica

I dati sono stati espressi come media \pm deviazione standard. La significatività statistica tra diversi gruppi è stata determinata usando l'analisi della varianza ad una coda (ANOVA) seguita dal test t di Student.

2.4. RISULTATI E DISCUSSIONE

L'insorgenza del diabete di tipo 2 è spesso associata ad alcuni fattori di rischio in particolar modo per il comparto cardiovascolare. Tra questi, è stata evidenziata una correlazione con obesità, ipertensione, ipercolesterolemia e dipendenza dal fumo.⁹⁴

La tabella I riporta le caratteristiche cliniche dei pazienti arruolati nello studio.

	C	D	N	N1	NV
Età (Anni)	44±3	60±7 ***	65±1 *** \$\$\$	61±1 *** ^^^	68±1 *** \$\$\$ ^^^ ###
Indice di massa corporea (BMI) (kg/m ²)	22±1	29±1 ***	31±1 *** \$\$	32±1 *** \$\$\$	31±1 ***
Durata di malattia (Anni)	0±0	6±1 ***	13±1 *** \$\$\$	13±1 *** \$\$\$	16±1 *** \$\$\$ ^ #
Glicemia (mg/dL)	91±3	146±7 ***	160±7 ***	166±8 ***	151±6 ***
HbA1c (mM/mol)	/	57±2	63±2	66±2 \$\$	63±2 \$
Colesterolo totale (mg/dL)	178±7	188±8	172±4	169±5 \$	156±4 \$\$\$ ^^
HDL (mg/dL)	72±7	54±3 **	52±1 ***	50±2 ***	46±2 *** \$ ^^
LDL (mg/dL)	96±7	109±7	92±4 \$	90±4 \$	86±4 \$\$\$
TGC (mg/dL)	80±13	133±12 *	139±12	140±10 *	135±8 *
Creatinina (mg/dL)	0,82±0,01	0,85±0,03	0,93±0,03	1,13±0,12	1,26±0,05 \$\$\$ ^^
TcPO ₂ (mmHg)	79,4±0,4	60,8±5,1 *	52,5±3,42 **	46,5±1,7 *** \$\$	28,1±1,9 *** \$\$\$ ^^^ ###

Tabella I: Caratteristiche demografiche dei gruppi studiati. I diversi gruppi sono così

suddivisi: controlli sani (C=20); pazienti diabetici non complicati (D=20); pazienti diabetici con neuropatia (N=20), pazienti diabetici con neuropatia e lesioni agli arti inferiori (N1=20); pazienti diabetici con lesioni e ischemia agli arti inferiori (NV=20). I dati riportati sono espressi come media \pm SEM. * $p < 0,05$ vs C ** $p < 0,01$ vs C *** $p < 0,005$ vs C; \$ $p < 0,05$ vs D \$\$ $p < 0,01$ vs D \$\$\$ $p < 0,005$ vs D; ^ $p < 0,05$ vs N ^^ $p < 0,01$ vs N ^^^ $p < 0,005$ vs N; # $p < 0,05$ vs N1 ## $p < 0,01$ vs N1 ### $p < 0,005$ vs N1

Complessivamente, i dati raccolti evidenziavano un'età più elevata nei pazienti con T2DM, significativamente più alta negli NV se confrontata con gli altri gruppi esaminati. I pazienti con lesione presentavano inoltre la durata maggiore di malattia. I controlli sani e il gruppo D si contraddistinguevano per un indice di massa corporea inferiore, i pazienti appartenenti alle categorie con neuropatia presentavano invece BMI più elevata ma non significativamente differente. Come atteso, in tutte le categorie di pazienti diabetici la glicemia era significativamente più elevata se confrontata con i valori di controllo, ma uniforme nei pazienti con patologia. Per valutare la glicemia media giornaliera nei tre mesi precedenti il parametro clinico utilizzato a livello internazionale è il valore di emoglobina glicata (HbA1c).⁹⁵ I dati raccolti su questo ristretto campione di pazienti rivelano che i gruppi con neuropatia presentavano valori di HbA1c più elevata rispetto al gruppo D, quasi a suggerire che il controllo della glicemia a lungo termine sia determinante per evitare la progressione della neuropatia.⁹⁶

I valori di colesterolo e LDL si attestavano più elevati nei controlli sani, evento compatibile con la consistente terapia ipocolesterolemizzante somministrata ai pazienti diabetici (dati non mostrati). Facevano eccezione i pazienti D, con valori elevati, in quanto spesso reclutati all'esordio della patologia o non soggetti a trattamento farmacologico con statine o antilipidemiche. Come atteso, i valori di HDL si dimostravano significativamente più elevati nei controlli sani. L'indicatore di funzionalità renale creatinina evidenziava una compromissione maggiore dell'organo nei pazienti NV, che spesso presentavano insufficienza renale cronica con microalbuminuria.⁹⁵

I dati raccolti inoltre evidenziavano un progressivo aumento delle complicanze cardiovascolari e a carico di rene e retina nel passaggio da D a NV, e conseguente maggior complessità di trattamenti farmacologici a cui i soggetti sono sottoposti.

Le linee guida ⁹² individuavano nella ossimetria transcutanea valori indicativi di ischemia critica cronica, complicanza vascolare frequente agli arti inferiori nel diabetico. Nei pazienti diabetici il valore di pressione transcutanea dell'ossigeno (TcPO₂) si attestavano progressivamente e significativamente inferiori rispetto ai controlli sani. Nei pazienti NV, il valore di ossimetria confermava la diagnosi di ischemia risultando inferiore rispetto alle altre categorie in modo significativo.

Complessivamente, la valutazione dei parametri clinici metteva in luce un quadro molto più complicato nei pazienti con lesioni ai piedi, in particolar modo con ischemia. I dati raccolti inoltre confermano che l'aumento dell'indice di massa corporea, la creatinina, la presenza di neuropatia e soprattutto la complicanza vascolare possano essere considerati dei fattori predittivi per la comparsa di lesione ai piedi, o quanto meno concausa della complicanza.⁹⁷

CD33 è considerato un marcatore importante nella determinazione di cellule mieloidi, coinvolte nei processi infiammatori e nella progressione dell'aterosclerosi.⁵ Questa seconda parte di tesi si propone di valutare la presenza di questo marcatore in cellule mieloidi infiammatorie nei diversi stadi di progressione della patologia, comparati a controlli sani. A seguito di analisi citofluorimetrica sull'intera popolazione di PBMC, su linfociti e su monociti, i dati rivelavano una espressione della molecola progressivamente crescente nei pazienti complicati, in particolar modo nella categoria NV (Figura 2.1), in cui risultava significativamente più elevata. La differenza significativa era evidenziabile in particolar modo sulla popolazione monocitaria (Figura 2.1 C), dato confermato anche dalla correlazione tra numero di cellule CD33+ e numero di monociti circolanti. (Figura 2.1 D). Come suggerito da Dopheide et al,⁹⁸ un aumento di monociti circolanti e/o di cellule dendritiche mieloidi sembra essere strettamente correlato alla progressione di aterosclerosi, di ischemia cronica agli arti inferiori e complessivamente delle complicanze vascolari. Questo quadro compromesso si verifica di frequente nel diabete di tipo 2. Inoltre, popolazioni mieloidi CD33+ di origine midollare sono state valutate come possibili marcatori implicati nell'ischemia periferica. In particolare, queste popolazioni sono descritte a valle del processo di

differenziazione della linea emangioblastica, identificata dal marcatore di staminalità CD34+ e implicata come riportato dallo studio di Sambataro et al³ nella progressione dell'ischemia del paziente diabetico con lesioni.

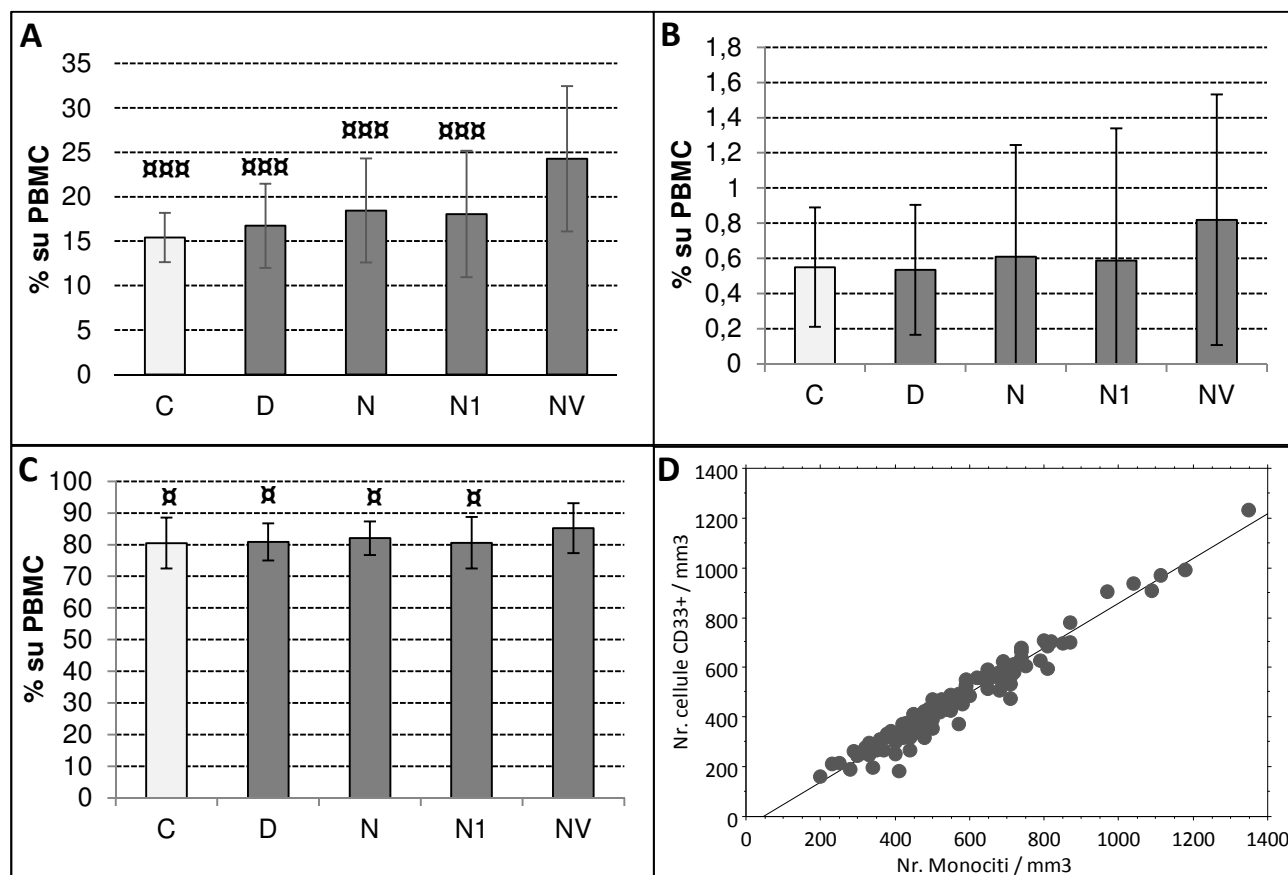


Figura 2.1. Valutazione citofluorimetrica dell'espressione di CD33+ su cellule

mononucleate di sangue periferico (PBMC). Le cellule da sangue intero sono state marcate con gli anticorpi monoclonali di interesse e acquisite con lo strumento BD FACS Canto II. I dati sono stati poi elaborati con il software BD FACS Diva. A-C: Espressione percentuale di CD33 su PBMC (A), linfociti (B) e monociti (C) di controlli sani e pazienti diabetici. I dati riportati sono espressi come media \pm Deviazione standard. α $p < 0,05$ vs NV, $\alpha\alpha\alpha$ $p < 0,005$ vs NV t-test di Student.. D: correlazione *in vivo* tra numero di cellule CD33+ e numero totale di monociti circolanti su mm³. $p < 0,0001$, $R^2 = 0,957$.

Uno dei fattori maggiormente correlati con la comparsa delle complicanze della patologia è il prolungato stress iperglicemico.⁹⁹ In base a questo e alla correlazione evidenziata *in vivo* tra numero di cellule CD33+ e valore di emoglobina glicata (Figura 2.2), è stato deciso di valutare la risposta di cellule mononucleate da pazienti diabetici con lesioni e controlli sani a differenti concentrazioni di glucosio *in vitro*, per mimare il microambiente presente *in vivo* e osservare più attentamente il comportamento di alcune popolazioni mieloidi correlate a CD33.

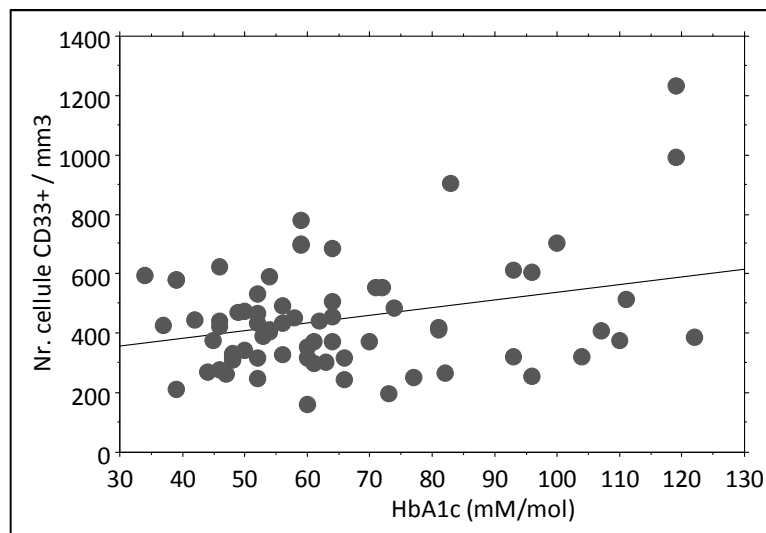


Figura 2.2. Correlazione *in vivo* tra numero di cellule CD33+ su mm^3 e valore di emoglobina glicata (mM/mol) su controlli sani e pazienti diabetici. $p < 0,05$, $R^2 = 0,091$

A 24 ore e 5 giorni di coltura, si evidenziava un complessivo calo in tutti i campioni nel numero di cellule vive (Figura 2.3). In particolar modo, il calo era significativo ed evidente nei pazienti diabetici, nei quali però a 24 ore si poteva notare un numero di cellule vive più elevato in presenza di glucosio ad alta concentrazione. A 5 giorni invece la concentrazione elevata di glucosio si rivelava dannosa per la vitalità cellulare solo nei pazienti diabetici. Il minor numero di cellule vive nei pazienti diabetici già dopo 24 h di coltura faceva quindi ipotizzare che le cellule fossero di per se' predisposte all' apoptosi e morte cellulare per la presenza della patologia.

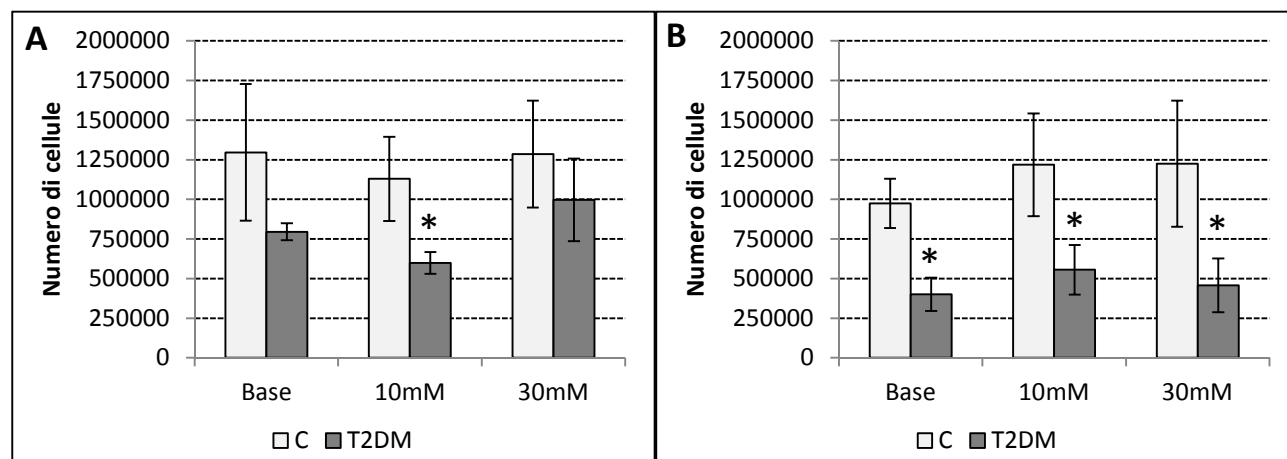


Figura 2.3. Valutazione del numero di cellule vive a 24 ore (A) e 5 giorni (B) di coltura in pazienti sani (C) e pazienti diabetici NV. Le cellule sono state mantenute in coltura con terreno base, terreno base addizionato di glucosio 10 mM e terreno base addizionato di glucosio 30 mM. Il numero di cellule è stato determinato con Trypan Blue e riportato come media \pm deviazione standard. $p < 0,05$ vs C, t-test di Student.

L'espressione di CD33 in cellule in coltura è stata valutata con analisi citofluorimetrica, che evidenziava un decremento del Siglec da $t=0$ a $t=5$ giorni in tutti i campioni (Figura 2.4). La percentuale di espressione di CD33 però si rivelava più elevata, seppure in maniera non significativa, nei pazienti diabetici, che subivano una variazione minore rispetto al t_0 .

Come suggerito dai gruppi di Ferlazzo e Vitale,^{100,101} la presenza maggiore di CD33 in pazienti con T2DM potrebbe avere un effetto inibitorio sulla proliferazione cellulare di cellule derivanti da sangue periferico *in vitro* e nella differenziazione in cellule mieloidi più mature, in particolar modo in caso di engagement del siglec con anticorpo o con specifici ligandi. Si potrebbe quindi ipotizzare che nel paziente diabetico l'ambiente proinfiammatorio e l'iperglicemia protratta nel tempo inducano il rilascio di molecole che si legano a CD33, inducendo *in vitro* un calo della proliferazione cellulare.

Inoltre, lo stimolo iperglicemico induceva una diversa espressione di CD33, in particolare un aumento del marcatore in cellule da paziente diabetico trattate con glucosio 30mM per 5 giorni. Questo dato risultava essere in contrasto con la letteratura,⁸⁹ in cui cellule mononucleate isolate da controlli sani e trattate con diversi stimoli glicemici per 7 giorni mostravano un abbassamento considerevole dei livelli di CD33 in presenza di marcata iperglicemia. Il trend, seppur simile nei campioni valutati di

controlli sani a 5 gg, risulta essere non significativo. Il livello di glucosio più elevato sembrava indurre invece una sovraespressione del marcatore a 5 gg nei campioni diabetici, suggerendo una deregolazione del CD33 in condizioni di iperglicemia cronica precedente alla coltura che può condizionare la ridotta risposta infiammatoria in termini di attivazione.

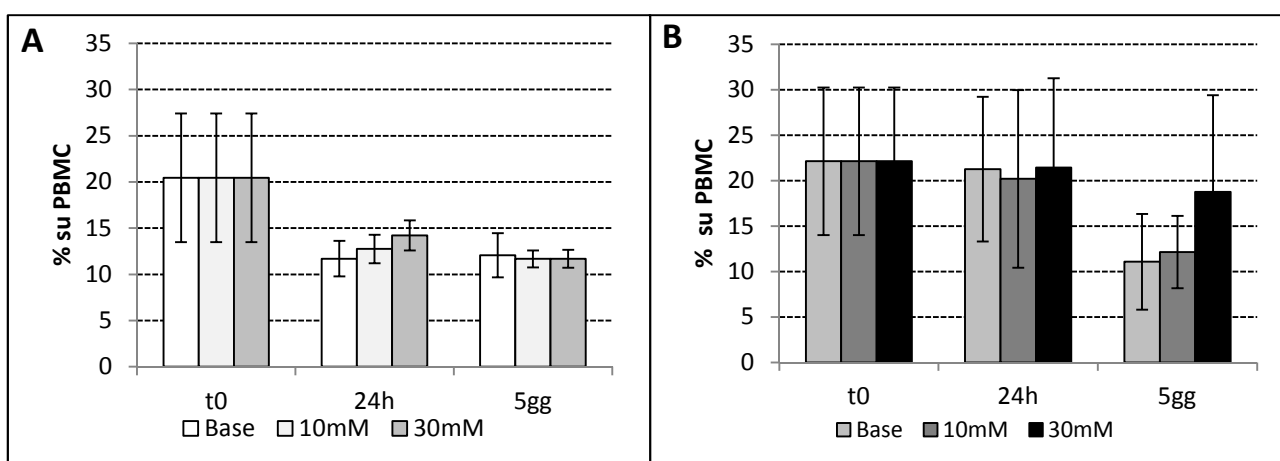


Figura 2.4. Valutazione delle cellule CD33+ a 24 ore e 5 giorni di coltura con terreno base, terreno base addizionato di glucosio 10 mM e terreno base addizionato di glucosio 30 mM su controlli sani (A) e pazienti diabetici NV (B). Le cellule sono state staccate con tripsina-EDTA, marcate con gli anticorpi monoclonali di interesse e acquisite con lo strumento BD FACS Canto II. I dati sono stati poi elaborati con il software BD FACS Diva. I dati riportati sono espressi come percentuale su PBMC in coltura, media \pm deviazione standard.

Il link tra CD33 e popolazioni leucocitarie collegate alla progressione di infezione è stato evidenziato anche *in vivo*: il siglec infatti sembrava essere direttamente correlato ad un incremento dei globuli bianchi totali (Figura 2.5). Gli studi eseguiti infatti mettevano in luce un marcato e significativo aumento di leucociti totali in pazienti con T2DM, in particolare con lesione e neuroischemia rispetto ai controlli sani. La risposta infiammatoria mediata dai globuli bianchi sembrerebbe quindi risentire della presenza di un elevato numero di cellule CD33+ in pazienti della categoria NV.

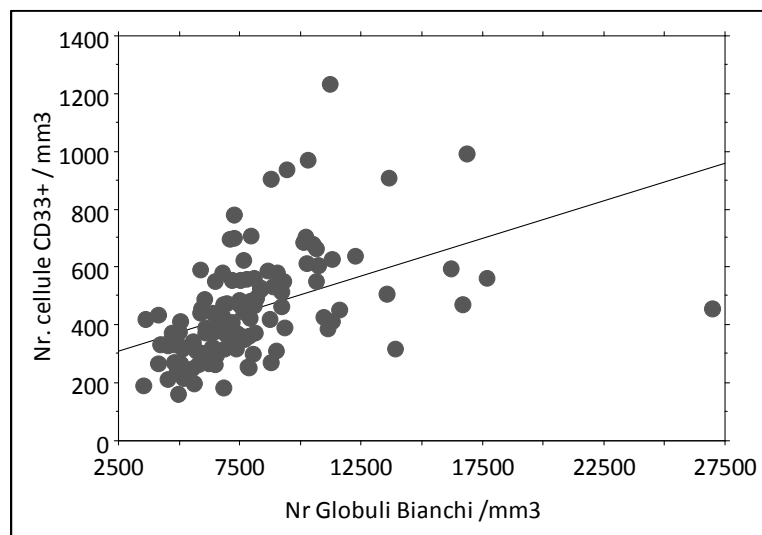


Figura 2.5. Correlazione *in vivo* tra numero di cellule CD33+ e numero di globuli bianchi su mm^3 su controlli sani e pazienti diabetici. $p < 0,0001$, $R^2 = 0,209$.

La valutazione *in vitro* delle popolazioni infiammatorie e in particolare del marcatore monocitario CD14 dimostrava un comportamento differente tra controlli e diabetici: a 24h di coltura infatti i campioni diabetici esprimevano un aumento del marker rispetto al tempo 0, che poi calava a 5 giorni. Il trend nei controlli sani si rivelava invece l'opposto a 24h. Nessuna differenza si poteva vedere in presenza o meno di stimolazione con glucosio (Figura 2.6 A-B). Circa il 90% delle cellule CD33+ co-esprimeva CD14 al tempo 0, rimanendo stabile nei pazienti diabetici a 24h e 5gg, aumentando al 95% nei controlli sani (dati non mostrati). Il marcatore CD16, invece, in entrambi i campioni aumentava considerevolmente con il progredire del tempo di coltura, in particolar modo nei pazienti diabetici. Lo stesso comportamento si poteva vedere nelle cellule che co-esprimevano CD33 e CD16 (Figura 2.6 C-D), e CD33, CD14 e CD16 (Figura 2.6 E-F), in cui l'incremento rispetto al t_0 è addirittura logaritmico. Il differente comportamento di questi due marcatori su cellule sane e diabetiche fanno ipotizzare uno sbilanciamento nei processi infiammatori in condizioni patologiche. Come dimostrato da Idzkowska infatti, i monociti classici (CD14++) sembrano essere maggiormente coinvolti in una risposta infiammatoria immediata al contatto con il microorganismo, rilasciando ROS e citochine pro-infiammatorie quali IL-6 e TNF- α .⁶⁹ La popolazione non classica (CD14+CD16++) invece sembrava essere maggiormente coinvolta nella fase riparativa, favorendo la formazione di tessuto di

granulazione e la successiva risoluzione della lesione in corso. Nonostante non sia stata effettuata un'analisi accurata della produzione di citochine *in vitro*, la letteratura suggerisce che la presenza di CD33, così marcata in entrambe le popolazioni monocitarie nel paziente diabetico, possa avere una duplice funzione a seconda del tipo cellulare coinvolto: l'attivazione di SOCS3 mediata da LPS nei monociti CD14++ infatti sembra essere potenziata da CD33, favorendo la produzione di citochine proinfiammatorie da parte di queste cellule.⁷⁹ L'ambiente già di per sé infiammatorio dimostrato nel diabete verrebbe così mantenuto nel tempo.¹⁰² D'altro canto invece, la presenza di CD33 su cellule CD16+ e CD14+CD16++ potrebbe svolgere un ruolo inibitorio, causandone un deficit funzionale: nonostante un incremento del numero di cellule infatti non si assisteva, nel diabetico, ad un miglioramento nella fase risolutiva della lesione, con conseguente sviluppo di infezione.

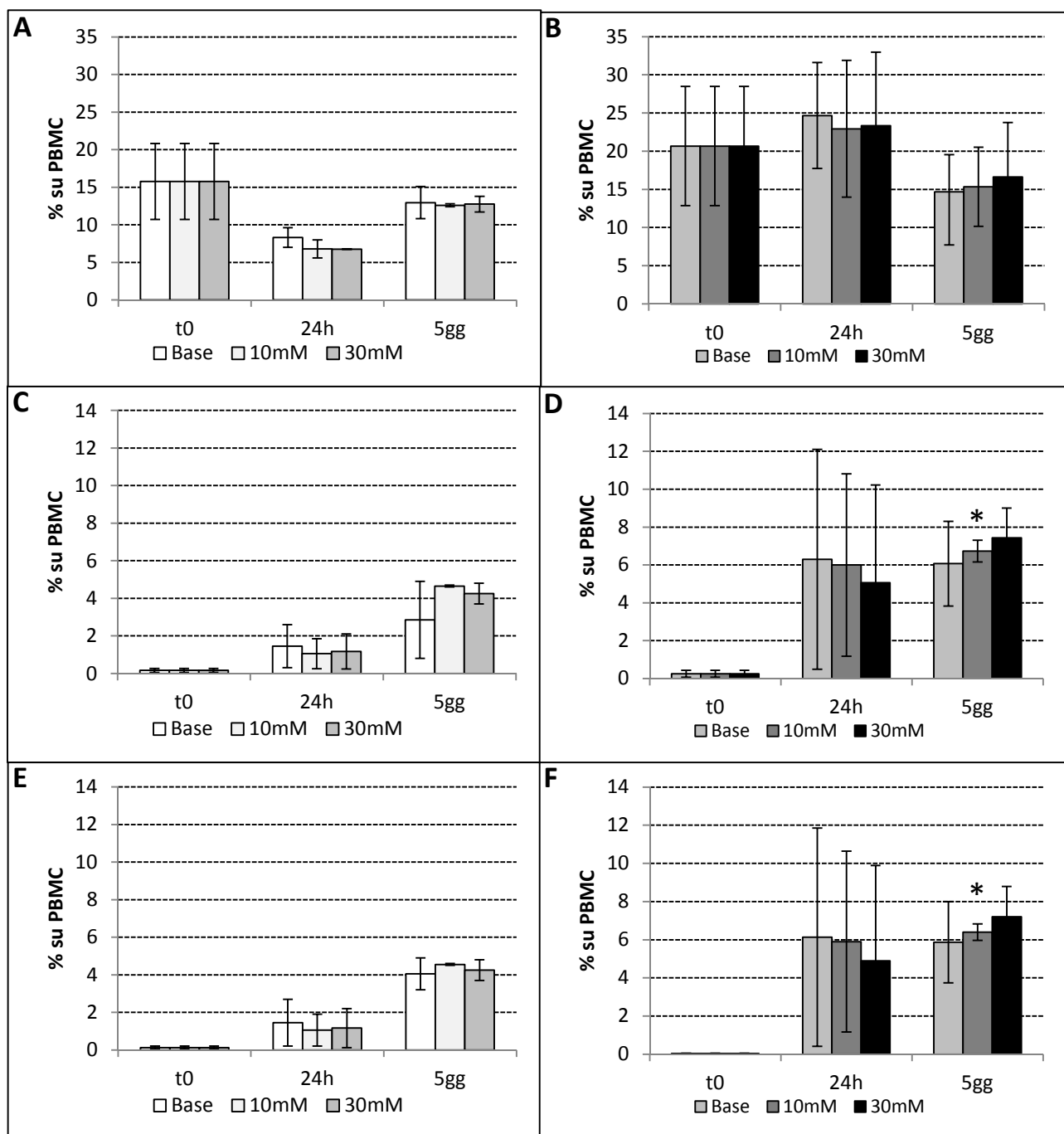


Figura 2.6. Valutazione dei monociti a 24 ore e 5 giorni di coltura con terreno base, terreno base addizionato di glucosio 10 mM e terreno base addizionato di glucosio 30 mM su controlli sani (A, C, E) e pazienti diabetici NV (B, D, F). Le cellule sono state staccate con tripsina-EDTA, marcate con gli anticorpi monoclonali di interesse e acquisite con lo strumento BD FACS Canto II. I dati sono stati poi elaborati con il software BD FACS Diva e riportati come % di cellule CD14++ su PBMC (A e B), % di cellule CD16+CD33+ su PBMC (C e D) e % di cellule CD14+CD16++CD33+ (E e F). I dati sono espressi come percentuale su PBMC in coltura, media \pm deviazione standard. $p < 0,05$ vs C, t-test di Student.

Il processo di guarigione della lesione a carico dei monociti non classici è sostenuto dalla secrezione della citochina antiinfiammatoria IL-

10. È stata quindi valutata la concentrazione plasmatica della citochina nelle diverse categorie di pazienti ed è stata posta in relazione con il numero di cellule CD33+. Il dato *in vivo* non evidenziava significative differenze nell'espressione della citochina nei gruppi e rispetto ai controlli sani, nonostante fosse attesa una maggior concentrazione di citochina nei pazienti con lesione. Il dato sembrava supportare quindi l'ipotesi che il meccanismo riparativo fosse compromesso. La correlazione con CD33 (Figura 2.7) risultava non essere significativa, suggerendo che il meccanismo di inibizione dato da CD33 fosse mediato anche da altri fattori. L'equilibrio quindi tra la popolazione infiammatoria e quella riparativa, necessaria per la corretta guarigione delle ferite,¹⁰³ sembra essere non correttamente bilanciato in questa particolare categoria di pazienti diabetici.

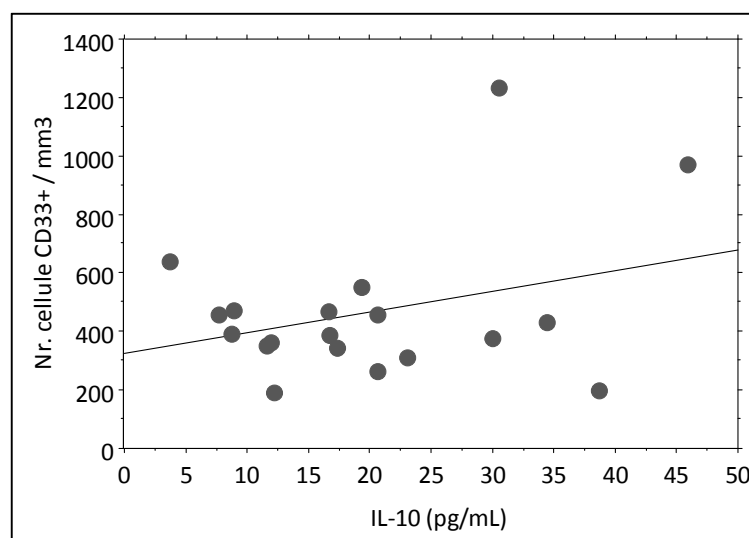


Figura 2.7. Correlazione *in vivo* tra numero di cellule CD33+ su mm³ e concentrazione plasmatica di Interleuchina-10 (pg/mL) misurata tramite test ELISA su controlli sani e pazienti diabetici. $p < 0,1801$ $R^2 = 0,103$

I risultati ottenuti valutando le cellule dendritiche sembravano supportare l'ipotesi di un alterato processo di riparazione tissutale. (Figura 2.8)

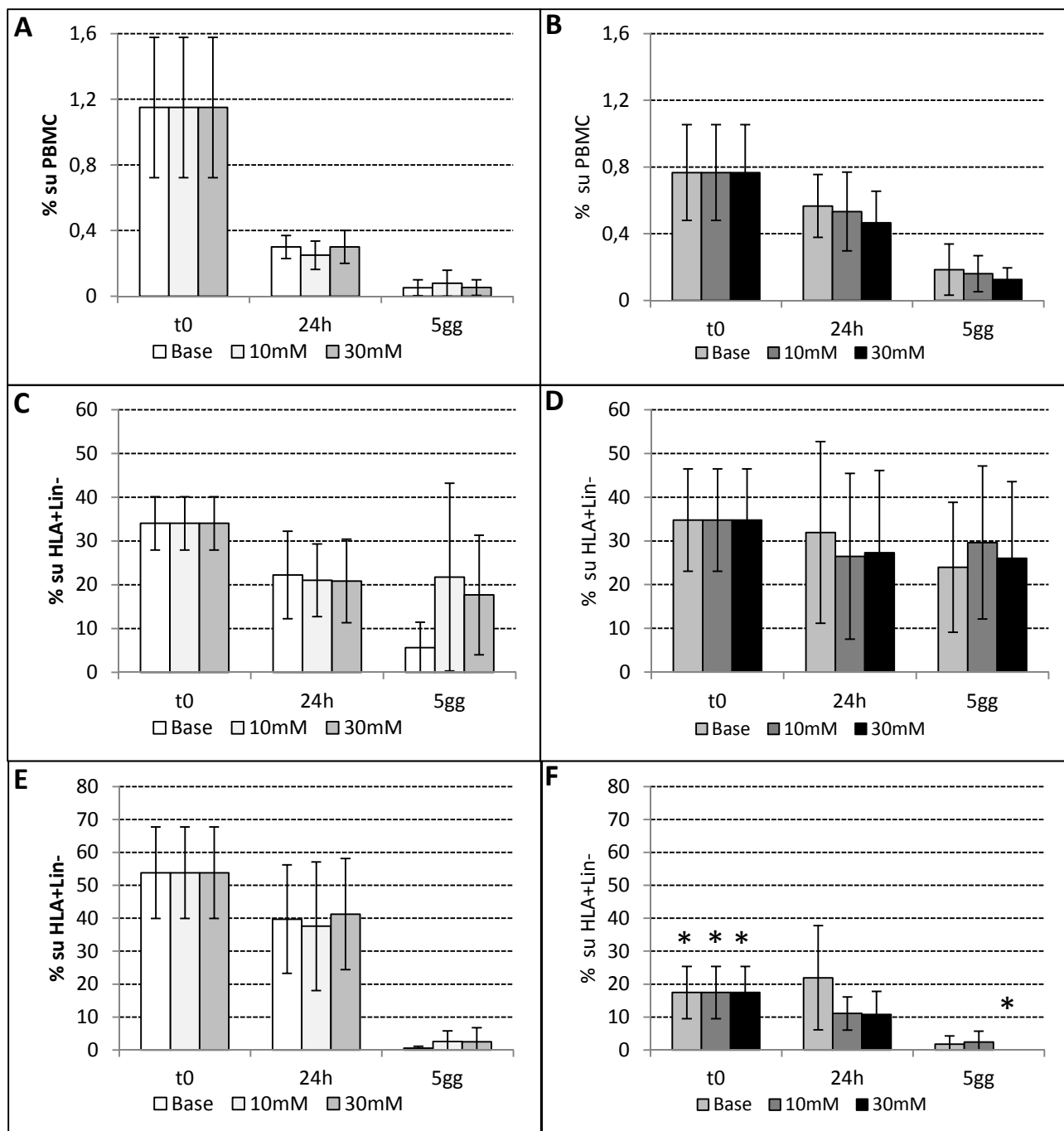


Figura 2.8. Valutazione delle cellule dendritiche a 24 ore e 5 giorni di coltura con terreno base, terreno base addizionato di glucosio 10 mM e terreno base addizionato di glucosio 30 mM su controlli sani (A, C, E) e pazienti diabetici NV (B, D, F). Le cellule sono state staccate con tripsina-EDTA, marcate con gli anticorpi monoclonali di interesse e acquisite con lo strumento BD FACS Canto II. I dati sono stati poi elaborati con il software BD FACS Diva e riportati come % di DC su PBMC (A e B), % di mDC su DC (C e D) e % di pDC su DC (E e F). I dati sono espressi come percentuale su PBMC in coltura, media \pm deviazione standard. * $p < 0,05$ vs C, t-test di Student.

La presenza di cellule dendritiche infatti si attestava significativamente più

elevata nei controlli sani *in vivo* (dati non mostrati), dato in accordo con l'ipotesi di una maggiore competenza immunitaria in assenza di malattia. *In vitro*, in mancanza di stimolazione con citochine specifiche, la popolazione dendritica subiva un drastico calo a 5 giorni, in presenza o meno di iperglicemia. La variazione era significativamente meno marcata nei campioni diabetici (Figura 2.8 B) La popolazione mieloide si manteneva maggiormente in coltura, la popolazione plasmacitoide invece era già significativamente ridotta al t0 rispetto al controllo e a 5 giorni sembrava scomparire, soprattutto nei campioni con T2DM con terreno 30 mM. Nei pazienti diabetici, le mDC co-esprimevano CD33 nel 90% dei casi, dato che sembrava favorire la presenza di questa popolazione a 5 giorni di coltura molto più che nella popolazione sana. La presenza di un adeguato apporto di DC e la loro corretta attivazione è determinante per la difesa dell'organismo nei confronti dei patogeni: la presentazione degli antigeni ai linfociti T infatti è un meccanismo essenziale per lo svolgimento di una adeguata risposta immunitaria.¹⁰⁴ La presenza di CD33 nella maggior parte delle cellule dendritiche di derivazione diabetica sembra suggerire, come nel caso dei monociti non classici, una maggior sopravvivenza cellulare ma una minor competenza immunologica: il Siglec sembra assumere un significato inibitorio, bloccando tramite gli ITIM il processo di presentazione dell'antigene batterico da parte delle mDC. È stato verificato infatti come la presenza di CD33 su questa popolazione induca un minor differenziamento e ne blocchi l'attivazione.¹⁰⁵ È stato inoltre evidenziato che il marcatore è aumentato in pazienti diabetici con lesioni in confronto ai pazienti che non presentavano ulcere agli arti inferiori.⁹⁰ Il gruppo di Elia¹⁰⁶ ha poi dimostrato come la presenza di ischemia influenzi negativamente la funzionalità della popolazione dendritica, inibendo la corretta presentazione dell'antigene. Ulteriori studi sul diabete di tipo 1 hanno poi messo in luce che la presenza di CD33, in particolar modo nella popolazione soppressiva mieloide, è aumentata in questi pazienti diabetici ma ne è stato dimostrato un deficit funzionale nei confronti delle cellule dell'immunità.⁸⁵

Sulla base di queste considerazioni, è stato valutato *in vivo* un coinvolgimento del marcatore anche nella componente plasmacitoide. *In*

in vivo si poteva evidenziare un calo significativo ($p < 0,005$) del numero di pDC circolanti nei pazienti complicati del gruppo N1 e NV rispetto ai controlli sani. La popolazione CD33+ correlava inversamente con la percentuale di pDC, circolanti, facendo ipotizzare un ruolo di tipo inibitorio anche su questa particolare popolazione. (Figura 2.9)

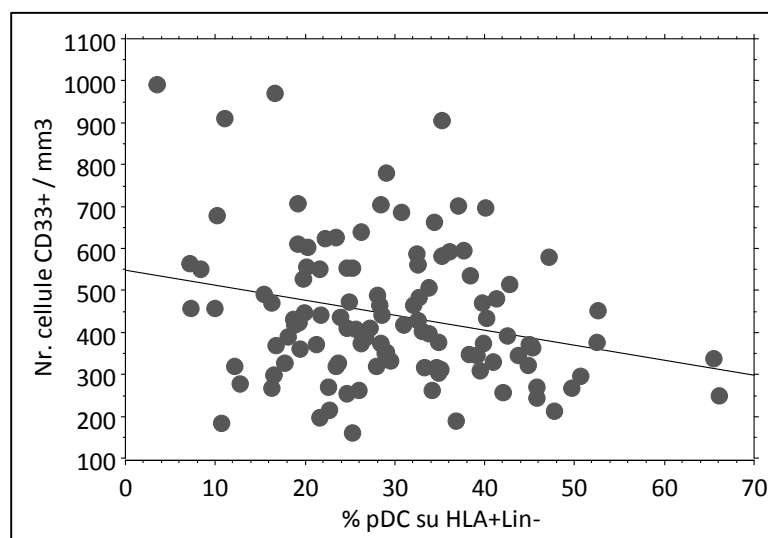


Figura 2.9. Correlazione *in vivo* tra numero di cellule CD33+ su mm^3 e percentuale di cellule dendritiche plasmacitoidi circolanti su controlli sani e pazienti diabetici. $p < 0,01$
 $R^2 = 0,067$

Nel modello animale messo a punto da Gregorio et al ⁷³ è stato infatti dimostrato come in presenza di lesione cutanea vi sia una maggior migrazione di pDC al tessuto leso, e come il loro ruolo sia fondamentale per rendere più rapida la guarigione. Il rilascio di interferone di tipo 1 da parte di questa popolazione dendritica attiva una risposta immunitaria che favorisce la rapida riepitelizzazione della lesione. La correlazione inversa tra CD33 e pDC *in vivo* sembrava quindi suggerire una ulteriore incompetenza di cellule coinvolte nei meccanismi di chiusura della lesione. L'ipotesi era supportata dalla osservazione clinica: in Figura 2.10 si poteva notare come il processo riparativo, in paziente diabetico con lesione e ischemia, fosse gravemente compromesso: nonostante l'ulcera di piccole dimensioni, il processo di guarigione richiedeva circa 24 mesi, dimostrando un grosso deficit nella fase di riepitelizzazione.

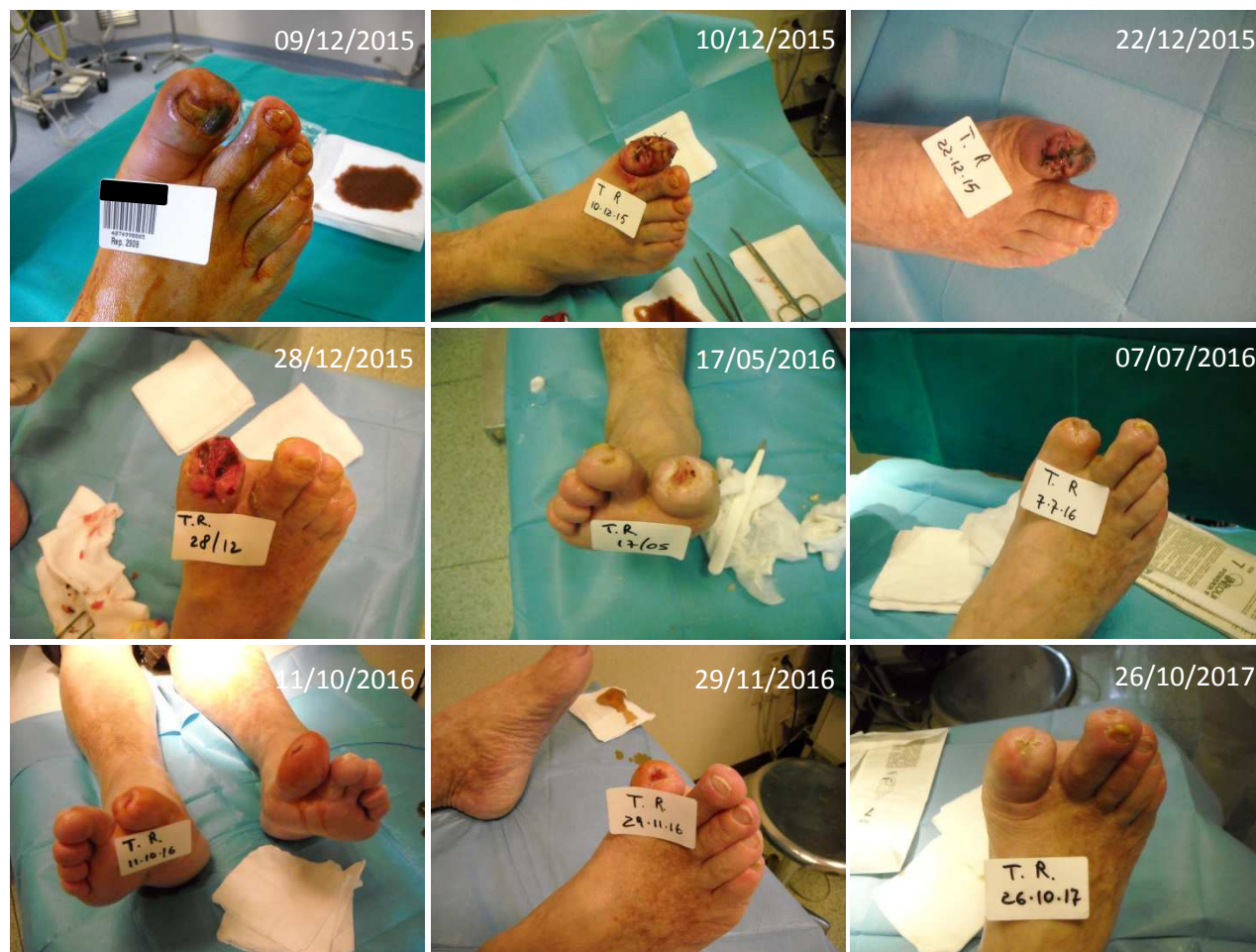


Figura 2.10. Immagini in ordine cronologico di progressione di lesione in paziente diabetico della categoria NV. Dal momento dell'arrivo presso il centro antidiabetico (09/12/2015) la ferita è stata bonificata chirurgicamente il 10/12/2017 e poi trattata per un periodo di circa 2 anni, fino al raggiungimento della guarigione. Le immagini sono state raccolte e pubblicate con il consenso del paziente.

Nel complesso, i dati raccolti indicano che:

1. Il marcatore di origine midollare CD33 è maggiormente espresso *in vivo* su cellule della linea mieloide in pazienti diabetici con complicanze e lesioni agli arti inferiori ed ischemia periferica ed è coinvolto nei meccanismi di regolazione della risposta immunitaria, come dimostrato dalla correlazione con la popolazione leucocitaria;
2. *In vitro*, la presenza di CD33 sembra indicare una incompetenza nella risposta immunitaria nei soggetti diabetici. Tale condizione riguarda sia i monociti non classici, attivamente coinvolti nei soggetti sani nella fase rigenerativa delle lesioni tramite la secrezione di IL-10, sia le cellule dendritiche mieloidi, in cui CD33 nei diabetici sembra essere un marcatore di sopravvivenza cellulare *in vitro* ma che non dimostra sufficiente funzionalità;
3. I processi di riepitelizzazione e risoluzione della lesione potrebbero coinvolgere la popolazione dendritica plasmacitoide, che si trova ridotta *in vivo* ed *in vitro* nel diabetico e che correla in maniera inversa con l'espressione di CD33, che anche in questo caso sembra svolgere un ruolo di tipo inibitorio.

I risultati *in vitro*, seppur non significativi in termini numerici e quindi preliminari, sembrano supportare l'evidenza clinica: le lesioni agli arti inferiori in pazienti diabetici sono spesso correlate con un elevato rischio di amputazioni, causate da una difficoltà da parte dell'organismo nel sostenere la riparazione tissutale e la corretta risposta all'infezione.¹⁰⁷

CONCLUSIONI

Il diabete di tipo 2 è una patologia che per la sua diffusione crescente e le sue complicanze invalidanti è diventata negli ultimi anni oggetto di studi sempre più approfonditi. Il coinvolgimento di diversi distretti con meccanismi di regolazione differenti ha richiesto in questa tesi un approccio su due fronti, pur mantenendo il focus generale sul distretto vascolare, che come già sottolineato risente particolarmente dello stato di iperglicemia prolungata.²

In primo luogo è stato evidenziato il ruolo del processo angiogenico, indispensabile per garantire il corretto apporto di ossigeno e nutrienti in periferia e compromesso nel diabete, in particolar modo a livello degli arti inferiori, in cui il meccanismo risulta danneggiato con conseguente riduzione dell'angiogenesi e difficile riparazione della lesione.³

I risultati ottenuti hanno messo in luce come il processo angiogenico possa essere potenziato dalla proteina S100B, che in questo studio ha evidenziato proprietà peculiari nel favorire i meccanismi di formazione di nuovi vasi. In particolar modo, la concentrazione di S100B a livello extracellulare sembra essere determinante in tre fasi del processo angiogenico:

1. Proliferazione cellulare. La proteina a concentrazioni 0,1 nM e 0,01 nM ma non 100nM ha evidenziato una attivazione del comparto endoteliale favorendone la proliferazione, a supporto dello studio del gruppo di Sorci.⁶²
2. Migrazione cellulare. Il trattamento con S100B delle cellule HUVEC ha indotto un incremento della migrazione cellulare già evidenziato in altre popolazioni cellulari quali cellule gliali, astrociti e cellule tumorali di diversa origine.⁶³⁻⁶⁵
3. Capacità di formare strutture capillaro-simili. La proteina sembra influire in questa fase unicamente alla concentrazione 0,01 nM,

facendo ipotizzare un coinvolgimento parziale in questo step del processo pro-angiogenico.

I dati ottenuti hanno poi rivelato il ruolo del recettore RAGE come mediatore chiave del segnale indotto da S100B: le tre fasi sopracitate venivano infatti significativamente inibite a seguito del silenziamento del recettore.

L'analisi della via di segnale di ERK1/2, coinvolta nella migrazione di cellule gliali in presenza di S100B⁶³, ha dimostrato l'implicazione della MAP-chinasi nel processo pro-angiogenico, seppur limitatamente ad alcune fasi di esso.

Complessivamente, S100B sembra avere proprietà pro-angiogeniche su cellule endoteliali sia *in vitro* che *in vivo* in modo dipendente dalla concentrazione extracellulare della proteina e dall'attivazione del recettore RAGE e della MAP chinasi ERK1/2, evidenziando un possibile meccanismo implicato nelle complicanze vascolari diabetiche.

Successivamente è stata indagata la presenza di cellule mieloidi circolanti esprimenti CD33, molecola contenente dei motivi inibitori detti ITIM, implicati nella regolazione dell'attivazione delle cellule di competenza immunologica. La proteina inoltre è dimostrato essere un elemento fondante per la risposta al legame con il recettore per LPS, molecola di origine batterica responsabile dell'innesco dei processi infiammatori a carico in particolar modo dei monociti.⁷⁸

La presenza di questo particolare Siglec è stata indagata in pazienti diabetici con diverso grado di complicanza della malattia, con maggiore attenzione ai pazienti con neuroischemia e lesioni infette agli arti inferiori, confrontati poi con controlli sani. È documentato infatti il ruolo di CD33 in processi a carico dei vasi e nella progressione dell'aterosclerosi⁵ ma non nella macroangiopatia diabetica correlata a lesioni distali periferiche.

I risultati ottenuti hanno evidenziato un incremento *in vivo* del marcatore in pazienti con lesioni agli arti inferiori ed una forte correlazione con la popolazione monocitaria, suggerendo un suo coinvolgimento nella

differenziazione immunitaria attivata dalle cellule del sangue.

L'espressione *in vitro* di CD33 su cellule mieloidi ha evidenziato un duplice ruolo del marcatore a seconda del tipo di cellula studiata: in cellule CD14++ l'attivazione di SOCS3 sembra essere potenziata da CD33, favorendo la produzione di citochine proinfiammatorie. Il ruolo invece si modifica in cellule CD14+CD16++, in cui, seppur a fronte di un aumento del numero di cellule, viene inibita la funzionalità peculiare nella fase riparativa della lesione¹⁰³ in pazienti con danni vascolari e lesioni agli arti inferiori.

Per valutare l'efficienza e la competenza immunologica sulla rigenerazione tissutale, è stato scelto un modello di cellule con funzione riparativa, la popolazione dendritica plasmacitoide.⁷³ L'analisi di questa popolazione ha evidenziato una riduzione del numero di cellule sia *in vivo* che *in vitro* in pazienti diabetici e una correlazione inversa con CD33, che si conferma come molecola inibitoria nei processi di guarigione della ferita nei pazienti diabetici più complicati.

Complessivamente, i dati raccolti in questo lavoro, seppur preliminare, individuano in CD33 un marcatore di funzionalità delle cellule mieloidi infiammatorie ed immunitarie coinvolte nei processi di riparazione tissutale. In pazienti diabetici, in particolar modo con lesioni agli arti inferiori, si profila un meccanismo di regolazione disfunzionale dei processi di rigenerazione tissutale, in cui la presenza di CD33 sulla superficie di diverse categorie di cellule mieloidi sembra indurre una amplificazione non controllata della risposta infiammatoria e una potenziale inibizione della capacità riparativa.

BIBLIOGRAFIA

1. CINECA - SID Società Italiana di Diabetologia. *Rapporto 2015 Volume XXIII - Collana "Rapporti ARNO" Osservatorio ARNO Diabete Il Profilo Lo Assistenziale Della Popolazione Con Diabete*. Vol XXII.; 2015.
<http://arno.cineca.it/journal/osservatorio-arno-diabete-il-profilo-assistenziale/>.
2. Nathan DM. Diabetes: Advances in Diagnosis and Treatment. *Jama*. 2015;314(10):1052-1062. doi:10.1001/jama.2015.9536.
3. Sambataro M, Seganfredo E, Canal F, et al. Prognostic significance of circulating and endothelial progenitor cell markers in type 2 diabetic foot. *Int J Vasc Med*. 2014;2014(11):589412. doi:10.1155/2014/589412.
4. Sorci G, Bianchi R, Riuzzi F, et al. S100B Protein, a Damage-Associated Molecular Pattern Protein in the Brain and Heart, and Beyond. *Cardiovasc Psychiatry Neurol*. 2010;2010:1-13. doi:10.1155/2010/656481.
5. Gacka M, Dobosz T, Szymaniec S, Bednarska-Chabowska D, Adamiec R, Sadakierska-Chudy A. Proinflammatory and atherogenic activity of monocytes in type 2 diabetes. *J Diabetes Complications*. 2010;24(1):1-8. doi:10.1016/j.jdiacomp.2008.07.001.
6. Bonora E, Sesti G. Il diabete in Italia. 2016. [www.siditalia.it/pdf/Il Diabete in Italia_p.pdf](http://www.siditalia.it/pdf/Il_Diabete_in_Italia_p.pdf).
7. Engelen SE, van der Graaf Y, Stam-Slob MC, et al. Incidence of cardiovascular events and vascular interventions in patients with type 2 diabetes. *Int J Cardiol*. 2017. doi:10.1016/j.ijcard.2017.07.081.
8. Pop-Busui R, Boulton AJM, Feldman EL, et al. Diabetic Neuropathy: A Position Statement by the American Diabetes Association. *Diabetes Care*. 2017;40(1):136-154. doi:10.2337/dc16-2042.
9. Sandireddy R, Yerra VG, Areti A, Komirishetty P, Kumar A. Neuroinflammation and oxidative stress in diabetic neuropathy: futuristic strategies based on these targets. *Int J Endocrinol*. 2014;2014(Figure 1):674987. doi:10.1155/2014/674987.
10. SID G di studio P diabetico. *Documento Di Consenso Internazionale Sul Piede Diabetico*.; 2010.
11. Prompers L, Schaper N, Apelqvist J, et al. Prediction of outcome in individuals with diabetic foot ulcers: Focus on the differences between individuals with and without peripheral arterial disease. The EURODIALE Study. *Diabetologia*. 2008;51(5):747-755. doi:10.1007/s00125-008-0940-0.
12. Norgren L, Hiatt WR, Dormandy JA, et al. Inter-Society Consensus for the Management of Peripheral Arterial Disease (TASC II). *Eur J Vasc Endovasc Surg*. 2007;33 Suppl 1(45):S1-75. doi:10.1016/j.ejvs.2006.09.024.
13. Lipsky BA, International consensus group on diagnosing and treating the infected diabetic foot. A report from the international consensus on diagnosing and treating the infected diabetic foot. *Diabetes Metab Res Rev*. 2004;20 Suppl

- 1(January):S68-77. doi:10.1002/dmrr.453.
14. Okonkwo UA, DiPietro LA. Diabetes and Wound Angiogenesis. *Int J Mol Sci*. 2017;18(7):1-15. doi:10.3390/ijms18071419.
 15. Mirza R, Koh TJ. Dysregulation of monocyte/macrophage phenotype in wounds of diabetic mice. *Cytokine*. 2011;56(2):256-264. doi:10.1016/j.cyto.2011.06.016.
 16. Boniakowski AE, Kimball AS, Jacobs BN, Kunkel SL, Gallagher KA. Macrophage-Mediated Inflammation in Normal and Diabetic Wound Healing. *J Immunol*. 2017;199(1):17-24. doi:10.4049/jimmunol.1700223.
 17. Hensel M, Grädel L, Kutz A, et al. Peripheral monocytosis as a predictive factor for adverse outcome in the emergency department. *Med (United States)*. 2017;96(28). doi:10.1097/MD.00000000000007404.
 18. Tsukada S, Masuda H, Jung SY, et al. Impaired development and dysfunction of endothelial progenitor cells in type 2 diabetic mice. *Diabetes Metab*. 2017;43(2):154-162. doi:10.1016/j.diabet.2016.07.034.
 19. Rigato M, Bittante C, Albiero M, Avogaro A, Fadini GP. Circulating Progenitor Cell Count Predicts Microvascular Outcomes in Type 2 Diabetic Patients. *J Clin Endocrinol Metab*. 2015;100(7):2666-2672. doi:10.1210/jc.2015-1687.
 20. Saito H, Yamamoto Y, Yamamoto H. Diabetes alters subsets of endothelial progenitor cells that reside in blood, bone marrow, and spleen. *Am J Physiol Cell Physiol*. 2012;302(6):C892-901. doi:10.1152/ajpcell.00380.2011.
 21. Tepper OM, Galiano RD, Capla JM, et al. Human endothelial progenitor cells from type II diabetics exhibit impaired proliferation, adhesion, and incorporation into vascular structures. *Circulation*. 2002;106(22):2781-2786. doi:10.1161/01.CIR.0000039526.42991.93.
 22. Tanaka R, Masuda H, Kato S, et al. Autologous G-CSF-mobilized peripheral blood CD34+ cell therapy for diabetic patients with chronic nonhealing ulcer. *Cell Transplant*. 2012;23(27):167-179. doi:10.3727/096368912X658007.
 23. Ferraro F, Lymperi S, Mendez-Ferrer S, et al. Diabetes Impairs Hematopoietic Stem Cell Mobilization Through Alteration of Niche Function. 2013;3(104). doi:10.1126/scitranslmed.3002191.DIABETES.
 24. Fadini GP, Fiala M, Cappellari R, et al. Diabetes limits stem cell mobilization following G-CSF but not plerixafor. *Diabetes*. 2015;64(8):2969-2977. doi:10.2337/db15-0077.
 25. Dang Z, Maselli D, Spinetti G, et al. Sensory neuropathy hampers nociception-mediated bone marrow stem cell release in mice and patients with diabetes. *Diabetologia*. 2015;58(11):2653-2662. doi:10.1007/s00125-015-3735-0.
 26. Kang L, Chen Q, Wang L, et al. Decreased mobilization of endothelial progenitor cells contributes to impaired neovascularization in diabetes. *Clin Exp Pharmacol Physiol*. 2009;36(10). doi:10.1111/j.1440-1681.2009.05219.x.
 27. Feng G, Hao D, Chai J. Processing of CXCL12 impedes the recruitment of endothelial progenitor cells in diabetic wound healing. *FEBS J*. 2014;281(22):5054-5062. doi:10.1111/febs.13043.
 28. Sawada N, Arany Z. Metabolic Regulation of Angiogenesis in Diabetes and Aging. *Physiology*. 2017;32(4):290-307. doi:10.1152/physiol.00039.2016.

29. Kuberappa PH, Bagalad BS, Ananthaneni A, Kiresur MA, Srinivas GV. Certainty of S100 from Physiology to Pathology. *J Clin Diagn Res.* 2016;10(6):ZE10-5. doi:10.7860/JCDR/2016/17949.8022.
30. Donato R, Sorci G, Riuzzi F, et al. S100B's double life: intracellular regulator and extracellular signal. *Biochim Biophys Acta.* 2009;1793(6):1008-1022. doi:10.1016/j.bbamcr.2008.11.009.
31. Lin J, Yang Q, Wilder PT, Carrier F, Weber DJ. The calcium-binding protein S100B down-regulates p53 and apoptosis in malignant melanoma. *J Biol Chem.* 2010;285(35):27487-27498. doi:10.1074/jbc.M110.155382.
32. Chargé SBP, Rudnicki MA. Cellular and molecular regulation of muscle regeneration. *Physiol Rev.* 2004;84(1):209-238. doi:10.1152/physrev.00019.2003.
33. Sorci G, Agneletti AL, Donato R. Effects of S100A1 and S100B on microtubule stability. An in vitro study using triton-cytoskeletons from astrocyte and myoblast cell lines. *Neuroscience.* 2000;99(4):773-783. doi:10.1016/S0306-4522(00)00238-4.
34. Donato R. S100: a multigenic family of calcium-modulated proteins of the EF-hand type with intracellular and extracellular functional roles. *Int J Biochem Cell Biol.* 2001;33(7):637-668. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11390274>.
35. Arcuri C, Bianchi R, Brozzi F, Donato R. S100B increases proliferation in PC12 neuronal cells and reduces their responsiveness to nerve growth factor via Akt activation. *J Biol Chem.* 2005;280(6):4402-4414. doi:10.1074/jbc.M406440200.
36. Riuzzi F, Sorci G, Donato R. S100B protein regulates myoblast proliferation and differentiation by activating FGFR1 in a bFGF-dependent manner. *J Cell Sci.* 2011;124(14):2389-2400. doi:10.1242/jcs.084491.
37. Gentil BJ, Delphin C, Mbele GO, et al. The giant protein AHNAK is a specific target for the calcium- and zinc-binding S100B protein: potential implications for Ca²⁺ homeostasis regulation by S100B. *J Biol Chem.* 2001;276(26):23253-23261. doi:10.1074/jbc.M010655200.
38. Kleindienst A, Ross Bullock M. A critical analysis of the role of the neurotrophic protein S100B in acute brain injury. *J Neurotrauma.* 2006;23(8):1185-1200. doi:10.1089/neu.2006.23.1185.
39. Zong H, Madden A, Ward M, Mooney MH, Elliott CT, Stitt AW. Homodimerization is essential for the receptor for advanced glycation end products (RAGE)-mediated signal transduction. *J Biol Chem.* 2010;285(30):23137-23146. doi:10.1074/jbc.M110.133827.
40. Sárkány Z, Ikonen TP, Ferreira-da-Silva F, Saraiva MJ, Svergun D, Damas AM. Solution structure of the soluble receptor for advanced glycation end products (sRAGE). *J Biol Chem.* 2011;286(43):37525-37534. doi:10.1074/jbc.M111.223438.
41. Huttunen HJ, Kuja-Panula J, Sorci G, Agneletti AL, Donato R, Rauvala H. Coregulation of neurite outgrowth and cell survival by amphoterin and S100 proteins through receptor for advanced glycation end products (RAGE) activation. *J Biol Chem.* 2000;275(51):40096-40105. doi:10.1074/jbc.M006993200.
42. Tramontina F, Tramontina AC, Souza DF, et al. Glutamate uptake is stimulated

- by extracellular S100B in hippocampal astrocytes. *Cell Mol Neurobiol.* 2006;26(1):81-86. doi:10.1007/s10571-006-9099-8.
43. Toth C, Martinez J, Zochodne DW. RAGE, diabetes, and the nervous system. *Curr Mol Med.* 2007;7(8):766-776. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18331235>.
44. Li Y, Wang J, Sheng JG, et al. S100 beta increases levels of beta-amyloid precursor protein and its encoding mRNA in rat neuronal cultures. *J Neurochem.* 1998;4(71):1421-1428.
45. Rothermundt M, Ponath G, Arolt V. S100B in schizophrenic psychosis. *Int Rev Neurobiol.* 2003;59:445-470. doi:10.1016/S0074-7742(04)59017-7.
46. Bianchi R, Adami C, Giambanco I, Donato R. S100B binding to RAGE in microglia stimulates COX-2 expression. *J Leukoc Biol.* 2007;81(1):108-118. doi:10.1189/jlb.0306198.
47. Shanmugam N, Kim YS, Lanting L, Natarajan R. Regulation of cyclooxygenase-2 expression in monocytes by ligation of the receptor for advanced glycation end products. *J Biol Chem.* 2003;278(37):34834-34844. doi:10.1074/jbc.M302828200.
48. Yan SS, Wu Z-Y, Zhang HP, et al. Suppression of experimental autoimmune encephalomyelitis by selective blockade of encephalitogenic T-cell infiltration of the central nervous system. *Nat Med.* 2003;9(3):287-293. doi:10.1038/nm831.
49. Gao X, Zhang H, Schmidt AM, Zhang C. AGE/RAGE produces endothelial dysfunction in coronary arterioles in type 2 diabetic mice. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2008;295(2):H491-8. doi:10.1152/ajpheart.00464.2008.
50. Chavakis T, Bierhaus A, Al-Fakhri N, et al. The Pattern Recognition Receptor (RAGE) Is a Counterreceptor for Leukocyte Integrins. *J Exp Med.* 2003;198(10):1507-1515. doi:10.1084/jem.20030800.
51. MacLaren RE, Pearson RA. Stem cell therapy and the retina. *Eye (Lond).* 2007;21(10):1352-1359. doi:10.1038/sj.eye.6702842.
52. Vincent AM, Russell JW, Low P, Feldman EL. Oxidative stress in the pathogenesis of diabetic neuropathy. *Endocr Rev.* 2004;25(4):612-628. doi:10.1210/er.2003-0019.
53. Chong ZZ, Changyaleket B, Xu H, Dull RO, Schwartz DE. Identifying S100B as a Biomarker and a Therapeutic Target For Brain Injury and Multiple Diseases. *Curr Med Chem.* 2016;23(15):1571-1596. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27048377>.
54. Mohammadzadeh F, Desjardins J, Tsoporis JN, Proteau G, Leong-Poi H, Parker TG. S100B: role in cardiac remodeling and function following myocardial infarction in diabetes. *Life Sci.* 2013;92(11):639-647. doi:10.1016/j.lfs.2012.09.011.
55. Reddy MA, Li SL, Sahar S, et al. Key role of Src kinase in S100B-induced activation of the receptor for advanced glycation end products in vascular smooth muscle cells. *J Biol Chem.* 2006;281(19):13685-13693. doi:10.1074/jbc.M511425200.
56. Brouwers O, Niessen PM, Haenen G, et al. Hyperglycaemia-induced impairment of endothelium-dependent vasorelaxation in rat mesenteric arteries is mediated

- by intracellular methylglyoxal levels in a pathway dependent on oxidative stress. *Diabetologia*. 2010;53(5):989-1000. doi:10.1007/s00125-010-1677-0.
57. Zhang ZX, Min W ping, Jevnikar AM. Use of RNA interference to minimize ischemia reperfusion injury. *Transplant Rev*. 2012;26(2):140-155. doi:10.1016/j.trre.2011.03.001.
58. Grant DS, Kleinman HK, Leblond CP, Inoue S, Chung AE, Martin GR. The basement-membrane-like matrix of the mouse EHS tumor: II. Immunohistochemical quantitation of six of its components. *Am J Anat*. 1985;174(4):387-398. doi:10.1002/aja.1001740403.
59. Kleinman HK, Cannon FB, Laurie GW, et al. Biological activities of laminin. *J Cell Biochem*. 1985;27(4):317-325. doi:10.1002/jcb.240270402.
60. Liekens S, De Clercq E, Neyts J. Angiogenesis: regulators and clinical applications. *Biochem Pharmacol*. 2001;61(3):253-270. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11172729>.
61. Dellian M, Witwer BP, Salehi HA, Yuan F, Jain RK. Quantitation and physiological characterization of angiogenic vessels in mice: effect of basic fibroblast growth factor, vascular endothelial growth factor/vascular permeability factor, and host microenvironment. *Am J Pathol*. 1996;149(1):59-71. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8686763>.
62. Sorci G, Riuzzi F, Agneletti AL, Marchetti C, Donato R. S100B Causes Apoptosis in a Myoblast Cell Line in a RAGE-Independent Manner. *J Cell Physiol*. 2004;199(2):274-283. doi:10.1002/jcp.10462.
63. Bianchi R, Kastrisianaki E, Giambanco I, Donato R. S100B protein stimulates microglia migration via RAGE-dependent up-regulation of chemokine expression and release. *J Biol Chem*. 2011;286(9):7214-7226. doi:10.1074/jbc.M110.169342.
64. Brozzi F, Arcuri C, Giambanco I, Donato R. S100B Protein Regulates Astrocyte Shape and Migration via Interaction with Src Kinase: IMPLICATIONS FOR ASTROCYTE DEVELOPMENT, ACTIVATION, AND TUMOR GROWTH. *J Biol Chem*. 2009;284(13):8797-8811. doi:10.1074/jbc.M805897200.
65. Jiang W, Jia Q, Liu L, et al. S100B promotes the proliferation, migration and invasion of specific brain metastatic lung adenocarcinoma cell line. *Cell Biochem Funct*. 2011;29(7):582-588. doi:10.1002/cbf.1791.
66. Meghnani V, Wagh A, Indurthi VSK, et al. The receptor for advanced glycation end products influences the expression of its S100 protein ligands in melanoma tumors. *Int J Biochem Cell Biol*. 2014;57:54-62. doi:10.1016/j.biocel.2014.10.001.
67. Arlier S, Murk W, Guzeloglu-Kayisli O, et al. The extracellular signal-regulated kinase 1/2 triggers angiogenesis in human ectopic endometrial implants by inducing angioblast differentiation and proliferation. *Am J Reprod Immunol*. 2017;(July):e12760. doi:10.1111/aji.12760.
68. Cao T, Zhang L, Yao L-L, et al. S100B promotes injury-induced vascular remodeling through modulating smooth muscle phenotype. *Biochim Biophys Acta*. 2017;1863(11):2772-2782. doi:10.1016/j.bbdis.2017.07.002.
69. Idzkowska E, Eljaszewicz a, Miklasz P, Musial WJ, Tycinska a M, Moniuszko

- M. The Role of Different Monocyte Subsets in the Pathogenesis of Atherosclerosis and Acute Coronary Syndromes. *Scand J Immunol.* 2015;82(3):163-173. doi:10.1111/sji.12314.
70. Zanoni I, Granucci F. Role of CD14 in host protection against infections and in metabolism regulation. *Front Cell Infect Microbiol.* 2013;3(July):32. doi:10.3389/fcimb.2013.00032.
71. Ziegler-Heitbrock L, Ancuta P, Crowe S, et al. Nomenclature of monocytes and dendritic cells in blood. *Blood.* 2010;116(16):e74-80. doi:10.1182/blood-2010-02-258558.
72. Saadeh D, Kurban M, Abbas O. Update on the role of plasmacytoid dendritic cells in inflammatory/autoimmune skin diseases. *Exp Dermatol.* 2016;25(6):415-421. doi:10.1111/exd.12957.
73. Gregorio J, Meller S, Conrad C, et al. Plasmacytoid dendritic cells sense skin injury and promote wound healing through type I interferons. *J Exp Med.* 2010;207(13):2921-2930. doi:10.1084/jem.20101102.
74. Collin M, McGovern N, Haniffa M. Human dendritic cell subsets. *Immunology.* 2013;140(1):22-30. doi:10.1111/imm.12117.
75. Crocker PR, McMillan SJ, Richards HE. CD33-related siglecs as potential modulators of inflammatory responses. *Ann N Y Acad Sci.* 2012;1253:102-111. doi:10.1111/j.1749-6632.2011.06449.x.
76. Lock K, Zhang J, Lu J, Lee SH, Crocker PR. Expression of CD33-related siglecs on human mononuclear phagocytes, monocyte-derived dendritic cells and plasmacytoid dendritic cells. *Immunobiology.* 2004;209(1-2):199-207. doi:10.1016/j.imbio.2004.04.007.
77. Lajaunias F, Dayer J-M, Chizzolini C. Constitutive repressor activity of CD33 on human monocytes requires sialic acid recognition and phosphoinositide 3-kinase-mediated intracellular signaling. *Eur J Immunol.* 2005;35(1):243-251. doi:10.1002/eji.200425273.
78. Orr SJ, Morgan NM, Elliott J, et al. CD33 responses are blocked by SOCS3 through accelerated proteasomal-mediated turnover. *Blood.* 2007;109(3):1061-1068. doi:10.1182/blood-2006-05-023556.
79. Ishida A, Akita K, Mori Y, et al. Negative regulation of Toll-like receptor-4 signaling through the binding of glycosylphosphatidylinositol-anchored glycoprotein, CD14, with the sialic acid-binding lectin, CD33. *J Biol Chem.* 2014;289(36):25341-25350. doi:10.1074/jbc.M113.523480.
80. Cravens PD, Hayashida K, Davis LS, Nanki T, Lipsky PE. Human peripheral blood dendritic cells and monocyte subsets display similar chemokine receptor expression profiles with differential migratory responses. *Scand J Immunol.* 2007;65(6):514-524. doi:10.1111/j.1365-3083.2007.01933.x.
81. Ma L, Scheers W, Vandenberghe P. A flow cytometric method for determination of absolute counts of myeloid precursor dendritic cells in peripheral blood. *J Immunol Methods.* 2004;285(2):215-221. doi:10.1016/j.jim.2003.12.006.
82. Bueno C, Almeida J, Alguero MC, et al. Flow cytometric analysis of cytokine production by normal human peripheral blood dendritic cells and monocytes: comparative analysis of different stimuli, secretion-blocking agents and

- incubation periods. *Cytometry*. 2001;46(1):33-40.
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11241505>.
83. O'Reilly MK, Paulson JC. Siglecs as targets for therapy in immune-cell-mediated disease. *Trends Pharmacol Sci*. 2009;30(5):240-248.
doi:10.1016/j.tips.2009.02.005.
84. Lechner MG, Megiel C, Russell SM, et al. Functional characterization of human Cd33+ and Cd11b+ myeloid-derived suppressor cell subsets induced from peripheral blood mononuclear cells co-cultured with a diverse set of human tumor cell lines. *J Transl Med*. 2011;9:90. doi:10.1186/1479-5876-9-90.
85. Whitfield-Larry F, Felton J, Buse J, Su MA. Myeloid-derived suppressor cells are increased in frequency but not maximally suppressive in peripheral blood of Type 1 Diabetes Mellitus patients. *Clin Immunol*. 2014;153(1):156-164.
doi:10.1016/j.clim.2014.04.006.
86. Griciuc A, Serrano-Pozo A, Parrado AR, et al. Alzheimer's disease risk gene CD33 inhibits microglial uptake of amyloid beta. *Neuron*. 2013;78(4):631-643.
doi:10.1016/j.neuron.2013.04.014.
87. Walker DG, Whetzel AM, Serrano G, Sue LI, Beach TG, Lue L-F. Association of CD33 polymorphism rs3865444 with Alzheimer's disease pathology and CD33 expression in human cerebral cortex. *Neurobiol Aging*. 2015;36(2):571-582.
doi:10.1016/j.neurobiolaging.2014.09.023.
88. Forsyth RG, De Boeck G, Baelde JJ, et al. CD33+ CD14- phenotype is characteristic of multinuclear osteoclast-like cells in giant cell tumor of bone. *J Bone Miner Res*. 2009;24(1):70-77. doi:10.1359/jbmr.080905.
89. Gonzalez Y, Herrera MT, Soldevila G, et al. High glucose concentrations induce TNF- α production through the down-regulation of CD33 in primary human monocytes. *BMC Immunol*. 2012;13(1):19. doi:10.1186/1471-2172-13-19.
90. Singh K, Agrawal NK, Gupta SK, Sinha P, Singh K. Increased expression of TLR9 associated with pro-inflammatory S100A8 and IL-8 in diabetic wounds could lead to unresolved inflammation in type 2 diabetes mellitus (T2DM) cases with impaired wound healing. *J Diabetes Complications*. 2016;30(1):99-108.
doi:10.1016/j.jdiacomp.2015.10.002.
91. Weykamp C, John WG, Mosca A. A review of the challenge in measuring hemoglobin A1c. *J Diabetes Sci Technol*. 2009;3(3):439-445.
doi:10.1177/193229680900300306.
92. Ogrin R, Woodward M, Sussman G, Khalil Z. Oxygen tension assessment: an overlooked tool for prediction of delayed healing in a clinical setting. *Int Wound J*. 2011;8(5):437-445. doi:10.1111/j.1742-481X.2011.00784.x.
93. Della Bella S, Giannelli S, Taddeo A, Presicce P, Villa ML. Application of six-color flow cytometry for the assessment of dendritic cell responses in whole blood assays. *J Immunol Methods*. 2008;339(2):153-164.
doi:10.1016/j.jim.2008.09.009.
94. Association AD. Standards of Medical Care in Diabetes d 2017. *Diabetes Care*. 2017;40(January).
95. AMD S. *Standard Italiani per La Cura Del Diabete Mellito 2016.*; 2016.
http://www.standarditaliani.it/skin/www.standarditaliani.it/pdf/STANDARD_201

- 6_June20.pdf.
96. Dy SM, Bennett WL, Sharma R, Zhang A, Waldfogel JM, Nesbit SA YH, Chelladurai Y, Feldman D, Wilson LM RK. Preventing Complications and Treating Symptoms of Diabetic Peripheral Neuropathy. *Rockv Agency Healthc Res Qual.* 2017;(187).
https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmedhealth/PMH0096158/pdf/PubMedHealth_PMH0096158.pdf.
 97. Dekker RG, Qin C, Ho BS, Kadakia AR. The effect of cumulative glycemic burden on the incidence of diabetic foot disease. *J Orthop Surg Res.* 2016;11(1):143. doi:10.1186/s13018-016-0474-y.
 98. Dopheide JF, Obst V, Doppler C, et al. Phenotypic characterisation of pro-inflammatory monocytes and dendritic cells in peripheral arterial disease. *Thromb Haemost.* 2012;108(6):1198-1207. doi:10.1160/TH12-05-0327.
 99. Egi M, Bellomo R, Stachowski E, et al. The interaction of chronic and acute glycemia with mortality in critically ill patients with diabetes. *Crit Care Med.* 2011;39(1):105-111. doi:10.1097/CCM.0b013e3181feb5ea.
 100. Ferlazzo G, Spaggiari GM, Semino C, Melioli G, Moretta L. Engagement of CD33 surface molecules prevents the generation of dendritic cells from both monocytes and CD34+ myeloid precursors. *Eur J Immunol.* 2000;30(3):827-833. doi:10.1002/1521-4141(200003)30:3<827::AID-IMMU827>3.0.CO;2-1.
 101. Vitale C, Romagnani C, Falco M, et al. Engagement of p75/AIRM1 or CD33 inhibits the proliferation of normal or leukemic myeloid cells. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1999;96(26):15091-15096.
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10611343>.
 102. Brock C, Brock B, Pedersen AG, Drewes AM, Jessen N, Farmer AD. Assessment of the cardiovascular and gastrointestinal autonomic complications of diabetes. *World J Diabetes.* 2016;7(16):321-332. doi:10.4239/wjd.v7.i16.321.
 103. Landén NX, Li D, Ståhle M. Transition from inflammation to proliferation: a critical step during wound healing. *Cell Mol Life Sci.* 2016;73(20):3861-3885. doi:10.1007/s00018-016-2268-0.
 104. Boltjes A, van Wijk F. Human dendritic cell functional specialization in steady-state and inflammation. *Front Immunol.* 2014;5(April):131. doi:10.3389/fimmu.2014.00131.
 105. Son M, Diamond B, Volpe BT, Aranow CB, Mackay MC, Santiago-Schwarz F. Evidence for C1q-mediated crosslinking of CD33/LAIR-1 inhibitory immunoreceptors and biological control of CD33/LAIR-1 expression. *Sci Rep.* 2017;7(1):270. doi:10.1038/s41598-017-00290-w.
 106. Elia AR, Cappello P, Puppo M, et al. Human dendritic cells differentiated in hypoxia down-modulate antigen uptake and change their chemokine expression profile. *J Leukoc Biol.* 2008;84(6):1472-1482. doi:10.1189/jlb.0208082.
 107. Volmer-Thole M, Lobmann R. Neuropathy and Diabetic Foot Syndrome. *Int J Mol Sci.* 2016;17(6). doi:10.3390/ijms17060917.
 108. Sorci G, Riuzzi F, Arcuri C, et al. S100B protein in tissue development, repair and regeneration. *World J Biol Chem.* 2013;4(1):1-12. doi:10.4331/wjbc.v4.i1.1.