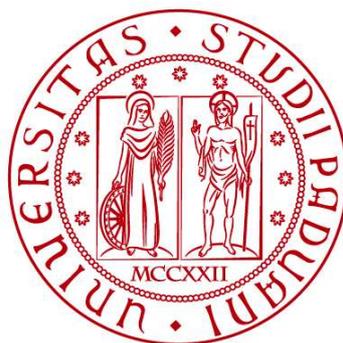


UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI PADOVA

DIPARTIMENTO DI BIOLOGIA

Corso di Laurea magistrale in Biologia Sanitaria



TESI DI LAUREA

Potenziale ruolo anti-infiammatorio delle vescicole extracellulari isolate da *Citrus limon* L. in un modello di cellule endoteliali ottenute da cordone di donne affette da diabete gestazionale

Relatore: Prof.ssa Michela Pozzobon
Dipartimento di Salute della Donna e del Bambino

Correlatore: Prof.ssa Assunta Pandolfi
Dipartimento di Scienze Mediche, Orali e Biotecnologiche

Laureanda: Caterina Maurizio

ANNO ACCADEMICO 2023/2024

INDICE

ABSTRACT.....	3
INTRODUZIONE.....	4
DIABETE.....	4
CLASSIFICAZIONE	5
Diabete mellito di tipo 1	6
Diabete mellito di tipo 2	9
DIABETE MELLITO GESTAZIONALE	12
Epidemiologia.....	12
Fisiopatologia.....	13
Screening	14
Fattori di rischio.....	16
Conseguenze del GDM.....	17
EPIGENETICA E MEMORIA NEL DIABETE	17
L'ENDOTELIO VASCOLARE	20
MORFOLOGIA E FISIOLOGIA	20
DISFUNZIONE ENDOTELIALE	21
CELLULE ENDOTELIALI DA VENA DI CORDONE OMBELICALE UMANO (HUVEC)	26
IL CORDONE OMBELICALE	27
CARATTERIZZAZIONE FENOTIPICA.....	28
APPLICAZIONI SPERIMENTALI.....	31
VESCICOLE EXTRACELLULARI	34
ESOSOMI	35
MICROVESCICOLE	36
CORPI APOPTOTICI.....	37

VESCICOLE EXTRACELLULARI DI ORIGINE VEGETALE.....	38
BIOGENESI DELLE PDEV	40
ISOLAMENTO E ANALISI OMICA DELLE PDEV	41
PDEV DERIVATE DALLA FRUTTA	42
PDEV estratte dal <i>Citrus Limon</i> L.....	42
SCOPO DEL LAVORO	44
MATERIALI E METODI.....	45
RISULTATI.....	53
DISCUSSIONE.....	60
CONCLUSIONE	66
BIBLIOGRAFIA	67

ABSTRACT

Le vescicole extracellulari derivate dalle piante (PDEV) sono strutture lipoproteiche rilasciate dalle cellule vegetali che di recente hanno attirato maggior interesse poichè studi sia *in vitro* che *in vivo* indicano che possono esercitare attività antitumorale, antiossidante e anti-infiammatoria. Tuttavia, il loro meccanismo di azione risulta essere scarsamente compreso. Diversi studi hanno recentemente dimostrato l'effetto protettivo delle PDEV isolate dal succo di Citrus limon L. (L-EV), pertanto questo lavoro mira ad investigare il potenziale ruolo anti-infiammatorio delle L-EV in cellule endoteliali isolate dalla vena del cordone ombelicale (HUVEC) di donne con diabete gestazionale (GD), in confronto a cellule derivanti da donne sane (C), come modello *in vitro* idoneo a riprodurre il fenotipo pro-infiammatorio di un endotelio diabetico. È stato osservato che le HUVEC hanno la capacità di internalizzare le L-EV. Inoltre, il pretrattamento con le L-EV ha ridotto nelle GD-HUVEC l'espressione proteica e l'esposizione di membrana della molecola di adesione endoteliale VCAM-1, e la conseguente adesione dei monociti alle HUVEC. In conclusione, i risultati ottenuti hanno dimostrato che le L-EV esercitano un ruolo anti-infiammatorio nel modello cellulare utilizzato e aprono la strada ad ulteriori studi per indagare il loro potenziale utilizzo nella prevenzione della disfunzione endoteliale vascolare associata al diabete.

INTRODUZIONE

DIABETE

Secondo l'Organizzazione Mondiale della Sanità (OMS) il diabete è una malattia metabolica caratterizzata da iperglicemia, una condizione rappresentata da elevati livelli di glucosio nel sangue causata da una carenza relativa o assoluta di insulina, dalla ridotta sensibilità delle cellule bersaglio all'insulina e da disturbi del metabolismo dei glicolipidi e delle proteine. L'iperglicemia cronica del diabete è associata a danni a lungo termine, disfunzione e insufficienza a carico di diversi organi, in particolare occhi, reni, nervi, cuore e vasi sanguigni (Galicia-Garcia et al., 2020).

A livello globale, il diabete risulta essere uno dei problemi sanitari più importanti ed impattanti che la popolazione umana attuale deve affrontare. Nella maggior parte dei Paesi del mondo, l'aumento della prevalenza del diabete è avvenuto in parallelo al rapido sviluppo economico che ha portato all'urbanizzazione e all'adozione di abitudini di vita moderne. Dati relativi al 2019 diffusi dalla International Diabetes Federation (IDF), evidenziano 463 milioni di persone con un'età compresa tra 20 e 79 anni affette da diabete e 4,2 milioni di persone adulte di età compresa tra 20 e 99 anni morte a causa di questa patologia e delle sue complicanze associate. La prevalenza del diabete tra uomini e donne è stata stimata rispettivamente pari al 9,6% e 9,0% rispetto alla popolazione mondiale. Dati più recenti emessi dalla IDF mostrano come la prevalenza globale del diabete abbia raggiunto nel 2021 il 10,5%. Inoltre, è stato ipotizzato che il numero di soggetti malati aumenterà fino a 700 milioni entro il 2045, quota che rappresenta il 10,9% della popolazione adulta mondiale totale (IDF, International Diabetes Federation).

CLASSIFICAZIONE

Secondo la rivista “Advances in Experimental Medicine and Biology. Diabetes. Classification of Diabetes”, la prima classificazione relativa alle tipologie di diabete è stata pubblicata nel 1979 dal *National Diabetes Data Group* (NDDG), approvata dall’Organizzazione Mondiale della Sanità nel 1980 e successivamente modificata nel 1985 (Maraschin, 2013).

La classificazione iniziale era basata sulla terapia farmacologica applicata ed era caratterizzata da due gruppi principali: diabete mellito insulino-dipendente (IDDM) e diabete mellito non insulino-dipendente (NIDDM).

Con il termine IDDM venivano descritti pazienti magri, propensi alla chetosi e che richiedevano un trattamento a base di insulina. Al contrario, il termine NIDDM faceva riferimento a pazienti obesi, non predisposti alla chetosi e che non richiedevano insulina, bensì esercizio fisico per il controllo del peso e/o somministrazione di farmaci. Nel gruppo NDDG erano descritte tre classi, quali il diabete mellito gestazionale, il diabete mellito correlato alla malnutrizione e altre forme di diabete mellito secondarie a patologie (malattie pancreatiche, malattie endocrine responsabili di un’eccessiva secrezione di ormoni controregolatori dell’insulina, uso di farmaci che inducono iperglicemia, assunzione di sostanze tossiche, specifiche anomalie genetiche, anomalie dell’insulina o del suo recettore) (Maraschin, 2013).

Se da un lato i termini suggeriti dall’NDDG nel 1977 divennero diffusi negli anni 80’ e 90’, dall’altro emersero alcuni problemi legati alla diagnosi poiché pazienti con NIDDM avevano bisogno di insulina per controllare la malattia, il che ha portato a classificare erroneamente questi pazienti come IDDM o insulina richiedente. Inoltre, divennero disponibili maggiori informazioni sugli altri tipi di diabete e una crescente conoscenza della patogenesi del diabete ha reso ridondante la classificazione NDDG (Maraschin, 2013).

L’attuale classificazione del diabete è stata pubblicata nel 1997 da un gruppo di esperti dell’American Diabetes Association (ADA), rivista e approvata dall’OMS nel 1998, modificata dall’ADA nel 2003 e dall’OMS nel 2006. La nuova classificazione si basa principalmente sulla patogenesi del diabete e non

sul suo trattamento. Le principali categorie riconosciute sono: diabete mellito di tipo 1 (T1DM), diabete mellito di tipo 2 (T2DM), diabete gestazionale e altri tipi specifici di diabete dovuti ad altre cause, ad esempio, sindromi da diabete monogenico (come il diabete neonatale e il diabete dei giovani ad esordio nell'età adulta [MODY]), malattie del pancreas esocrino (come la fibrosi cistica e la pancreatite) e malattie dovute a farmaci o diabete indotto da sostanze chimiche (come con l'uso di glucocorticoidi, nel trattamento dell'HIV/AIDS o dopo il trapianto di organi) (Maraschin, 2013).

Diabete mellito di tipo 1

Il diabete mellito di tipo 1 (T1DM) è una malattia autoimmune cronica caratterizzata dalla presenza di autoanticorpi che causano distruzione delle cellule β presenti nelle isole di Langerhans, dette anche isole pancreatiche, responsabili della produzione di insulina, ormone che l'organismo non può produrre autonomamente, e che in questa condizione risulta essere assente.

Secondo l'International Diabetes Federation, gli individui affetti da diabete rappresentano l'8,8% della popolazione adulta, e di questi solo il 10-15% ha il T1DM. Questa tipologia di diabete colpisce principalmente bambini con un'età inferiore a 15 anni e, ad oggi, sono più di 500 mila i bambini nel mondo che convivono con questa condizione (IDF, International Diabetes Federation).

L'incidenza risulta superiore nei paesi scandinavi, paesi europei, Nord America e Australia rispetto a paesi asiatici come Cina, Corea e Giappone, in cui il T1DM è una malattia rara (*Figura 1*). Questa variazione di incidenza non è del tutto spiegata, ma potrebbe essere correlata alla suscettibilità genetica, a fattori ambientali e allo stile di vita (Katsarou et al., 2017).

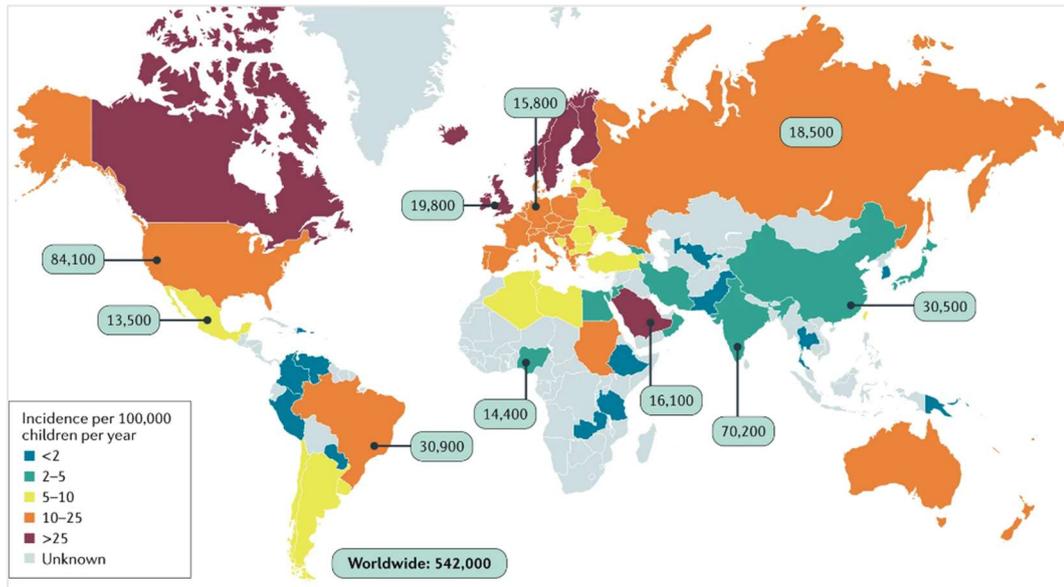


Figura 1. Numero stimato di nuovi casi di diabete mellito di tipo 1 (T1DM) nei bambini (<15 anni) per 100.000 individui nel 2015 (dati resi noti dalla Federazione Internazionale del Diabete) (Katsarou et al., 2017).

Gli autoanticorpi associati al T1DM colpiscono l'insulina, la decarbossilasi dell'acido glutammico da 65 kDa (GAD65), la proteina 2 associata all'insulinoma (IA-2) e il trasportatore 8 dello zinco (ZNT8). Durante la prima infanzia, i primi autoanticorpi rilevabili sono l'anti-insulina e l'anti-GAD65 e il loro ordine di comparsa è legato all'età e a fattori genetici, mentre risulta più rara la presenza di autoanticorpi contro IA-2 e ZNT8. Sebbene non ancora dimostrato, si ipotizza che gli autoanticorpi siano prodotti a causa della continua esposizione agli autoantigeni delle cellule β . Gli autoanticorpi anti-insulina sono i primi a comparire nei bambini di età compresa tra 1 e 2 anni che hanno un aplotipo HLA-DR4-DQ8, mentre bambini con più di 1 anno con l'aplotipo HLA-DR3-DQ2 mostrano autoanticorpi contro GAD65. In seguito allo sviluppo di questi due anticorpi, possono generarsi anche autoanticorpi mirati verso IA-2 e IA-2 β , o ZNT8, responsabile del trasporto degli ioni zinco dal citoplasma all'interno delle vescicole secretorie (Katsarou et al., 2017).

Nella patogenesi del T1DM, si verificano delle interazioni tra linfociti T e B che possono portare alla formazione di autoanticorpi diretti contro le isole di Langerhans (Figura 2). È ancora sconosciuto l'evento scatenante, ma si ritiene che la comparsa del primo autoanticorpo diretto contro il target sia dato dalla

presentazione dell'autoantigene da parte delle cellule dendritiche e le successive risposte delle cellule T $CD4^+$ e $CD8^+$. La presentazione dell'antigene da parte dei linfociti B e delle cellule dendritiche porta all'attivazione delle cellule T specifiche. Inoltre, l'esposizione dei linfociti B agli autoantigeni delle cellule β porta alla produzione di autoanticorpi diretti contro le isole di Langerhans, che fungono da biomarcatori della malattia asintomatica (Katsarou et al., 2017).

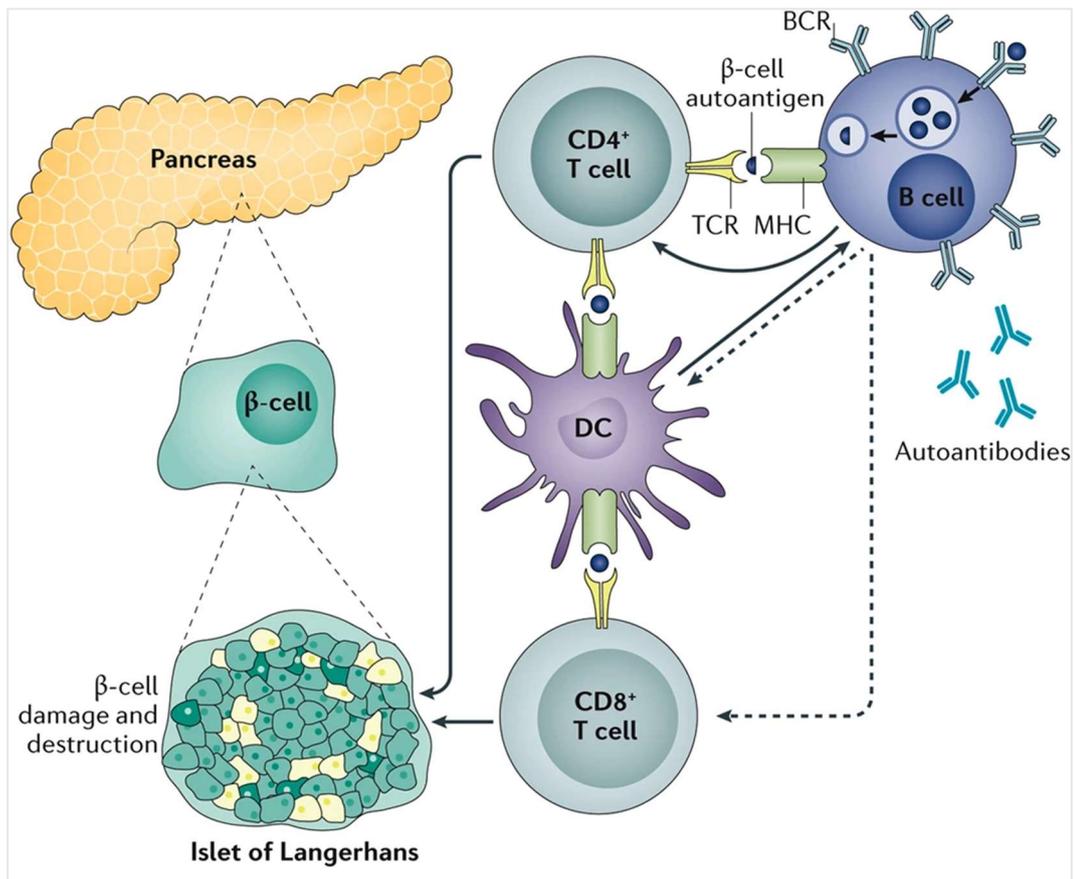


Figura 2. I linfociti B attivati interagiscono con i linfociti T $CD4^+$ e $CD8^+$, così come con le cellule dendritiche (DC). La presentazione dell'antigene da parte dei linfociti B e delle DC guida l'attivazione dei linfociti T specifici per le cellule β . Inoltre, l'esposizione dei linfociti B agli autoantigeni delle cellule β porta alla produzione di autoanticorpi diretti verso le isole pancreatiche (Katsarou et al., 2017).

La distruzione immunomediata delle cellule β porta ad una carenza di insulina con conseguente innalzamento dei livelli di glucosio nel sangue, condizione conosciuta come iperglicemia (Katsarou et al., 2017).

Tra i sintomi più comuni che insorgono principalmente nei bambini vi sono: poliuria, polidipsia, perdita di peso, sintomi addominali, cefalea e chetoacidosi.

Secondo i criteri suggeriti dall'American Diabetes Association (ADA) nel 2016, la diagnosi viene effettuata sul metabolismo anomalo del glucosio, indipendentemente dal tipo di diabete e dall'età di insorgenza; tuttavia, la diagnosi deve essere confermata da OGGT (Oral Glucose Tolerance Test) ripetuti.

Oltre al T1DM autoimmune in cui sono presenti autoanticorpi contro le cellule β , l'ADA riconosce un'ulteriore tipologia di diabete, il T1DM idiopatico. Nel quadro clinico di un paziente con tale tipologia, non sono presenti autoanticorpi, i soggetti hanno un'età superiore (>20-30 anni) rispetto a quelli con T1DM autoimmune, sono spesso di origine africana o asiatica e hanno un indice di massa corporea (BMI) più elevato rispetto ai soggetti con T1DM autoimmune della stessa età (Katsarou et al., 2017).

Attualmente, l'unica terapia possibile per il T1DM è la somministrazione esogena di insulina, associata ad una corretta alimentazione e attività fisica. Il ruolo dell'insulina esogena, iniettata prevalentemente nel tessuto sottocutaneo da cui poi si diffonde a tutto l'organismo, è quello di simulare quanto più possibile l'azione dell'insulina endogena e quindi permettere un normale utilizzo di glucosio da parte delle cellule sia a digiuno che dopo aver mangiato (Katsarou et al., 2017).

Diabete mellito di tipo 2

Il diabete mellito di tipo 2 (T2DM) è una malattia cronica causata principalmente da una combinazione di due fattori: un'alterata secrezione di insulina da parte delle cellule β pancreatiche e l'incapacità dei tessuti insulino-sensibili di rispondere all'ormone (Galicia-Garcia et al., 2020).

L'International Diabetes Federation ha stimato che, nel 2013 in tutto il mondo, il numero di soggetti affetti dal T2DM con un'età compresa tra 20 e 70 anni, erano 382 milioni, di cui l'80% viveva in paesi a basso e medio reddito (*Figura 3*). Le aree maggiormente colpite da questa malattia risultano essere Cina e India, dove la prevalenza è aumentata notevolmente nonostante una prevalenza bassa di obesità. La maggior predisposizione al T2DM degli asiatici potrebbe essere spiegata dal fatto che, a parità di indice di massa corporea (BMI), essi tendono ad

avere una percentuale più elevata di massa grassa corporea, una maggiore obesità addominale e una minore massa muscolare (DeFronzo et al., 2015).

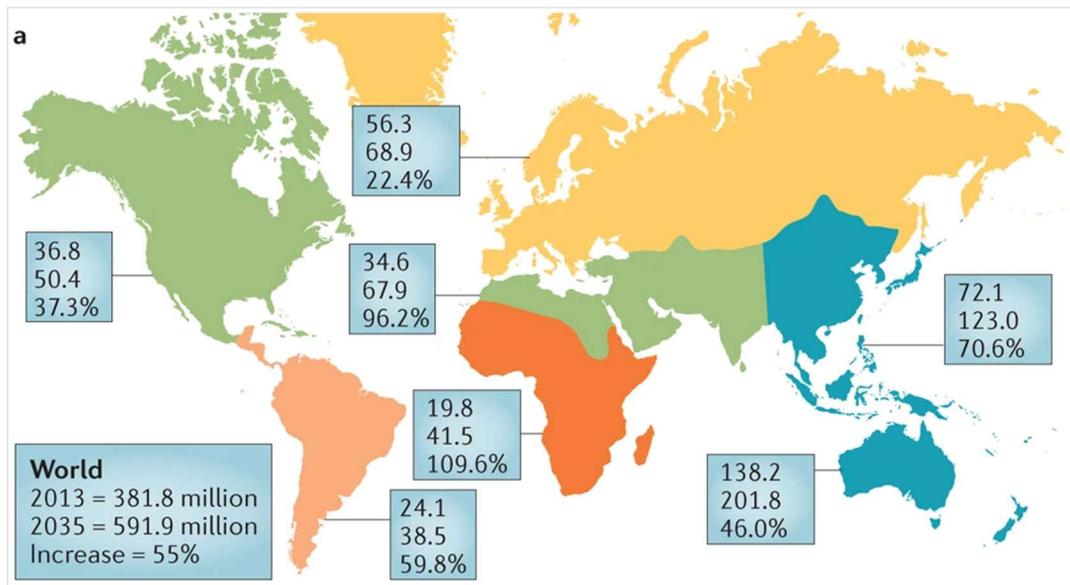


Figura 3. In ogni riquadro, i valori in alto rappresentano il numero di persone con T2DM in milioni nel 2013, mentre i numeri centrali sono una stima del numero di persone che si prevede avranno T2DM nel 2035. Il valore in basso è l'aumento percentuale dal 2013 al 2035 (DeFronzo et al., 2015).

Gli organi coinvolti nello sviluppo del T2DM comprendono pancreas (cellule β e cellule α), fegato, muscolo scheletrico, reni, cervello, intestino tenue e tessuto adiposo (Galicia-Garcia et al., 2020).

Le cellule β , come già detto in precedenza, sono responsabili della produzione di insulina, che viene inizialmente sintetizzata come pre-proinsulina. Nel corso della maturazione, la pre-proinsulina subisce una modificazione conformazionale nel reticolo endoplasmatico (RE) guidata da diverse proteine al fine di produrre la pro-insulina. Quest'ultima viene trasportata in vescicole secretorie immature dal RE all'apparato del Golgi dove viene scissa in peptide C e insulina (*Figura 4*). L'insulina matura viene immagazzinata in granuli fino ad un segnale che consente il suo rilascio, come elevate concentrazioni di glucosio nel sangue (Galicia-Garcia et al., 2020).

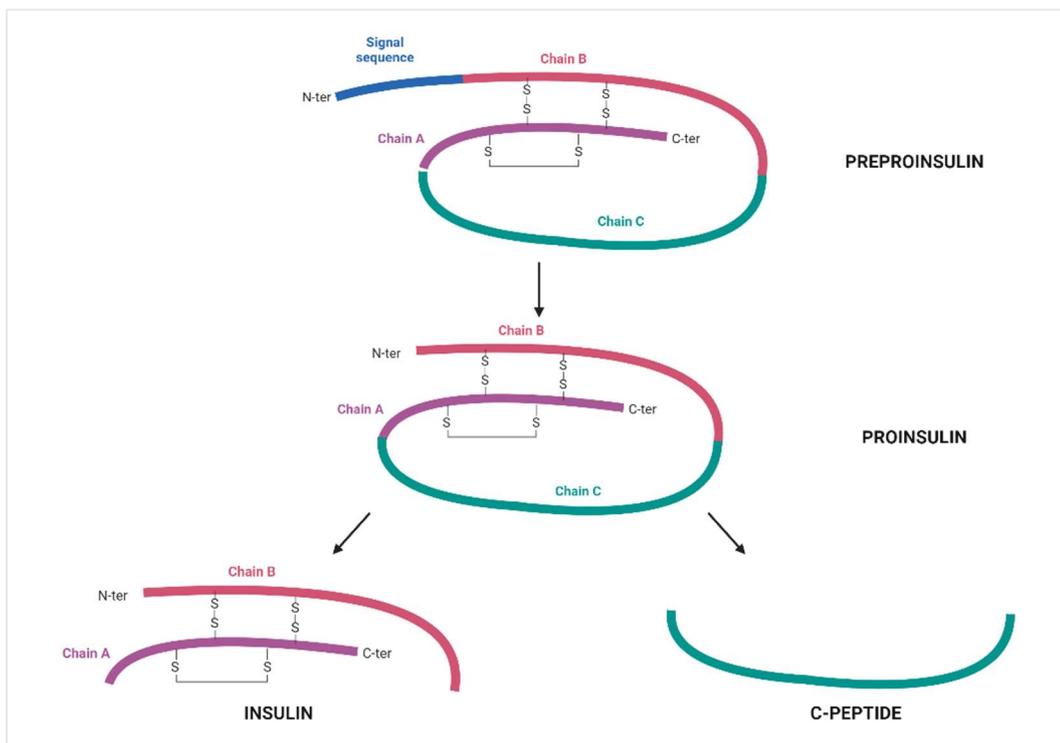


Figura 4. Processo di sintesi dell'insulina (Created with BioRender.com).

È essenziale che i meccanismi molecolari coinvolti nella sintesi, nel rilascio dell'insulina e nella sua interazione con i tessuti siano accuratamente regolati al fine di soddisfare le esigenze metaboliche. Difetti in questi meccanismi possono causare uno squilibrio metabolico, contribuendo alla patogenesi T2DM. Questa patologia è influenzata sia da fattori genetici che ambientali ed è caratterizzata da cambiamenti fisiopatologici come la disfunzione delle cellule β , la resistenza all'insulina e l'infiammazione cronica. Questi fattori ostacolano gradualmente il controllo dei livelli di glucosio nel sangue, portando allo sviluppo di complicanze micro e macrovascolari (Galicia-Garcia et al., 2020; DeFronzo et al., 2015).

I sintomi del diabete di tipo 2 possono essere lievi o assenti, il che significa che individui affetti da questa malattia possono vivere diversi anni con questa condizione prima che venga diagnosticata. I sintomi includono: sete eccessiva e bocca secca, minzione frequente, stanchezza, guarigione delle ferite lenta, infezioni ricorrenti della pelle, visione offuscata e formicolio o intorpidimento alle mani e ai piedi. Per controllare i livelli di glucosio nel sangue, il trattamento prevede un'alimentazione corretta, attività fisica ed in alcuni casi anche la

somministrazione di insulina nel caso in cui non si hanno risultati positivi con i farmaci per via orale, come metformina e sulfoniluree (IDF, International Diabetes Federation).

DIABETE MELLITO GESTAZIONALE

Il diabete mellito gestazionale (GDM) è il disturbo metabolico più frequente in gravidanza, definito come una condizione medica caratterizzata da una rapida intolleranza al glucosio e resistenza all'insulina, con conseguente sviluppo di iperglicemia rilevata alla fine del secondo trimestre (13-26 settimane complete di gestazione) o all'inizio del terzo trimestre di gravidanza (27-40 settimane) (McIntyre et al., 2019).

Epidemiologia

Secondo i dati diffusi da IDF nel 2021, circa 21,1 milioni di nati vivi, ovvero il 16,7%, ha avuto qualche forma di iperglicemia durante la gravidanza (IDF, International Diabetes Federation).

La prevalenza del GDM è differente tra i diversi Paesi (*Figura 5*), ma anche tra regioni di uno stesso paese, a seconda dell'etnia e dello stato socio-economico degli individui. Un gran numero di casi di diabete gestazionale si riscontra in fasce di popolazioni che hanno accesso solo a cure prenatali di base in cui vi è una mancata diagnosi di diabete gestazionale con esiti infausti sia per la madre che per il bambino (Ray, 2020).



Figura 5. Prevalenza del GDM dal 2005 al 2018. I numeri rappresentano la mediana in percentuale con i rispettivi intervalli interquartili. La prevalenza risulta essere più alta in Medio Oriente e in alcuni paesi del Nord Africa, seguita dal Sud-Est asiatico, Pacifico occidentale, America meridionale e centrale, Africa sub-sahariana, Nord America e Caraibi. La prevalenza più bassa e la variazione più ampia nella prevalenza si osservano in Europa (McIntyre et al., 2019).

Fisiopatologia

Con il progredire di una gravidanza sana, il corpo della madre subisce una serie di cambiamenti fisiologici a carico dei sistemi cardiovascolare, renale, ematologico, respiratorio e metabolico regolati anche dalla funzione endocrina della placenta. Tra queste alterazioni si verifica un'insulino-resistenza materna, che aumenta i livelli di glucosio nel sangue della madre, e di conseguenza, garantisce un adeguato apporto di glucosio al feto in via di sviluppo (Plows et al., 2018).

Durante una gravidanza normale si verifica una progressiva diminuzione del 50-60% della sensibilità all'insulina che comporta un aumento di acidi grassi e glucosio circolanti per soddisfare le richieste energetiche del feto in via di sviluppo. (Lekva et al., 2016; Nguyen-Ngo et al., 2019).

Studi effettuati su modelli animali hanno rilevato che per mantenere l'euglicemia materna, le donne gravide apportano delle modificazioni alle cellule β , come ipertrofia e iperplasia, portando ad una maggior secrezione di insulina stimolata dal glucosio al fine di contrastare l'eccessivo passaggio di glucosio al feto (Plows et al., 2018).

Un'eccessiva resistenza all'insulina, ovvero l'incapacità dei tessuti di rispondere all'ormone, e la carente secrezione di insulina da parte delle cellule β pancreatiche interrompono la modulazione fisiologica del metabolismo del glucosio mediato dalla gravidanza causando lo sviluppo del diabete mellito gestazionale (Vrachnis et al., 2012). Le donne affette da GD mostrano una riduzione della funzionalità delle cellule β del 30-70%, che le rende incapaci di compensare l'aumento della resistenza all'insulina (Nguyen-Ngo et al., 2019).

Lo stato di resistenza all'insulina che si viene a creare porta anche alla produzione endogena di glucosio e alla degradazione dei depositi di grasso con un maggior aumento di glucosio nel sangue e di acidi grassi liberi (FFA) (Plows et al., 2018).

Durante la gravidanza, molti assi ormonali sono influenzati dalla placenta che secerne e immette nella circolazione materna ormoni specifici come la gonadotropina corionica umana (hCG), il lattogeno placentare umano (hPL) e l'ormone della crescita placentare umano (hPGH). Gli ultimi due, insieme ad altri ormoni locali e placentari quali estrogeni, progesterone, leptina e, cortisolo, promuovono l'insorgenza di uno stato di insulino-resistenza, che si osserva a livelli massimi nel terzo trimestre di gravidanza, impedendo l'ingresso dell'insulina nei tessuti periferici. Di conseguenza, il glucosio nel sangue risulta essere leggermente elevato e viene facilmente trasportato attraverso la placenta, via di comunicazione tra l'ambiente materno e quello fetale, per alimentare la crescita del feto (Plows et al., 2018).

Screening

Lo screening e la diagnosi di diabete gestazionale sono variegati e fino ad oggi non si è riusciti a trovare un'unica linea guida universale. A questo si aggiunge il fatto che sia il diabete gestazionale che il diabete mellito di tipo 2 dipendono dall'etnia.

Le linee guida americane e canadesi si basano su uno screening in due fasi. Un primo test della glicemia di 1 ora prevede la somministrazione di 50 g di glucosio: le donne che risultano essere positive con valori >140 mg/dL vengono sottoposte ad un secondo test di tolleranza del glucosio orale (OGTT) con 100 g, mentre quelle con 2 o più valori anomali di glucosio nel sangue ricevono la diagnosi di

diabete gestazionale. Le linee guida del National Institute for Health and Care Excellence (NICE) del Regno Unito e Australia, raccomandano uno screening basato sul rischio. L'OGTT di 2 ore prevede la somministrazione di 75 g di glucosio. Viene diagnosticato il diabete gestazionale a donne che mostrano glicemia a digiuno ≥ 126 mg/dL e glicemia postprandiale (PP) ≥ 140 mg/dL. Una terza linea guida è quella sviluppata nel 2010 dall'International Association of Diabetes and Pregnancy Study Group (IADPSG) e riconosciuta nel 2013 dall'OMS e dalla Federazione Internazionale di Ginecologia e Ostetricia (FIGO) che dispone l'esecuzione di un test tra la 24esima e la 28esima settimana di gestazione. Il test si effettua con l'assunzione di 75 g di glucosio per via orale disciolti in 300 mL di acqua, indipendentemente dal fatto che la gestante sia a digiuno o non a digiuno. Dopo 2 ore, si effettua la misurazione dei livelli di glucosio nel sangue mediante un glucometro standardizzato per il plasma. Se la madre vomita entro 30 minuti dall'assunzione di glucosio, il test viene ripetuto il giorno seguente, al contrario si continua. Per la diagnosi di GDG vengono considerati valori ≥ 126 mg/dL a digiuno e ≥ 140 mg/dL in fase postprandiale (Siddiqui et al., 2019).

Lo screening per il GDM rimane una fase fondamentale per la diagnosi precoce della malattia. A tal proposito, la possibilità di identificare dei biomarcatori per la prevenzione e il monitoraggio del GDM risulta essere di grande importanza per prevedere il disturbo prima che si manifesti clinicamente. Recentemente, sono stati identificati diversi biomarcatori correlati all'insulina-resistenza, all'infiammazione cronica e all'alterazione della funzione placentare tipici del GDM, tra cui ad esempio, specifici miRNA coinvolti nella modulazione dell'espressione genica (Ray, 2020).

Le donne alle quali viene diagnosticato il diabete gestazionale, vengono innanzitutto sottoposte a terapia nutrizionale medica (MNT) associata ad esercizio fisico per 2 settimane. Dopo il primo approccio terapeutico, si esegue un test della glicemia postprandiale (PPBS): se dopo 2 ore i livelli di glucosio nel sangue sono al di sotto dei 120 mg/dL, il test deve essere ripetuto secondo il protocollo per le gravidanze ad alto rischio con otto test (almeno un test al mese durante il secondo e terzo trimestre). Se la PPBS a 2 ore è ≥ 120 mg/dL, si ricorre alla

somministrazione di metformina o insulina. La terapia insulinica può essere iniziata in qualsiasi momento della gravidanza, mentre il trattamento con metformina è sicura ed efficace dopo la 20esima settimana di gestazione, se la MNT da sola non è in grado di controllare la glicemia (Siddiqui et al., 2019).

Fattori di rischio

Sono stati identificati diversi fattori di rischio modificabili e non modificabili per il GDM (Ray, 2020):

- **Obesità ($BMI \geq 30 \text{ kg/m}^2$):** Il rischio di GDM è aumentato di quasi 3 volte nelle donne con obesità di classe I ($BMI 30-34,99 \text{ kg/m}^2$) e di 4 volte nelle donne con obesità di classe II ($BMI 35-39,99 \text{ kg/m}^2$), rispetto alle donne con $BMI < 30 \text{ kg/m}^2$;
- **Sovrappeso materno ($BMI \geq 25-29,99 \text{ kg/m}^2$);**
- **Etnia:** asiatici del sud e dell'est, gli ispanici, i neri e i nativi americani, gli aborigeni, gli isolani dello Stretto di Torres e i mediorientali sono associati ad un rischio maggiore di insorgenza di GDM;
- **Sindrome dell'ovaio policistico;**
- **Prediabete;**
- **Precedente storia di GDM:** fattore di rischio più forte;
- **Storia familiare di diabete di tipo 2;**
- **Precedente storia di morte fetale;**
- **Donne che hanno già dato alla luce un bambino di peso pari o superiore a 4 kg (macrosomia);**
- **Ètà materna > 35 anni;**
- **Carenza di vitamina D;**
- **Livello HDL inferiore a 35 mg/dL ;**
- **Livello di trigliceridi superiore a 250 mg/dL ;**
- **Inattività fisica;**
- **Emoglobina A1c superiore al $5,7\%$;**
- **Test di tolleranza al glucosio alterata;**
- **Alterata glicemia a digiuno;**

- Storia di malattie cardiovascolari;
- Altre condizioni cliniche associate alla resistenza all'insulina.

Conseguenze del GDM

Il GDM non diagnosticato, non monitorato e non controllato porta ad una grave morbilità e mortalità materna e fetale. Il GDM comporta notevoli rischi per la salute a breve e lungo termine della madre, del feto in via di sviluppo e dei bambini nati da madri con GDM. I rischi a breve termine per il feto includono la macrosomia, la distocia di spalla, il trauma da parto e l'ipoglicemia nel periodo post-partum. Tra i rischi a lungo termine per la prole nata da madri con GDM c'è l'aumento del tasso di obesità nell'infanzia e nell'età adulta e un aumento del rischio di sviluppare patologie cardiometaboliche (Ray, 2020).

Nella madre, il GDM è associato ad un aumentato rischio di depressione prenatale, di parto pretermine e preeclampsia. Tra gli effetti a lungo termine, circa il 60% delle donne con una storia passata di GDM sviluppa il T2DM. L'infiammazione cronica associata allo sviluppo del diabete mellito gestazionale (GDM) può rappresentare il collegamento fisiopatologico tra il GDM e il rischio di sviluppo futuro di T2DM e di malattie cardiovascolari (CVD) nella madre (Lekva et al., 2016).

Nello specifico, studi recenti mostrano che il sistema vascolare delle donne con un precedente caso di GDM è permanentemente alterato, predisponendole allo sviluppo di malattie cardiovascolari (CVD) (Plows et al., 2018).

EPIGENETICA E MEMORIA NEL DIABETE

Come già noto, il diabete è associato ad un aumento del rischio di complicanze micro- e macro-vascolari. Numerosi studi clinici hanno evidenziato che le alterazioni indotte da uno stato iperglicemico persistono anche dopo il ripristino dei livelli normali di glucosio portando a condizioni tipiche del diabete come infiammazione e stress ossidativo. Questo fenomeno viene descritto come

“memoria metabolica” ed indica la persistenza delle complicanze del diabete nonostante il raggiungimento di un buon controllo glicemico.

Diversi studi indicano che la memoria metabolica potrebbe derivare dalle "modificazioni epigenetiche" indotte dall'iperglicemia, soprattutto nelle cellule endoteliali. Questi elementi epigenetici potrebbero costituire nuovi obiettivi per la terapia personalizzata e aprire la strada alla medicina di precisione nel trattamento del diabete (Coco et al., 2019).

L'epigenetica si occupa dello studio dei cambiamenti ereditabili e stabili nell'espressione genica che avvengono tramite alterazioni nel cromosoma piuttosto che nella sequenza del DNA. I meccanismi epigenetici non alterano direttamente la sequenza del DNA, ma possono regolare l'espressione genica attraverso modifiche chimiche delle basi del DNA e cambiamenti nella sovrastruttura cromosomica in cui è confezionato il DNA (Aboud et al., 2023).

Il DNA cromosomico nucleare carico negativamente è impacchettato attorno ad un ottamero di proteine istoniche cariche positivamente costituito da 2 coppie delle proteine istoniche H2A, H2B, H3 e H4 a formare un complesso proteico chiamato nucleosoma (unità base della cromatina). I nucleosomi di un polimero di DNA continuo sono collegati tra loro dal DNA linker e il complesso è stabilizzato dalla proteina istonica H1. L'aggregazione della cromatina porta alla formazione di un cromosoma. La cromatina esiste come eucromatina rilassata, accessibile ai fattori di trascrizione (TF) e quindi trascrizionalmente attiva, o come eterocromatina densa, inaccessibile ai TF e trascrizionalmente inattiva (Aboud et al., 2023).

Oltre al legame dei TF ai promotori e ai classici meccanismi di trascrizione, la regolazione genica può anche essere influenzata da cambiamenti epigenetici che alterano la struttura della cromatina attraverso il rimodellamento dei nucleosomi (Natarajan, 2021).

I meccanismi epigenetici comportano una temporanea attivazione o repressione dell'espressione genica. Tali cambiamenti possono essere indotti da diversi fattori, tra cui età, dieta, fumo, stress e malattie e possono ripercuotersi sulla regolazione genica e sui fenotipi mediando vari disturbi patologici, come cancro e diabete.

I tre principali meccanismi dell'epigenetica sono la metilazione del DNA, le modifiche degli istoni e la regolazione mediata da RNA (Figura 6) (Natarajan, 2021).

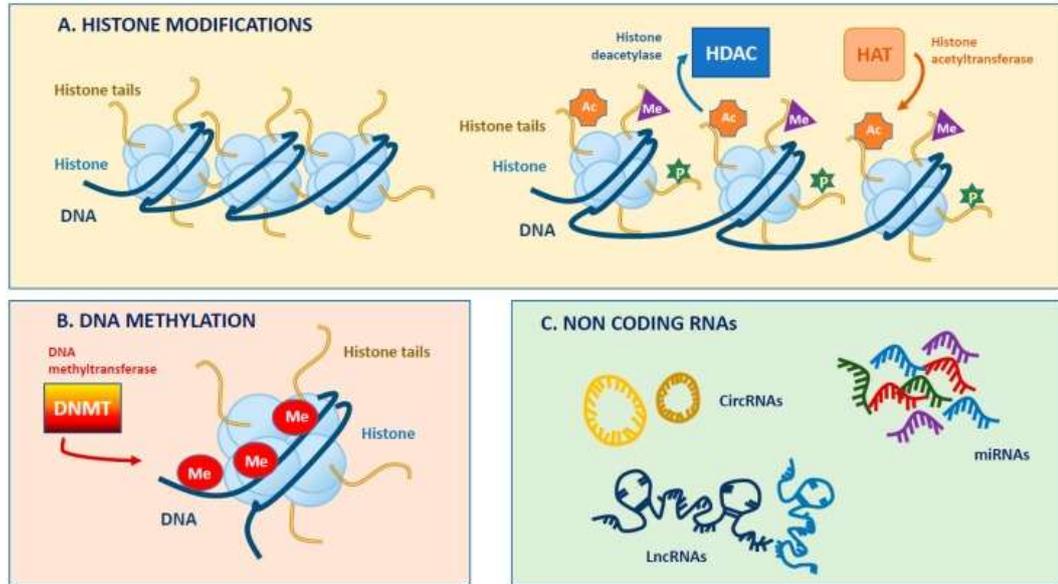


Figura 6. Principali meccanismi di regolazione epigenetica (Coco et al., 2019).

Si tratta di modifiche reversibili, che persistono attraverso cicli multipli di replicazione cellulare, ma raramente permangono per generazioni negli esseri umani. Tuttavia, studi recenti indicano la possibile trasmissibilità di alcune modifiche epigenetiche alla prole nell'ambito di varie patologie, incluso il diabete. Benché vi sia necessità di ampliare le conoscenze su tali aspetti, la comprensione di questi meccanismi potrebbe contribuire ad una maggiore conoscenza dei fattori associati all'insorgenza di alterazioni fenotipiche patologiche nei figli di donne affette da diabete gestazionale, spesso associate ad alterazioni epigenetiche a carico del sistema vascolare sia nella donna che nel bambino (Xavier et al., 2019).

L'ENDOTELIO VASCOLARE

MORFOLOGIA E FISIOLOGIA

L'endotelio vascolare è la struttura più interna che riveste le pareti di arterie, vene e capillari ed è in stretto contatto con i componenti e le cellule del sangue. È caratterizzato dalla presenza di cellule endoteliali, descritte per la prima volta nel 1865 come monostrato cellulare che insieme alla lamina basale costituisce l'intima vascolare. Si tratta di cellule sottili e allungate con una lunghezza di circa 30-50 μm , una larghezza di 10-30 μm e uno spessore di 0,1-10 μm . Sono cellule polarizzate in quanto la loro membrana luminale è esposta ai costituenti del sangue e alle cellule circolanti, mentre la membrana basolaterale è separata dai tessuti circostanti da una membrana basale glicoproteica (Medina-Leyte et al., 2020).

L'endotelio vascolare è un organo autocrino e paracrino, le cui cellule producono diverse molecole vasculoregolatrici e vasculotropiche che agiscono in siti locali e distanti. Le molecole vasculoregolatrici, come l'ossido nitrico (NO), l'endotelina (ET-1), la prostaciclina (PGI₂) e l'angiotensina II, regolano la funzione dei vasi sanguigni e influenzano la vasocostrizione, la vasodilatazione e la permeabilità vascolare. Mentre, le molecole vasculotropiche, come il fattore di crescita dell'endotelio vascolare (VEGF), il fattore di crescita dei fibroblasti (FGF), il fattore di crescita dell'epidermide (EGF) promuovono la proliferazione e la migrazione delle cellule endoteliali, contribuendo così alla formazione di nuovi vasi sanguigni o al loro ripristino. L'endotelio vascolare non funziona solo come barriera tra sangue e organi, ma partecipa ad una vasta gamma di funzioni fisiologiche come il mantenimento dell'omeostasi vascolare, il controllo del tono dei vasi sanguigni, il mantenimento della fluidità del sangue, regola la crescita cellulare locale e la deposizione della matrice extracellulare. È implicato anche nel trasferimento di nutrienti, ormoni, globuli bianchi e nella risposta infiammatoria (Medina-Leyte et al., 2020).

In virtù di tali implicazioni, l'alterazione funzionale dell'endotelio vascolare costituisce un evento primario nell'insorgenza e nella progressione di numerose patologie umane, tra cui l'aterosclerosi, il diabete, le malattie cardiovascolari, i

disturbi infiammatori e autoimmuni e la neurodegenerazione (Medina-Leyte et al., 2020).

DISFUNZIONE ENDOTELIALE

Le cellule endoteliali sane mantengono l'omeostasi vascolare attraverso il controllo della permeabilità, dell'infiammazione, del tono vascolare e della riparazione delle lesioni. Tuttavia, quando le cellule endoteliali sono esposte a livelli alterati di glucosio, diventano disfunzionali.

Nello specifico, in condizioni fisiologiche il glucosio entra nella cellula attraverso il recettore GLUT-1, indipendentemente dai livelli di insulina. La produzione di energia per il funzionamento dei trasportatori del glucosio, nella normale funzione endoteliale, parte del glucosio-6-fosfato prodotto durante la glicolisi per poi essere veicolato nella via del pentoso fosfato al fine di ottenere un importante antiossidante, il NADPH, e pentosi, che possono essere utilizzati per produrre acidi nucleici, nucleotidi e amminoacidi. Tale percorso consente anche la riconversione del glutatione disolfuro (GSSG) in glutatione (GSH), che aiuta a prevenire lo stress ossidativo convertendo H_2O_2 in H_2O . In una condizione di iperglicemia, l'ingresso del glucosio-6-fosfato nella via del pentoso fosfato è inibito. Questa inibizione porta ad una riduzione della produzione di NADPH e un accumulo di H_2O_2 , contribuendo allo stress ossidativo e alla disfunzione endoteliale nelle cellule endoteliali diabetiche (Knapp et al., 2019).

A tali alterazioni si associa inoltre una ridotta produzione o biodisponibilità di ossido nitrico (NO), essenziale per l'omeostasi vascolare nelle cellule endoteliali. Questo disequilibrio porta ad una risposta vasodilatatoria compromessa e ad un endotelio protrombotico e proinfiammatorio. La ridotta disponibilità di NO, causata da una diminuzione della produzione di NO e/o dall'aumento della sua degradazione da parte dell'anione superossido, segna l'inizio della disfunzione endoteliale.

La disfunzione endoteliale è strettamente correlata all'infiammazione, processo guidato dal rilascio di citochine quali IL-1, IL-6, TNF- α e proteina C-reattiva. Tali

citochine proinfiammatorie si legano ai rispettivi recettori, portano all'attivazione del fattore di trascrizione NF- κ B stimolando la trascrizione di chemochine e molecole di adesione come E-selectina, ICAM-1 (Molecola di adesione intercellulare 1) e VCAM-1 (Molecola di adesione cellulare vascolare 1), che avviano l'interazione tra i leucociti e l'endotelio e guidano la migrazione direzionale dei globuli bianchi verso il tessuto danneggiato (Clyne, 2021; Medina-Leyte et al., 2021).

NF- κ B è un dimero costituito da due subunità p50 e p65, normalmente sequestrate nel citosol tramite il legame con l'inibitore di NF- κ B, I κ B α . Stimoli come alti livelli di glucosio ed eccesso di ROS portano all'attivazione del complesso della chinasi I κ B (IKK) con conseguente fosforilazione e successiva degradazione di I κ B α . La dissociazione di I κ B α induce la traslocazione del dimero p50/p65 nel nucleo stimolando la trascrizione di numerosi geni bersaglio, tra cui citochine, chemochine e molecole di adesione (*Figura 7*) (Clyne, 2021; Medina-Leyte et al., 2021).

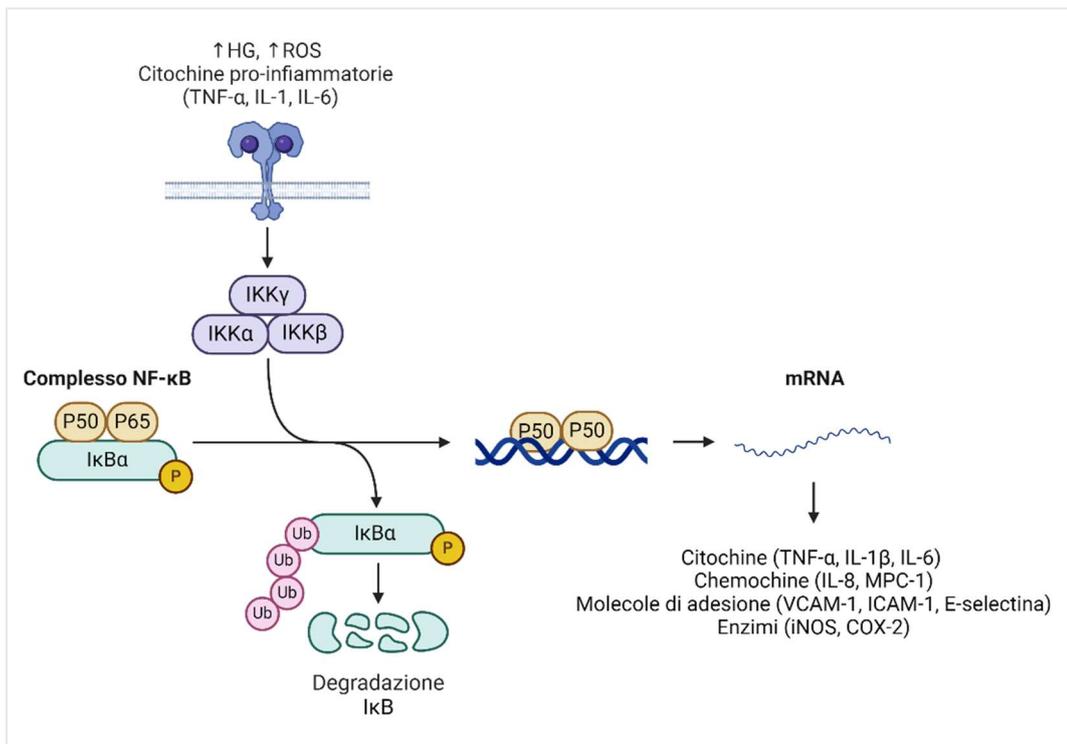


Figura 7. Vie di trasduzione del segnale NF- κ B (Created with BioRender.com).

Nello specifico, per attivare la segnalazione cellulare nei leucociti circolanti, VCAM-1 deve essere prima prodotto e poi esposto sulla superficie delle cellule endoteliali. Solo in seguito interagisce con l'integrina presente sulla superficie di tali cellule provocando il rimodellamento dell'actina e la rottura delle giunzioni delle cellule endoteliali. Ciò rende più facile la migrazione dei leucociti dalla circolazione sanguigna ai siti di lesione (Figura 8) (Kong et al., 2018; Singh et al., 2023).

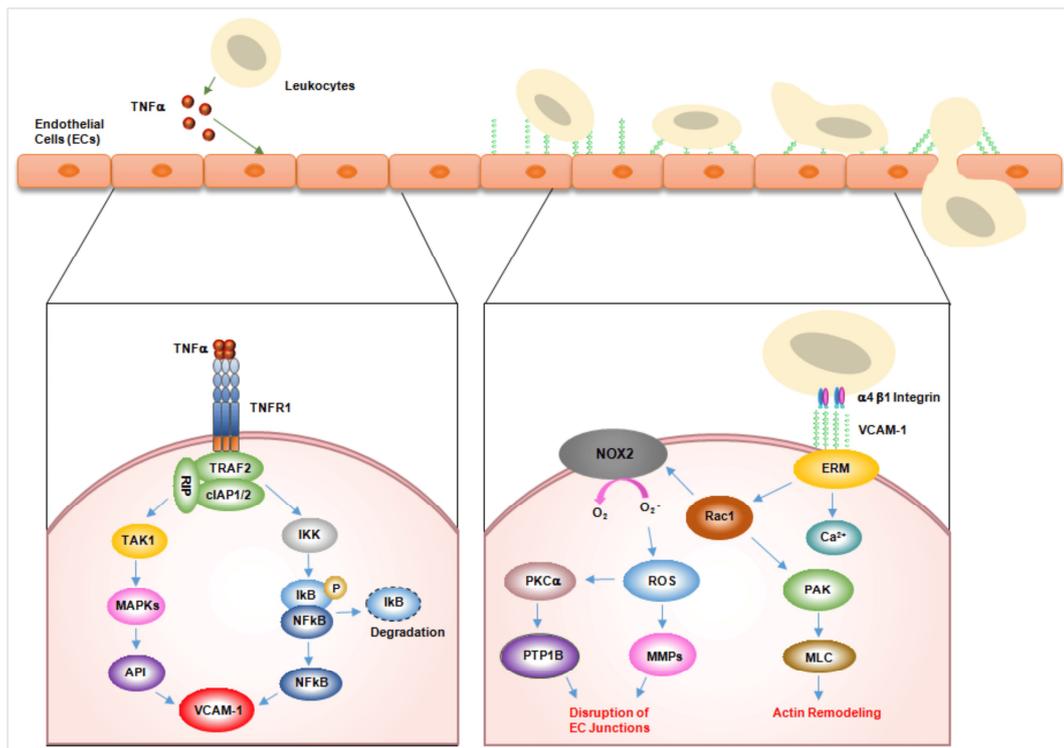


Figura 8. Meccanismo di adesione dei leucociti mediata dalla molecola di adesione cellulare vascolare 1 (VCAM-1) e migrazione transendoteliale attraverso le cellule endoteliali. Nell'infiammazione, il $TNF\alpha$, secreto principalmente dai leucociti, porta ad una sovraregolazione dell'espressione di VCAM-1 sulla superficie delle cellule endoteliali. VCAM-1 interagisce direttamente con l'integrina $\alpha4\beta1$ sui leucociti. A sua volta, questa interazione attiva molecole di segnalazione a valle di VCAM-1, tra cui Ca^{2+} , Rac1, NOX2, ROS, MMP, PKC α e PTP1B. Questa via di trasduzione del segnale porta all'indebolimento delle giunzioni cellulari delle cellule endoteliali, facilitando la migrazione transendoteliale dei leucociti in uno stato infiammatorio (Kong et al., 2018).

Le citochine infiammatorie, oltre ad avere un impatto sulla biodisponibilità dell'NO, modulano i livelli di superossido influenzando l'espressione e l'attività sia di eNOS (ossido nitrico sintetasi) che di NADPH, promuovendo di

conseguenza lo stress ossidativo caratterizzato da un'umentata produzione di ROS (specie reattive dell'ossigeno). Lo squilibrio, quindi, tra la generazione di ROS e i sistemi di difesa antiossidanti rappresenta la causa principale della disfunzione endoteliale, che porta al danno vascolare sia nelle malattie metaboliche che aterosclerotiche (Medina-Leyte et al., 2021).

I meccanismi molecolari che coinvolgono lo stress ossidativo nella disfunzione endoteliale comprendono anche il disaccoppiamento di eNOS da parte delle specie reattive dell'ossigeno e dell'azoto, la sovra-regolazione dell'espressione di ET-1 con successiva produzione di superossido/perossido di idrogeno e l'attivazione della NADPH ossidasi (Nox1 o Nox2) tramite l'angiotensina II (Medina-Leyte et al., 2021).

Alla luce dei meccanismi patologici, l'alterazione funzionale dell'endotelio vascolare costituisce un evento primario nella patogenesi del processo aterosclerotico alla base delle patologie cardiovascolari. L'aterosclerosi è una diffusa malattia infiammatoria cronica della parete arteriosa che molto spesso porta a disabilità e, in alcuni casi, a morte. Nelle fasi finali, l'aterosclerosi si manifesta come una lesione a livello dell'intima della parete arteriosa e un accumulo di placche. La successiva erosione o rottura di queste innesca eventi trombotici che possono essere potenzialmente fatali. L'aterosclerosi è associata ad un alterato metabolismo lipidico e ipercolesterolemia; infatti, un livello elevato di lipoproteine a bassa densità (LDL) circolanti è un noto fattore di rischio di malattie cardiovascolari. Tuttavia, la patogenesi della malattia sembra essere più complessa coinvolgendo molteplici fattori, dove un ruolo importante è giocato dall'infiammazione e la disfunzione endoteliale correlata. È stato infatti dimostrato che i pazienti diabetici hanno un rischio maggiore e uno sviluppo accelerato dell'aterosclerosi dimostrando come le alterazioni associate a questa patologia e il diabete mellito siano collegati da meccanismi patologici comuni (Poznyak et al., 2020).

Per questi motivi, lo studio dell'endotelio umano ha assunto un ruolo centrale nella ricerca cardiovascolare e, la ricerca clinica si è concentrata sul chiarire il ruolo della disfunzione endoteliale nell'influenzare la progressione delle patologie vascolari (Medina-Leyte et al., 2020).

In generale, studi su modelli *in vitro* mediante l'utilizzo di colture cellulari specifiche hanno portato a progressi accelerati nella comprensione di molte malattie, alla proposta di nuove terapie e allo sviluppo di nuovi metodi diagnostici. Inoltre, negli ultimi anni lo sviluppo di nuovi modelli 3D ha permesso di riprodurre la complessa struttura 3D dei tessuti, consentendo lo studio dei meccanismi e delle interazioni molecolari degli organismi a diversi livelli: molecole, cellule e organi, sia in condizioni normali che patologiche (Medina-Leyte et al., 2020).

Nello specifico, negli ultimi anni sono stati condotti numerosi studi utilizzando cellule endoteliali derivanti dalla vena del cordone ombelicale umano (HUVEC), considerate un prezioso modello *in vitro* per lo studio della fisiologia e della patologia delle cellule endoteliali vascolari.

CELLULE ENDOTELIALI DA VENA DI CORDONE OMBELICALE UMANO (HUVEC)

Le cellule endoteliali derivate dalla vena del cordone ombelicale umano (HUVEC - Human Umbilical Vein Endothelial Cells) sono uno tra i modelli *in vitro* maggiormente utilizzati nella ricerca poiché le vene ombelicali umane, dalle quali vengono estratte, sono relativamente più disponibili rispetto ad altri tipi di vasi sanguigni. L'interesse per questo modello cellulare ci fu tra il 1922, anno in cui fu descritta per la prima volta tale tipologia cellulare, e il 1973, anno del suo isolamento mediante tecniche morfologiche, immunoistologiche e sierologiche eseguite da Eric A. Jaffe. Solo nel 1987 il modello fu proposto per comprendere la patogenesi delle malattie cardiovascolari (CVD) e di altri eventi patologici e fisiologici (Medina-Leyte et al., 2020).

La caratterizzazione morfologica di queste cellule ci fu per la prima volta nel 1973 ad opera di Eric A. Jaffe mediante l'utilizzo del microscopio elettronico a trasmissione. Le cellule endoteliali della vena del cordone ombelicale caratterizzate mediante microscopia elettronica a trasmissione (TEM) presentano nuclei ovali e prominenti al centro con cromatina condensata e da uno a tre nucleoli all'interno di ciascun nucleo. Formano un monostrato uniforme di cellule poligonali con dimensioni di 30x50 μm e appaiono piatte e sottili con vescicole citoplasmatiche e pinocitiche. Il citoplasma contiene anche ribosomi liberi, reticolo endoplasmatico liscio e ruvido, mitocondri con forme tubulari, fibrille e microtubuli (*Figura 9*) (Medina-Leyte et al., 2020).

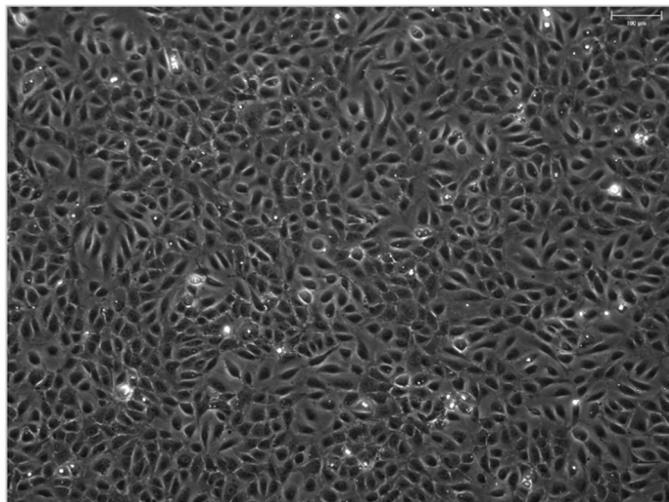


Figura 9. Morfologia cellule HUVEC.

IL CORDONE OMBELICALE

Il cordone ombelicale umano (HUC) o funicolo ombelicale è una struttura anatomica che garantisce un'alimentazione adeguata, l'ossigenazione fetale e la corretta eliminazione dei rifiuti durante i nove mesi di gravidanza (*Figura 10A*). La formazione del cordone ombelicale avviene in una fase molto precoce dello sviluppo embrionale, più precisamente durante la quinta settimana gestazionale. Al termine della gravidanza raggiunge un peso di circa 40 g; la sua lunghezza varia in base al sesso e l'età gestazionale, tuttavia in media vengono considerati normali valori compresi tra i 35 e i 70 cm. Al variare della durata della gestazione, anche lo spessore subisce cambiamenti, ma in media un cordone presenta un diametro di 1,5 cm (Medina-Leyte et al., 2020; Sánchez-Trujillo et al., 2022).

A livello istologico, il cordone ombelicale è caratterizzato dalla presenza di tre vasi sanguigni (*Figura 10B*): due arterie e una vena con caratteristiche differenti. Entrambe sono immerse in una matrice mucosa extracellulare di tessuto connettivo denominata gelatina di Wharton ricca di acqua, proteoglicani idrofili, acido ialuronico e diverse isoforme di collagene. La gelatina di Wharton deriva dall'allantoide, un annesso embrionale, a sua volta rivestita da uno strato unicellulare dell'amnio. Conferisce elasticità, flessibilità e forza al cordone ombelicale prevenendo la lacerazione e la compressione dei vasi e impedendo loro di aggregarsi (Sánchez-Trujillo et al., 2022).

Le due arterie ombelicali, che circondano la vena in modo elicoidale, trasportano il sangue deossigenato dal feto alla madre, originano dalle arterie iliache interne e convergono nelle arterie coriali della placenta. Sono caratterizzate da un piccolo lume, uno strato intermedio muscolare, uno strato circolare esterno e sono prive di lamina elastica interna. Dalle vene coriali si sviluppa la vena ombelicale responsabile dell'apporto di sangue ossigenato al feto. Presenta un lume più ampio, uno strato interno elastico e uno strato muscolare circolare lasso. Durante l'embriogenesi si sviluppano due vene ombelicali, ma normalmente la vena ombelicale destra degenera con il progredire dello sviluppo embrionale (Sánchez-Trujillo et al., 2022).

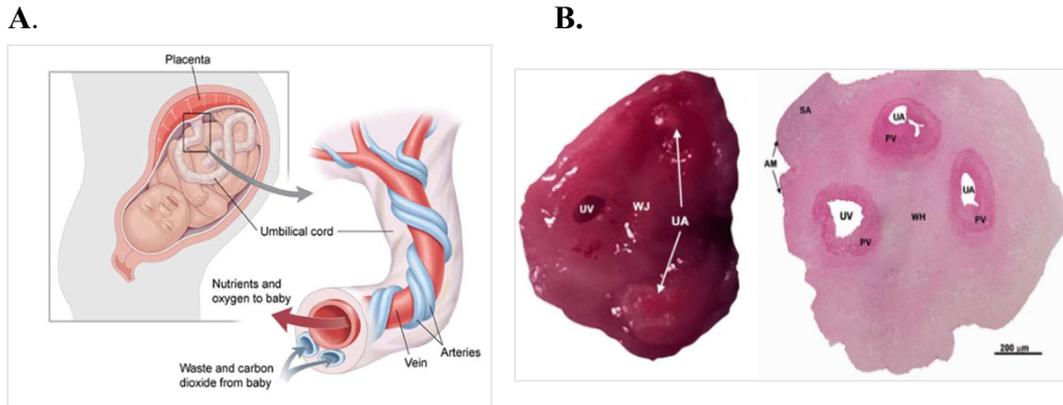


Figura 10. Struttura anatomica e funzionale del cordone ombelicale (A) (Photo credit: Jonathan Dimes for BabyCenter). Rappresentazione istologica di una sezione di cordone ombelicale (B) (Medina-Leyte et al., 2020). WJ: Wharton's jelly (gelatina di Wharton); UV: umbilical vein (vena ombelicale); UA: umbilical arteries (arteria ombelicale).

CARATTERIZZAZIONE FENOTIPICA

Le cellule endoteliali umane della vena del cordone ombelicale presentano diversi marcatori cellulari che possono essere identificati nel citoplasma o nella membrana utilizzando anticorpi specifici (*Figura 11*).

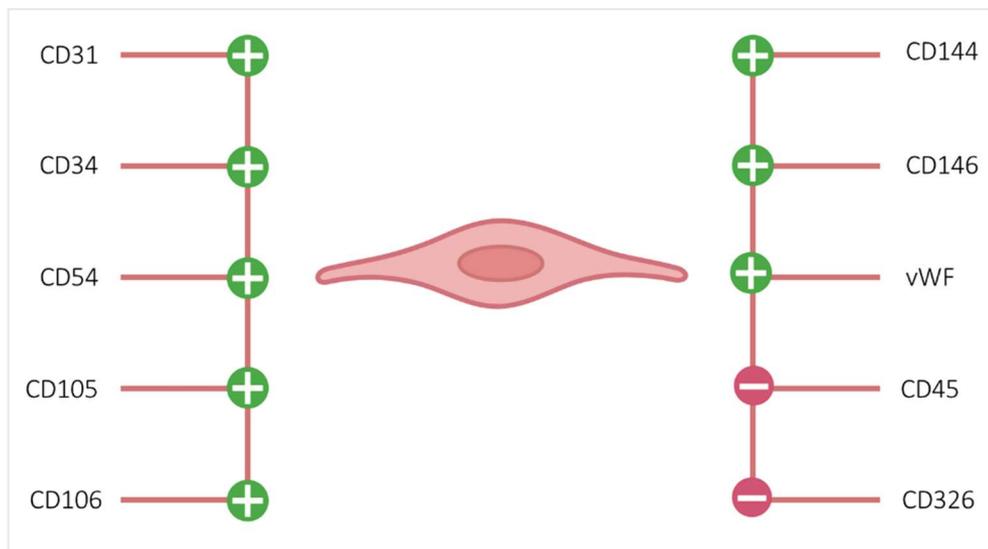


Figura 11. Marcatori cellulari delle cellule HUVEC (Created with BioRender.com).

Tra i principali marcatori espressi dalle cellule endoteliali possono essere elencati i seguenti:

- **CD31/PECAM-1** → Cluster of differentiation 31, noto anche come molecola di adesione delle cellule endoteliali piastriniche (Platelet endothelial cell adhesion molecule). È una glicoproteina transmembrana espressa da cellule endoteliali, piastrine, macrofagi, cellule di Kupffer, granulociti, cellule T/NK, linfociti, megacariociti, osteoclasti, neutrofili e alcuni tumori. È coinvolto nella regolazione dell'adesione tra EC (cellule endoteliali) e tra EC e leucociti. Svolge un ruolo chiave nella rimozione dei neutrofili invecchiati dal corpo, nel reclutamento dei neutrofili nelle risposte infiammatorie, nella migrazione transendoteliale dei leucociti, nonché nello sviluppo cardiovascolare. Inoltre, è stato dimostrato che l'espressione di CD31 è sovraregolata dalla stimolazione dell'LPS e potrebbe funzionare come un regolatore a feedback negativo della risposta infiammatoria dell'LPS nei macrofagi (Medina-Leyte et al., 2020).
- **CD144** → Cluster of differentiation 144, conosciuta anche come VE-cadherin (vascular endothelial cadherin). È una glicoproteina transmembrana di adesione Ca^{2+} -dipendente che promuove il contatto emofilico cellule-cellula. In tale modo garantisce il mantenimento di una barriera endoteliale restrittiva. Inoltre, la VE-caderina è indispensabile per il corretto sviluppo vascolare con lo scopo di mantenere i vasi neoformati (Medina-Leyte et al., 2020).
- **CD146** → Cluster of differentiation 146, noto anche come melanoma cell adhesion molecule (MCAM), è una proteina transmembrana espressa in molti tumori, cellule endoteliali, fibroblasti, cellule staminali mesenchimali. Prove recenti hanno rivelato che il CD146 legato alla membrana può agire come un recettore sulla superficie cellulare per legarsi con vari ligandi coinvolti nella trasduzione della segnalazione cellulare indipendentemente dalle proprietà di adesione (Wang et al., 2020).
- **CD105** → Chiamata anche endogлина, è un recettore per il fattore di crescita trasformante β (TGF- β). È altamente espresso nelle cellule endoteliali e svolge una funzione chiave nello sviluppo vascolare. È

coinvolta nei tre processi di generazione del microambiente tumorale, tra cui l'ontogenesi, l'infiammazione e l'accumulo di fibroblasti correlati al cancro (Li et al., 2022).

- **CD54/ICAM-1** → Molecola di adesione intercellulare 1, è una glicoproteina transmembrana presente sulla superficie cellulare espressa normalmente a bassi livelli nelle cellule immunitarie, endoteliali ed epiteliali. Dopo essere stato trascritto, ICAM-1 subisce delle modificazioni post-trascrizionali, generando mediante splicing alternativo, sei varianti legate alla membrana e una proteina solubile circolante. La sua espressione può essere indotta in seguito ad una stimolazione infiammatoria mediata da citochine. Tra le varie funzioni, ICAM-1 funge da molecola di adesione e da recettore di segnalazione in molteplici tipi di cellule al fine di innescare risposte infiammatorie, avviare la risoluzione dell'infiammazione e la guarigione e regolare la sopravvivenza e la diffusione delle cellule tumorali (Medina-Leyte et al., 2020).
- **CD106/VCAM-1** → Molecola di adesione vascolare 1, è una glicoproteina di superficie inducibile che, in una condizione infiammatoria, controlla l'adesione dei monociti all'endotelio vascolare e il movimento trans-endoteliale dei leucociti quali cellule T e macrofagi. È stato osservato che VCAM-1 è espresso anche sulla superficie di altre tipologie cellulari come macrofagi tissutali, cellule dendritiche, fibroblasti del midollo osseo, mioblasti, ovociti, cellule tumorali, cellule di Kupffer e cellule di Sertoli. La produzione di VCAM-1 è stimolata principalmente da citochine proinfiammatorie come TNF- α , lipoproteine ossidate a bassa densità (LDL), aumento delle specie reattive dell'ossigeno (ROS), elevata concentrazione di glucosio e stress (Singh et al., 2023; Kong et al., 2018).
- **vWF** → Il fattore di von Willebrand è una proteina plasmatica coinvolta nell'attivazione delle piastrine e nella regolazione della coagulazione del sangue (emostasi). Il vWF è sintetizzato dalle cellule endoteliali che rivestono i vasi sanguigni, ma anche dai megacariociti. La sua funzione principale è interagire con le altre proteine, in particolare con il fattore VIII giocando un ruolo fondamentale nell'adesione piastrinica nei siti della lesione (Medina-Leyte et al., 2020).

- **CD34** → È una proteina sialomucina transmembrana composta dall'antigene delle cellule progenitrici ematopoietiche (HPCs), dalla podocalixina e dall'endoglicano e funge da marcatore delle cellule endoteliali vascolari (ECs), delle HPCs e delle cellule progenitrici endoteliali (EPC) (Medina-Leyte et al., 2020).

Ad una caratterizzazione fenotipica, se da un lato le cellule endoteliali esprimono determinati marcatori, dall'altro devono risultare negativi per una serie di marcatori, tra cui:

- **CD45** → Cluster of differentiation 45, è una proteina espressa sulla superficie di tutte le cellule emopoietiche nucleate, cellule B, cellule T, cellule Natural Killer (NK), monociti e granulociti e dei loro progenitori, ad eccezione degli eritrociti (globuli rossi) e delle piastrine. Svolge un ruolo fondamentale nella regolazione delle vie di segnalazione cellulare che sono importanti per l'attivazione e la differenziazione delle cellule immunitarie (Rheinländer et al., 2018).
- **CD326/EpCAM** → Cluster of differentiation 326, anche nota come molecola di adesione delle cellule epiteliali. È una glicoproteina transmembrana che media l'adesione cellulare intercellulare epiteliale specifica. Dati recenti suggeriscono che EpCAM è coinvolto anche nella segnalazione cellulare, nella migrazione, nella proliferazione e nella differenziazione. EpCAM è considerato un marcatore per i tessuti epiteliali umani e per i tumori epiteliali maligni (Patriarca et al., 2012).

APPLICAZIONI SPERIMENTALI

Un modello *in vitro* deve essere in grado di riprodurre accuratamente la fisiopatologia della malattia umana oggetto di studio, e deve essere accessibile, riproducibile, facile da manipolare e conforme ad un quadro etico appropriato.

In questo contesto, il modello HUVEC riproduce in modo fisiologico l'endotelio vascolare umano, consentendo l'analisi degli effetti fisiologici e patologici di vari stimoli sia in una mono-coltura di HUVEC che in co-coltura con altri tipi cellulari, quali leucociti, e cellule muscolari lisce, ecc. permettendo lo studio di

molteplici processi fisiologici e patologici quali infiammazione, apoptosi e stress ossidativo che sono alla base delle malattie cardiovascolari. Inoltre, permette di esaminare l'impatto di nuovi farmaci sull'endotelio umano (Medina-Leyte et al., 2020).

Come tutti i modelli cellulari che vengono utilizzati per lo studio e la ricerca di base, anche il modello HUVEC possiede vantaggi e svantaggi.

Nello specifico, il tasso di crescita di questa tipologia cellulare risulta essere più elevato *in vitro* che *in vivo*; sebbene ciò possa essere controllato utilizzando inibitori e fattori di crescita, in coltura rispondono al fenomeno della "inibizione da contatto", che si manifesta quando la coltura ha raggiunto la confluenza inducendo inibizione della proliferazione cellulare, contribuendo così a regolarne lo sviluppo (Medina-Leyte et al., 2020).

A livello morfologico mostrano un elevato grado di eterogeneità, che si manifesta come variazioni nelle dimensioni cellulari, nel profilo di espressione genica, nella produzione di matrice extracellulare e nelle caratteristiche funzionali delle giunzioni intercellulari, ma che di contro permettono loro di adattarsi biologicamente alle specifiche esigenze di coltura.

Inoltre, sebbene non riflettano tutte le fasi dell'angiogenesi fisiologica, sono particolarmente utili per lo studio dei meccanismi legati a tale processo, poiché diverse componenti della matrice extracellulare sono in grado di promuovere in coltura la formazione di strutture simili a capillari. Tuttavia, tra i principali svantaggi possiamo annoverare il loro limitato utilizzo per esperimenti a lungo termine in quanto, sebbene possano essere mantenute in coltura fino al decimo passaggio *in vitro*, è noto che queste cellule perdono le loro caratteristiche fenotipiche primarie e la capacità di rispondere agli stimoli se mantenute in coltura oltre il sesto passaggio (Medina-Leyte et al., 2020).

Come già descritto in precedenza, per comprendere e studiare i vari aspetti fisiopatologici di una malattia, si utilizzano differenti modelli sperimentali. Nello specifico, il modello HUVEC trova impiego nello studio delle malattie cardiovascolari e metaboliche, ipertensione, aterosclerosi, ipercolesterolemia, diabete mellito, nella comprensione dei meccanismi legati all'angiogenesi,

all'utilizzo degli stent e nello studio del potenziale ruolo di molecole naturali e/o sintetiche (Medina-Leyte et al., 2020).

È infatti noto che tale modello cellulare rappresenta un modello innovativo particolarmente utile per studiare *in vitro* la disfunzione endoteliale indotta dall'esposizione cronica all'iperglicemia e per lo studio della migrazione cellulare e della vasculogenesi, soprattutto nelle condizioni patologiche in cui tali processi risultano compromessi. Numerosi studi indicano infatti che nel cordone ombelicale di donne affette da diabete gestazionale l'endotelio esposto *in vivo* anche transitoriamente all'iperglicemia, allo stress ossidativo e all'infiammazione, presenta modificazioni pro-aterogene che permangono *in vitro* anche dopo aver ripristinato in coltura concentrazioni normali di glucosio (Di Fulvio et al., 2014).

Negli ultimi anni, un numero sempre crescente di studi scientifici si sta indirizzando sulla comprensione degli effetti benefici di molecole naturali estratte da vegetali in virtù del loro ruolo protettivo riguardo le complicanze cardiovascolari nel diabete.

In questo contesto, il gruppo di ricerca coordinato dalla Prof.ssa Assunta Pandolfi, negli ultimi anni ha dimostrato *in vitro* gli effetti benefici sulla salute vascolare di varie molecole di origine naturale. Nello specifico, è stato evidenziato che sostanze quali carotenoidi (B-Carotene, Licopene), centella asiatica e acido oleanolico, estratti da composti vegetali, sono in grado di esercitare attività anti-infiammatoria e antiossidante, e di incrementare la migrazione e la vasculogenesi in un modello di cellule endoteliali ottenute dalla vena del cordone ombelicale di donne affette da GD (Di Tomo et al., 2015; Ucci et al., 2019).

In aggiunta, recentemente, particolare attenzione è stata rivolta alle vescicole extracellulari di origine vegetale alla luce dei loro effetti benefici sulla salute umana (Raimondo et al., 2022).

VEVICOLE EXTRACELLULARI

Le vescicole extracellulari (EV), descritte per la prima volta da Pan e Johnstone nel 1983, sono una famiglia eterogenea di strutture membranose di derivazione cellulare comprendenti esosomi e microvescicole, che hanno origine rispettivamente dal sistema endosomiale e dalla membrana plasmatica, prodotte da cellule procariotiche ed eucariotiche. Hanno diverse dimensioni e forme e le loro membrane, formate da un doppio strato lipidico con proteine integrate, proteggono il contenuto delle EV da proteasi e nucleasi. Il contenuto delle vescicole extracellulari riflette il tipo e lo stato funzionale delle cellule parentali e determina i loro diversi effetti sulle cellule bersaglio a seconda della composizione. È stato dimostrato che le EV, in generale, contengono recettori di superficie, proteine solubili e di membrana, lipidi, acidi ribonucleici e, secondo alcune pubblicazioni, DNA genomico e mitocondriale (Konoshenko et al., 2018).

Le vescicole extracellulari sono state osservate in tutti i fluidi biologici del corpo come, sangue, urina, saliva, lavaggio broncoalveolare, bile, latte materno, liquido cerebrospinale etc., e sono coinvolti in processi fisiologici e patologici (Konoshenko et al., 2018).

Sulla base delle dimensioni e del meccanismo di biogenesi, le EV possono essere distinte in esosomi, microvescicole (MV) e corpi apoptotici. Una volta nell'ambiente extracellulare, le EV possono indurre una risposta nelle cellule bersaglio in due modi: attivando recettori di membrana oppure rilasciando nel citoplasma il proprio "carga" (contenuto). Le EV sono, quindi, importanti mediatori inter-cellulari e sono coinvolti in una moltitudine di processi, sia fisiologici (coagulazione, sorveglianza immunitaria, etc.) che patologici (tumorigenesi, formazione di metastasi, etc.) (Bianciardi et al., 2021).

ESOSOMI

Gli esosomi, scoperti nel 1983, sono un sottoinsieme di vescicole extracellulari identificati inizialmente come un meccanismo cellulare atto ad eliminare prodotti cellulari indesiderati. Studi recenti affermano che essi svolgono un ruolo significativo nella comunicazione cellulare trasferendo alle cellule riceventi proteine funzionali, metaboliti e acidi nucleici. Influenzano un'ampia gamma di processi fisiologici come le risposte immunitarie, la riparazione dei tessuti, il mantenimento delle cellule staminali, la comunicazione del sistema nervoso centrale (SNC), i processi patologici in malattie cardiovascolari, neurodegenerazione, cancro e infiammazione (Gurung et al., 2021).

Gli esosomi sono vescicole sferiche con dimensioni variabili da 30 a 150 nm e con una densità di saccarosio di 1,13-1,19 g/mL. Contengono proteine citosoliche e legate alla membrana come, proteine appartenenti alla famiglia delle tetraspanine (CD63, CD9, CD81 e CD82), complessi di smistamento endosomiale necessari per il trasporto (ESCRT), TSG101 (Tumor Susceptibility Gene 101), ALIX, integrine, proteine da shock termico (HSP60, HSP70, HSP27, HSP20 e HSP90), actina e flotilline. Mentre le proteine da shock termico, CD63, ESCRT e i componenti citoscheletrici sono comuni a tutti gli esosomi, altre proteine come MHC di classe I e II sono specifiche per il tipo di cellula di origine. Sono ricoperti da una membrana rigida a doppio strato contenete colesterolo, sfingomieline, fosfatidilinositolo (PI), ceramide, zattere lipidiche associate a diverse proteine, fosfatidiletanolamina (PE), fosfatidilserina (PS), fosfatilcolina (PC) e gangliosidi (GM). La composizione degli esosomi comprende anche acidi nucleici come DNA, mRNA, miRNA e specie di RNA non codificante (*Figura 12*) (Konoshenko et al., 2018; Gurung et al., 2021).

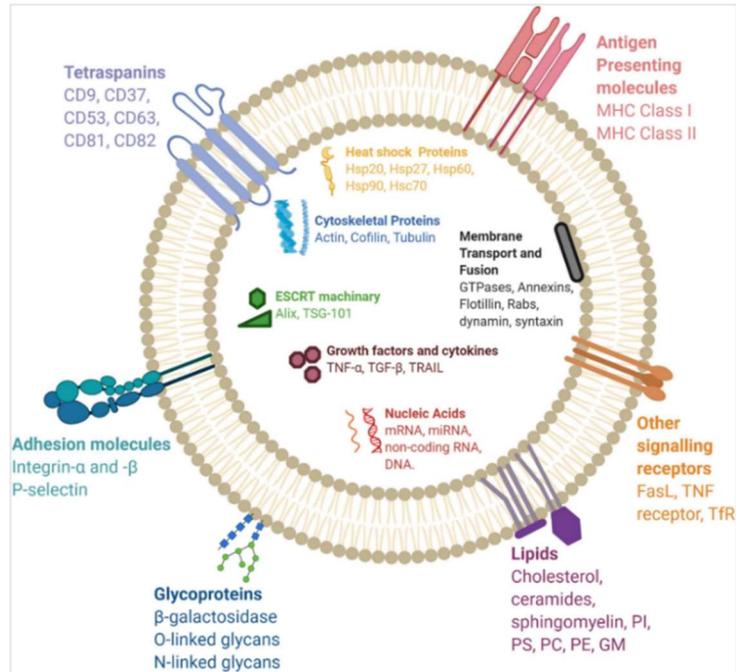


Figura 12. Composizione degli esosomi (Gurung et al., 2021).

La biogenesi degli esosomi può essere suddivisa in tre passaggi:

- 1) Formazione dell'endosoma per invaginazione della membrana plasmatica;
- 2) Formazione dei multivesicular bodies (MVB) per invaginazione della membrana endosomiale con all'interno le vescicole intraluminali (ILV);
- 3) Fusione dei MVB con la membrana cellulare e conseguente rilascio degli ILV come esosomi nello spazio extracellulare.

Il processo può essere dipendente dal meccanismo *endosomal sorting complex required for transport* (ESCRT) o indipendente da esso in seguito alla formazione della ceramide o all'intervento di proteine della famiglia delle tetraspanine. Entrambi i meccanismi cooperano e il loro contributo varia in funzione del contenuto e del tipo cellulare (Bianciardi et al., 2021).

MICROVESCICOLE

Le microvescicole (MV), scoperte per la prima volta nel plasma umano, sono vescicole di varie forme con un diametro compreso tra 50 e 1000 nm, fino a 10 μ m nel caso degli oncosomi. Le membrane delle microvescicole contengono colesterolo, diacilglicerolo e fosfatidilserina in quantità maggiori rispetto agli

esosomi, mentre i principali marcatori delle proteine MV sono le integrine, le selectine e il CD40. La biogenesi delle MV è molto meno definita rispetto agli esosomi, ma sulla base dello studio di diversi modelli, esse originano per gemmazione dalla membrana plasmatica verso lo spazio extracellulare (Konoshenko et al., 2018).

CORPI APOPTOTICI

I corpi apoptotici sono prodotti rilasciati dalla frammentazione della membrana plasmatica durante la morte cellulare programmata. Hanno forme eterogenee con dimensioni maggiori tra 500 e 4000 nm, maggiori rispetto alle altre tipologie di vescicole, e una densità in saccarosio di 1,16–1,28 g/mL. Similmente alle MV, i corpi apoptotici espongono la fosfatidilserina sulla loro superficie e i loro principali marcatori proteici sono gli istoni, TSP e C3b. I corpi apoptotici trasportano DNA genomico frammentato e organelli cellulari, che li distinguono dagli altri tipi di EV (Konoshenko et al., 2018).

VESCICOLE EXTRACELLULARI DI ORIGINE VEGETALE

Analogamente ad altri organismi viventi anche le piante producono vescicole extracellulari. La loro scoperta è attribuita a Jensen, che nel 1965 trovò nel cotone corpi multivescicolari (MVB) e vescicole intraluminari (Urzi et al., 2022).

Negli ultimi anni, le vescicole extracellulari di origine vegetale (PDEV) hanno attirato sempre più interesse grazie al loro ruolo nella comunicazione tra i diversi regni ed organismi e per i loro effetti benefici sulla salute umana. Così come le EV di origine animale, le PDEV sono vescicole di dimensioni comprese tra i 100 e i 1000 nm, costituite da una membrana a doppio strato fosfolipidico contenenti proteine, lipidi e acidi nucleici. Ad oggi, le PDEV sono state isolate da vari tipi di frutta e verdura, compresi agrumi, cavolo, zenzero, aglio, curcuma, carota, etc. Studi *in vitro* e *in vivo* hanno dimostrato che le PDEV hanno attività farmacologiche in grado di influenzare i processi cellulari, esercitando attività anti-infiammatorie, antiossidanti e antitumorali, con effetti benefici sulla salute umana (*Figura 13*) (Lo et al., 2023).

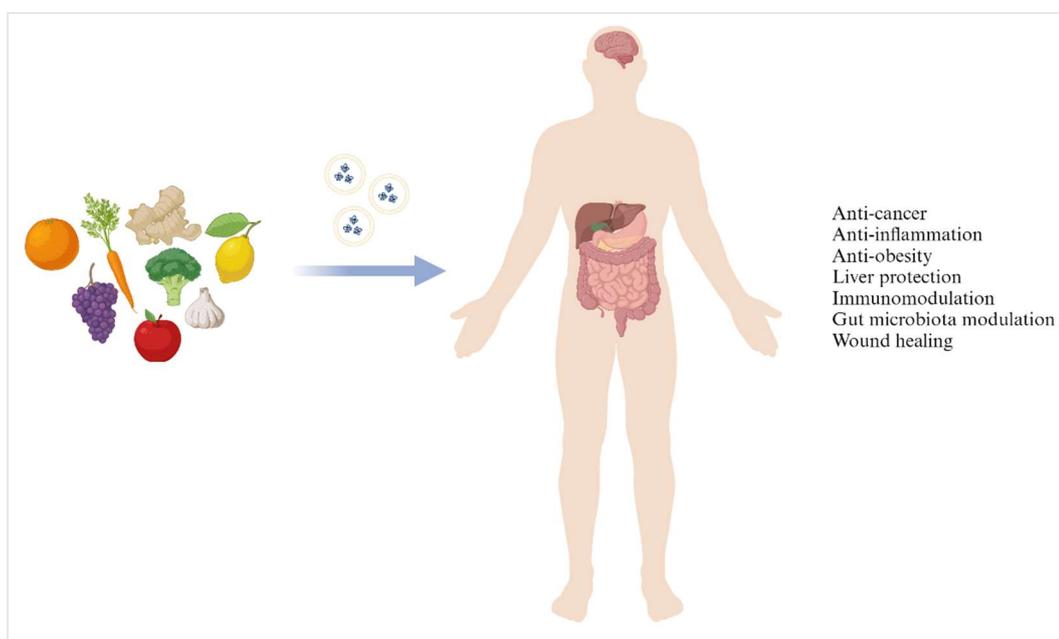


Figura 13. Attività delle vescicole extracellulari di origine vegetale su vari processi cellulari (Created with BioRender.com).

Rispetto alle vescicole extracellulari umane, le PDEV contengono meno proteine, ma sono più ricchi di molecole lipidiche che risultano essere diverse tra i vari PDEV, come acido fosfatidico (PA), fosfatidiletanolamina (PE), fosfatidilinositolo, fosfatidilcolina (PC), digalattosil diacilglicerolo (DGDG) e monogalattosil diacilglicerolo (MGDG) (Lo et al., 2023).

In alcuni studi è stato osservato che i lipidi delle EV estratti dallo zenzero sono responsabili della soppressione dell'attività dell'inflammasoma NLRP3 (NLR family pyrin domain containing 3) nei macrofagi derivati dal midollo osseo. È stato dimostrato anche che gli acidi grassi polinsaturi delle EV, sempre dello zenzero, fungono da molecole bioattive coinvolte nell'inibizione della crescita del *Porphyromonas gingivalis*, un patogeno gengivale, andando ad interagire con la proteina di membrana esterna delle cellule batteriche (Lo et al., 2023).

Come detto in precedenza, le EV contengono proteine, lipidi e acidi nucleici, tra cui i microRNA (miRNA). Questi RNA a singolo filamento, lunghi circa 22 nucleotidi, possono legarsi complementariamente agli mRNA, provocando silenziamento genico post-trascrizionale e influenzando ulteriormente l'espressione genica (Lo et al., 2023).

Studi recenti hanno determinato anche un profilo proteomico delle PDEV ricavate da diverse specie vegetali come *Arabidopsis thaliana*, *Citrus limon*, *Curcuma longa*, *Allium sativum*, e *Zingiber officinale*. Nonostante numerosi studi abbiano caratterizzato la proteomica delle PDEV, nessuno studio ha però stabilito un legame tra le loro proteine e le loro attività terapeutiche (Lo et al., 2023).

Una criticità delle PDEV sta nel fatto che, a differenza delle vescicole extracellulari di origine animale, mancano dei marcatori proteici specifici e universali che possono essere utilizzati per classificarli. Tuttavia, l'analisi proteomica ha identificato diverse famiglie di proteine nelle PDEV presenti in diverse piante, che potrebbero essere utilizzati come marcatori. Le più rappresentate sono la proteina da shock termico HSP70, le acquaporine isolate da varie piante, inclusi agrumi, uva, broccoli e pomodori, e le annessine osservate nel succo di quattro specie di agrumi e pomodoro (Lo et al., 2023).

BIOGENESI DELLE PDEV

Il processo di biogenesi delle PDEV risulta essere poco conosciuto, ma è stato suggerito che la loro formazione sia simile a quello delle vescicole extracellulari di origine animale che si formano all'interno degli MVB e vengono rilasciate dalle cellule tramite la fusione degli MVB con la membrana plasmatica. Nonostante tale ipotesi, studi attuali hanno suggerito l'esistenza di almeno tre percorsi che portano alla formazione delle EV nelle cellule vegetali (*Figura 14*) (Lo et al., 2023):

- EV positive per TET8 → Le proteine della famiglia TET (tetraspanine) sono diverse e svolgono ruoli specifici in vari processi cellulari. Alcuni membri, come CD9, CD81 e CD63, sono utilizzati come marcatori negli studi sugli esosomi a causa della loro presenza nelle membrane di tali vescicole. Si ritiene che le vescicole extracellulari positive per TET8 derivino dalle vescicole multivescicolari (MVB), come indicato dalla colocalizzazione con ARA6 (GTPasi vegetale appartenente alla famiglia delle Rab5-like guanosine triphosphatase), un marcatore delle vescicole multivescicolari. Queste microvescicole hanno dimensioni comprese tra 60 e 150 nm e densità di 1,12-1,19 g/mL e possono essere raccolte dal fluido apoplastico delle foglie mediante centrifugazione a 100 000g.
- EV positive per PEN1 → Il loro processo di formazione è ancora poco chiaro, ma si ritiene che sia coinvolto nella comunicazione intercellulare e nelle risposte difensive contro i patogeni. Queste vescicole contengono la proteina PEN1 (pentacyclic triterpene synthase 1) e sono presenti nel liquido apoplastico delle foglie. Questa tipologia di vescicole extracellulari la si ritrova nella frazione raccolta ad una velocità di ultracentrifugazione di 40 000g e hanno dimensioni comprese tra 50 e 300 nm, con una densità di 1,029–1,056 g/mL. Gli studi indicano che PEN1 non colocalizza con il marcatore ARA6 delle vescicole multivescicolari (MVB), suggerendo che gli EV positivi per PEN1 e TET8 costituiscono sottoclassi distinte di vescicole extracellulari di origine vegetale (PDEV).

- Organelli positivi per l'esocisti (EXPO) → Sono organelli esocitici con dimensioni comprese tra 200 e 500 nm che mediano la secrezione di proteine specifiche nelle piante. Gli EXPO non si fondono con il vacuolo, ma con la membrana plasmatica estromettendo una vescicola a singola membrana contenente citosol nell'apoplasto.

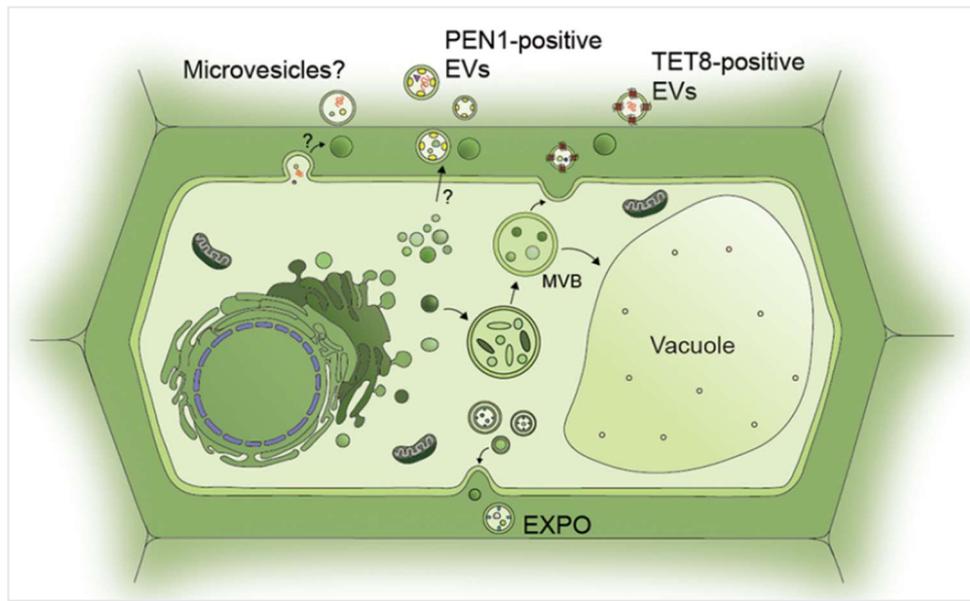


Figura 14. Percorsi che portano alla formazione delle EV nelle piante (Lo et al., 2023).

ISOLAMENTO E ANALISI OMICA DELLE PDEV

La centrifugazione differenziale rimane il metodo più utilizzato per l'isolamento delle PDEV, nonostante la presenza di nuove tecniche come la purificazione mediante immunocattura e il sistema bifase acquoso. Non esiste un protocollo univoco per l'isolamento delle vescicole, tuttavia il processo prevede la spremitura della fonte vegetale seguita da più fasi di centrifugazioni: centrifugazione a bassa velocità (500–3000g x circa 10 minuti), centrifugazione a velocità intermedia (2000–10.000g x circa 30 minuti) e ultracentrifugazione (100.000–150.000g x 1,5–2 h) per ottenere un pellet di PDEV. Poiché l'ultracentrifugazione sedimenta anche altre vescicole, proteine e aggregati proteina/RNA, alcuni protocolli prevedono una successiva ultracentrifugazione su gradiente di densità utilizzando iodixanolo o saccarosio/ossido di deuterio per separare le PDEV dai contaminanti. Una volta isolate, le PDEV vengono caratterizzate mediante diversi metodi, tra cui citometria a flusso e microscopia

elettronica, mentre lo studio del loro contenuto, complesso ed eterogeneo, si basa su analisi omiche. Tra le proteine identificate nelle PDEV le più rappresentate sono la proteina da shock termico 70 (HSP70), la S-adenosil-omocisteinasi, la gliceraldeide-3-fosfato deidrogenasi, le acquaporine e le annessine. La componente lipidica delle PDEV sembra essere strettamente correlata alle loro funzioni biologiche. Le principali specie lipidiche identificate nelle PDEV sono l'acido fosfatidico (PA), la fosfatidiletanolamina (PE) e la fosfatidilcolina (PC). Oltre a proteine e lipidi, le PDEV includono anche diversi metaboliti come il solforafano, lo shogaol e i flavonoidi, che potrebbero spiegare i ruoli benefici delle PDEV nelle interazioni tra i due regni pianta-mammifero (Urzi et al., 2022).

PDEV DERIVATE DALLA FRUTTA

La frutta è considerata un alimento benefico per la salute umana e per tale motivo molti studi si sono concentrati sulla caratterizzazione delle EV derivate da alcuni frutti, in particolare dagli agrumi poiché possiedono un'abbondante fonte di nutrienti e sostanze fitochimiche che contribuiscono notevolmente ad una dieta sana ed equilibrata con effetti antiossidanti e attività antitumorale. Nell'ultimo decennio, numerosi gruppi di ricerca si sono focalizzati sullo studio delle PDEV derivate da vari agrumi come, limone, arancia dolce, pompelmo e arancia amara (Lo et al., 2023).

PDEV estratte dal *Citrus Limon L.*

Il succo estratto dal *Citrus Limon L.*, appartenente alla famiglia delle Rutaceae contiene nanoparticelle con un profilo morfologico, dimensionale e proteomico che ha permesso di considerarle come nanovesicole simili agli esosomi (Raimondo et al., 2015).

Studi condotti sulle vescicole extracellulari derivate dal limone hanno riportato notevoli risultati incentrati sulla terapia del cancro. In particolare, è stato osservato che tali vescicole inibiscono significativamente la proliferazione di differenti linee cellulari tumorali senza compromettere la vitalità delle cellule sane (Lo et al., 2023).

È stato dimostrato che le nanoparticelle derivate dal limone esercitano la loro attività antitumorale stimolando un meccanismo apoptotico mediato da TRAIL (TNF-related apoptosis-inducing ligand) correlato al fattore di necrosi tumorale (TNF). L'attivazione di TRAIL induce l'apoptosi nelle cellule tumorali presentando una tossicità minima contro i tessuti normali. Lo studio effettuato si è basato sulla misurazione dell'espressione di TRAIL e del suo recettore Dr5 che controllano strettamente i processi apoptotici (Raimondo et al., 2015).

Inoltre, oltre a possedere attività antineoplastiche, le EV derivate dal limone hanno anche delle proprietà antinfiammatorie. Un recente studio ha dimostrato che il pretrattamento su macrofagi primari umani e murini con EV derivati dal limone, stimolati con LPS (lipopolisaccaride) ha ridotto l'espressione genica e proteica di alcune citochine pro-infiammatorie come IL-6, IL-1 β e TNF- α e ha ridotto la traslocazione nucleare e la fosforilazione del fattore nucleare kappa B (NF- κ B), importante fattore di trascrizione pro-infiammatorio, nei macrofagi murini stimolati da LPS (Raimondo et al., 2022).

SCOPO DEL LAVORO

Come detto nel precedente paragrafo, negli ultimi anni la letteratura scientifica ha posto particolare attenzione al ruolo di vescicole extracellulari di origine vegetale (PDEV) dimostrando che possono svolgere un'azione anti-infiammatoria, antiossidante e antitumorale, con possibili effetti benefici sulla salute umana.

Poiché non vi sono studi scientifici che esplorano il ruolo di PDEV sulle funzioni endoteliali e sui meccanismi disfunzionali alla base della condizione diabetica, scopo della presente tesi è quello di indagare il potenziale effetto anti-infiammatorio di vescicole extracellulari isolate da *Citrus limon* L. (L-EV) in un modello di HUVEC isolate dal cordone ombelicale di donne affette da diabete gestazionale confrontandole a HUVEC isolate da donne di controllo.

L'utilizzo di tale modello cellulare è giustificato dal fatto che, come già ampiamente descritto, esso rappresenta un modello utile per riprodurre *in vitro* il fenotipo pro-infiammatorio tipico di un endotelio diabetico, permettendo di indagare i meccanismi potenzialmente coinvolti nel ruolo protettivo delle PDEV nella limitazione della perdita delle funzioni endoteliali nei vasi sottoposti cronicamente ad elevati livelli di glicemia.

MATERIALI E METODI

Modello cellulare

Gli esperimenti sono stati effettuati su cellule endoteliali umane estratte dalla vena del cordone ombelicale (HUVEC) di 6 donne sane (C-HUVEC) e 6 donne affette da diabete gestazionale (GD-HUVEC).

Le procedure sperimentali utilizzate sono in accordo con gli standard etici del Comitato Istituzionale sulla Sperimentazione Umana (Numero di riferimento: 1879/09COET) dell'Ospedale "Santo Spirito" di Pescara e dell'Università "G. d'Annunzio" di Chieti-Pescara e con la Dichiarazione dei principi di Helsinki. Tutte le donne in gravidanza che hanno deciso di donare il cordone ombelicale hanno firmato un consenso scritto informato, approvato dal Comitato Etico. I parametri delle donne donatrici sono raccolti nella *Tabella 1*. Donne normotese sono state sottoposte al test della tolleranza al glucosio (OGTT) tra la 24-28esima settimana di gestazione. I cordoni sono stati prelevati subito dopo la nascita del bambino avvenuta tra la 36-40esima settimana di gestazione e conservati a 4°C fino al momento dell'espianto in laboratorio.

Caratteristiche cliniche gestanti	Donne CTRL (n=6)	Donne DIAB (n=6)
Età (anni)	36.2 ± 4.2	36.5 ± 4.32
Altezza (cm)	165.25 ± 3.9	158.7 ± 8.2
Peso pre-parto (Kg)	68.4 ± 13.9	80.7 ± 23.9
Peso post-parto (Kg)	74.58 ± 13.5	88.6 ± 23.1
BMI pre-parto (Kg/m ²)	25.1 ± 5.65	32.2 ± 10.3
BMI post-parto (Kg/m ²)	27.4 ± 5.6	35.45 ± 10.5
OGTT settimana gestazionale	27.8 ± 2.3	24.8 ± 4.1
SBP (mm/Hg)	106.7 ± 5.8	107.2 ± 4.5
DBP (mm/Hg)	70 ± 5	69.5 ± 7.2
OGTT valori (mmol/L):		
Glicemia basale	4.45 ± 0.24	5.08 ± 0.5*
Glicemia 1h	8.3 ± 0.9	10.5 ± 1.7*
Glicemia 2 h	6.86 ± 0.87	8.03 ± 0.8*

Tabella 1. Tabella che riporta le caratteristiche cliniche del gruppo di donne controllo (CTRL) e del gruppo di donne affette da diabete gestazionale (DIAB). I dati sono espressi come media ± SD.

BMI: Body Mass Index; **OGTT:** Oral Glucose Tolerance Test; **SBP:** Systolic Blood Pressure; **DBP:** Diastolic Blood Pressure. * $P < 0.005$.

Espianto di cellule endoteliali da cordone ombelicale umano

L'intera procedura viene effettuata sotto una cappa a flusso laminare, dove viene preparata una piantana alle cui estremità si fissano due siringhe da 5 mL, a loro volta agganciati a due rubinetti monouso. Viene preparato tutto il materiale sterile occorrente: pinza chirurgica, bisturi, clamp monouso, siringhe da 10 ml e da 20 mL, aghi-cannula in acciaio (diametro 1.5 mm), piastra Petri e garze sterili. Mentre, le soluzioni necessarie alle procedure vengono pre-riscaldate a 37°C in bagnetto termostato.

Il cordone viene posto sotto cappa, poggiato su piastra Petri e pulito esternamente con le garze. Si procede, quindi, ad incannulare la vena con un ago-cannula che sarà fissato con una clamp ad entrambe le estremità del cordone. Le estremità degli aghi vengono agganciate ai rubinetti in modo da “appendere” il cordone al supporto, come mostrato in *Figura 15*.



Figura 15. Espianto cellule HUVEC da cordone ombelicale umano.

A questo punto si procede con l'espianto delle cellule endoteliali secondo le seguenti fasi:

- Infusione e lavaggio con soluzione fisiologica addizionata dell'1% di penicillina-streptomina (cat. P4333, Sigma-Aldrich) e dell'1% di Amfotericina B (cat. 30-003-CF, Corning); il liquido risultante dal lavaggio della vena viene raccolto in un contenitore e smaltito come rifiuto;

- Infusione di una soluzione di Collagenasi 1 mg/mL (tipo IA, cat. C9891, Sigma-Aldrich) a 37°C, chiusura dei rubinetti per mantenere la soluzione all'interno della vena e incubazione per 3 minuti; nel frattempo si effettua un massaggio manuale del cordone per favorire il distacco delle cellule endoteliali;
- Infusione di mezzo di coltura e raccolta della soluzione contenente cellule endoteliali in una falcon da 50 mL pulita, sterile e opportunamente contrassegnata;
- Centrifugazione a 1200 rpm per 10 minuti al fine di ottenere un pellet cellulare. Il surnatante sarà eliminato mentre il pellet sarà risospeso con 5 mL di mezzo di coltura per HUVEC. La sospensione cellulare sarà infine distribuita in una flask T25 (da 25 cm²) precedentemente trattata con gelatina 1.5% (sciolta in soluzione fisiologica, autoclavata e filtrata).

L'espianto così ottenuto viene posto in incubatore a 37°C e al 5% di CO₂; il giorno seguente viene effettuato il primo cambio mezzo. Le cellule saranno tenute in coltura fino alla confluenza per poi essere splittate in flask di dimensioni maggiori al fine di ottenere un elevato numero di cellule sufficienti per poter essere congelate al 2° passaggio oppure essere utilizzate per gli esperimenti.

Coltura di cellule HUVEC

Le cellule HUVEC sono coltivate in un mezzo composto da 50% DMEM low glucose (Dulbecco's Modified Eagle Medium, cat. D6046, Sigma-Aldrich, Saint Louis, USA) e 50% M199 (Endothelial Growth Medium, cat. M4530, Sigma-Aldrich), con l'aggiunta del 20% di FBS (Fetal Bovine Serum, cat. 41A0045K, Gibco-Life Technologies), 1% penicillina-streptomina (cat. P4333, Sigma-Aldrich) e 1% L-glutamina (cat. G7513, Sigma-Aldrich). Dal primo passaggio in coltura vengono aggiunti al mezzo completo 10 µg/mL di Eparina (da una madre 1800 UI/mL) e 50 µg/mL di ECGF (Endothelial Cell Growth Factor, da una madre 5 mg/mL ottenuta sciogliendo e filtrando la polvere liofilizzata di ECGF in mezzo completo).

Fenotipizzazione delle HUVEC mediante citometria a flusso

HUVEC al terzo passaggio sono state processate per l'individuazione di antigeni di membrana. Per la marcatura di membrana, campioni contenenti 2×10^5 cellule sono stati risospesi in 100 μ L di tampone di lavaggio (0.1% di sodio azide e 0.5% di albumina di siero bovino in PBS) contenente la quantità appropriata di anticorpi di superficie (Tabella 2) e successivamente incubati per 30 minuti a 4 °C al buio. Le cellule sono state lavate (3 mL di tampone di lavaggio), centrifugate (4 °C, 400 \times g, 8 minuti), risospese con 1 mL di PBS 0.5% paraformaldeide e incubate per 5 minuti a temperatura ambiente (RT). Dopo ulteriore lavaggio, sono state nuovamente centrifugate (4 °C, 400 \times g, 8 min) e conservate a 4 °C al buio fino alla loro acquisizione. Le cellule sono state analizzate su un citometro a flusso FACSCalibur (BD) utilizzando il software CellQuest™ ed è stato calcolato il Rapporto di Intensità di Fluorescenza Media (MFI Ratio), derivante dal rapporto tra l'MFI dei campioni positivi e l'MFI dei campioni negativi (il solo anticorpo secondario).

Anticorpo	Produttore
CD45-BV510	Ancell (MN, USA)
CD326-PerCP-Cy5.5	Becton Dickinson (San Jose, CA, USA)
CD146-PE	Becton Dickinson (San Jose, CA, USA)
CD34-PE	Beckman Coulter (Fullerton, CA, USA)
CD144-FITC	Acris Antibodies (Herford, Germany)
CD31-FITC	Becton Dickinson (San Jose, CA, USA)
CD105-FITC	Ancell (MN, USA)

Fluorescein isothiocyanate (FITC); Phycoerythrin (PE); Peridinin chlorophyll protein-Cyanine5.5 (PerCP-Cy); Brilliant Violet 510 (BV510).

Tabella 2. Lista degli anticorpi.

Estrazione e quantizzazione di vescicole extracellulari da limone (L-EV)

Per gli studi condotti, sono state utilizzate vescicole extracellulari isolate dal succo del *Citrus limon* L. (L-EV). Il succo ottenuto mediante spremitura a mano dei limoni è stato sottoposto ad una serie di centrifugazioni differenziali alternate a filtrazioni. Nello specifico, si eseguono due centrifugazioni a 3000 \times g per 15 minuti e due a 10000 \times g per 30 minuti, alle quali segue una prima filtrazione

mediante filtro con pori di 0.8 μm . Si effettua un'ulteriore centrifugazione a 16500xg per 1 ora, a cui segue un'altra filtrazione utilizzando un filtro da 0.45 μm ed un'ultima centrifugazione a 16500xg per 3h. Al termine, il surnatante è stato ultracentrifugato a 35000 rpm per 1.45h ed il pellet ottenuto è stato prima sottoposto ad un lavaggio con 200 μL di PBS e successivamente è stato risospeso in 100 μL di PBS. La quantizzazione è stata effettuata aggiungendo in un volume di 1.5 mL di Coomassie Brilliant Blue, una soluzione di 50 μL contenente vescicole diluite 1:10 in PBS. La lettura è stata infine eseguita mediante biofotometro.

Caratterizzazione fenotipica e conta delle L-EV

5 μL di una sospensione di L-EV a concentrazione di 25 $\mu\text{g}/\text{mL}$, non permeabilizzate, sono state incubate per 45 minuti al buio in una miscela di reagenti contenente 195 μL di PBS 1X, 0,5 μL di falloidina FITC-coniugata e 1 μL di LCD, un colorante cationico lipofilo prodotto dalla BD Biosciences (Catalogo, #626267, Custom Kit). Successivamente sono stati aggiunti 500 μL di PBS 1X a ciascuna provetta e sono stati acquisiti 1×10^6 eventi mediante citometria a flusso (FACSVerse, BD Biosciences, San Jose, CA, USA).

Protocollo sperimentale

Culture di C- e GD-HUVEC sono state pre-stimate per 24 ore con varie dosi (10 -25 $\mu\text{g}/\text{mL}$) di L-EV. Al fine di indurre uno stato infiammatorio, le cellule sono state stimolate per 16 ore con TNF- α (10 ng/mL) in un mezzo di quiescenza contenente lo 0.5% di FBS. Tutti gli esperimenti sono stati condotti su almeno 3 diverse colture primarie di C- e GD-HUVEC ($n \geq 3$).

Valutazione dell'internalizzazione delle L-EV mediante microscopia confocale

C- e GD-HUVEC sono state seminate in piastre da 24-well (30.000 cellule/well) dove precedentemente sono stati posizionati dei vetrini, sterilizzati in etanolo al 96% e lavati in soluzione fisiologica.

Per la marcatura delle L-EV, viene preparata una mix 1:1 di una concentrazione di 25 $\mu\text{g}/\text{mL}$ di L-EV risospese in PBS 1X con Ca^{2+} e Mg^{2+} e PKH67 (1:100 in diluente C), poi incubata a temperatura ambiente per 15 minuti al buio. Si

centrifuga a 14000 rpm per 10 minuti a 4 °C, si risospende il pellet in 200 µL di PBS 1X con Ca²⁺ e Mg²⁺ e si centrifuga. Il pellet ottenuto, contenente le L-EV marcate, viene risospeso in 500 µL di terreno di coltura. Si incubano al buio le L-EV marcate con le cellule HUVEC per 4 ore a 37 °C.

Dopo aver aspirato il terreno in ogni pozzetto, si eseguono due lavaggi con PBS 1X w/o Ca²⁺ e Mg²⁺ e si fissano le cellule con paraformaldeide (PFA) al 4% per 15 minuti a RT. A distanza di 5 minuti, si effettuano nuovamente due lavaggi con PBS 1X w/o Ca²⁺ e Mg²⁺ e si marcano le cellule con 0.5 µL di Rodamina-Falloidina in 200 µL di PBS 1X in agitazione lenta per 45 minuti a RT. Si effettuano nuovamente due lavaggi con PBS 1X w/o Ca²⁺ e Mg²⁺ e si incubano le cellule con 200 µL di DAPI (1:1000) in PBS per 5 minuti. Dopo aver eliminato il DAPI, si aggiungono 200 µL di PBS per favorire la rimozione del vetrino. I vetrini vengono fissati su dei vetrini portaoggetti mediante mounting media e incubati per 1 ora. L'internalizzazione delle L-EV è stata valutata mediante acquisizione di immagini a diversi ingrandimenti al microscopio confocale.

Valutazione dell'espressione proteica totale di VCAM-1 mediante citometria a flusso

C- e GD-HUVEC sono state seminate in piastre 6-well (150.000 cellule/well) e processate per valutare i livelli proteici totali di Vascular Cell Adhesion Molecule-1 (VCAM-1). A fine trattamento (vedi protocollo sperimentale), cellule semi-confluenti sono state lavate con PBS 1X w/o Ca²⁺ e Mg²⁺, staccate con Tripsina-EDTA 1X e infine sono state raccolte con PBS, contate e trasferite in provette per citofluorimetro (5 x 10⁵ cellule/1 mL di PBS per ciascun punto sperimentale). Dopo centrifugazione a 1500 rpm per 5 minuti a 4°C, ogni campione è stato fissato e permeabilizzato incubando il pellet cellulare in successione con 1 mL di soluzione FIX 1X (Lysing Solution, BD) e con 1 mL di soluzione PERM (Permeabilizing solution, BD) per 10 minuti al buio a temperatura ambiente (RT). Successivamente è stata effettuata un'incubazione con anticorpo primario anti-VCAM-1 (1:50) PE-marcato (anti-Hu CD106-PE, Invitrogen) per 30 minuti a 4°C. Dopo centrifugazione, i campioni sono stati decantati e risospesi in 200 µL di PBS e la lettura è stata effettuata al FACS Canto II (BD). I dati sono stati analizzati con FACS Diva e FlowJo v.8.8.6 software

(BD) e sono stati presentati come Rapporto di Intensità di Fluorescenza Media (MFI Ratio), calcolato come rapporto tra l'MFI dei campioni positivi e l'MFI dei campioni negativi (il solo anticorpo secondario).

Valutazione dell'esposizione di membrana di VCAM-1 mediante tecnologia IncuCyte®

C- e GD-HUVEC sono state seminate in piastre da 96-well (7.000 cellule/well) e processate per valutare l'esposizione di membrana di VCAM-1. Le colture sono state pre-stimate per 24 ore con dosi differenti di L-EV (10-25 µg/mL). Per indurre uno stato infiammatorio, le cellule sono state stimulate con TNF- α (10 ng/mL) in un mezzo di quiescenza contenente lo 0.5% di FBS e l'anticorpo primario anti-VCAM-1 (1:50) PE-marcato. La fluorescenza emessa, che è direttamente proporzionale alla quantità di proteina VCAM-1 esposta sulla membrana cellulare, è stata acquisita e misurata dallo strumento IncuCyte® ogni 2 ore e fino a 24 ore a partire dalla stimolazione con TNF- α .

L'IncuCyte® è un sistema che permette l'analisi di campioni marcati con molecole fluorescenti in tempo reale e su cellule vive, e in questo specifico protocollo sfrutta la reazione tra VCAM-1 e l'anticorpo specifico per questa proteina di membrana in cellule C- e GD-HUVEC non permeabilizzate. L'acquisizione e l'analisi automatica nel tempo in live permette di ottenere una visione continua dei processi biologici attivi nelle condizioni preimpostate dall'operatore. Nello specifico, l'analisi è stata effettuata su 4 misurazioni fatte per ogni condizione sperimentale, piastrata in duplicato (n=8) per ogni tempo sperimentale (da 0 a 24 ore).

Saggio di adesione di una linea di monociti (U937) alle HUVEC

Cellule U937 acquistate dalla ECACC (European Collection of Cell Cultures, UK) vengono fatte crescere in sospensione in flask contenenti mezzo RPMI + 10% FBS. C- e GD-HUVEC vengono seminate in piastre 6-wells (150.000 cellule/well) e, raggiunta la confluenza, il saggio è stato effettuato in condizione basale e dopo stimolazione con la citochina infiammatoria TNF- α (10 ng/mL) per 16 ore, al fine di indurre l'adesione delle U937 alle VCAM-1 esposte sulla membrana cellulare. Inoltre, un'ora prima del saggio, cellule HUVEC stimulate

con TNF- α sono incubate con anticorpo monoclonale anti-VCAM-1 a 37°C (1 μ g/1x10⁶ cellule/mL) ed utilizzate come controllo negativo. Alla fine dei trattamenti, il saggio è stato effettuato aggiungendo 1 ml di sospensione cellulare U937, contenente 1x10⁶ cellule/mL, al monostrato di HUVEC, e mantenendo per 20 minuti in agitazione (63 rev/min) a RT. Dopo l'incubazione HUVEC-U937, le cellule U937 non adese sono state rimosse con un gentile lavaggio con DMEM, e il monostrato cellulare è stato fissato con 1% di Paraformaldeide.

I risultati sono stati dapprima osservati mediante microscopia ottica (Contrasto di fase, Nikon TMS) e le immagini sono state acquisite mediante software Motic Image Plus ad ingrandimento 10X. La conta dei monociti adesi alle HUVEC è stata effettuata utilizzando il software ImageJ utilizzando almeno 3 foto, scelte casualmente, per ciascuna condizione sperimentale.

Analisi statistica

I risultati sono stati presentati come media \pm Standard Error of the Mean (SEM) di almeno 3 esperimenti indipendenti utilizzando differenti ceppi di C- e GD-HUVEC. L'analisi del calcolo della significatività statistica è stata effettuata mediante l'analisi *ANOVA* a due vie (Two-way ANOVA) seguita dal test Tukey *post hoc* test. La soglia di significatività è stata posta come $P < 0.05$.

RISULTATI

Fenotipizzazione delle HUVEC mediante citometria a flusso

Come si osserva dalla *Tabella 3* e dai dot plot rappresentativi mostrati in *Figura 16*, la fenotipizzazione effettuata su colture di HUVEC al quarto passaggio mostra positività, con grado di espressione da moderato ad alto, per CD31, CD34, CD105, CD144 e CD146, e negatività per CD45, CD106 e CD326.

Antigene	Fenotipo
CD31	+++
CD34	++
CD45	-
CD105	+++
CD106	-
CD144	+
CD146	+++
CD326	-

– espressione negativa;

+ espressione moderata;

++ positivo;

+++ alta espressione

Tabella 3. Lista antigeni e livello di espressione (fenotipo) corrispondente.

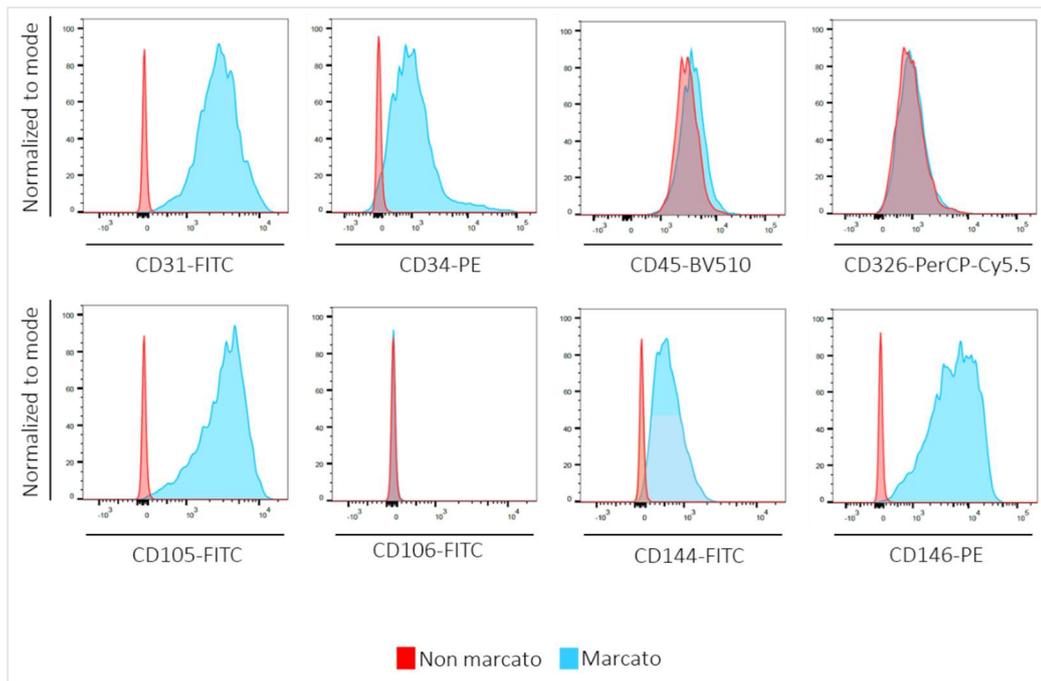


Figura 16. Marcatura cellule HUVEC.

Caratterizzazione fenotipica e conta delle L-EV

La caratterizzazione fenotipica delle L-EV è stata fatta mediante citometria a flusso prendendo come riferimento dimensionale le piastrine (1-3 μm). Sono state considerate vescicole extracellulari tutte le particelle aventi dimensioni inferiori a 1 μm (*Figura 17A*), positive per LCD e negative per la Falloidina (*Figura 17B*). Dalla conta effettuata sono state contate 86'119 L-EV intatte in 1 μL (*Figura 17B*).

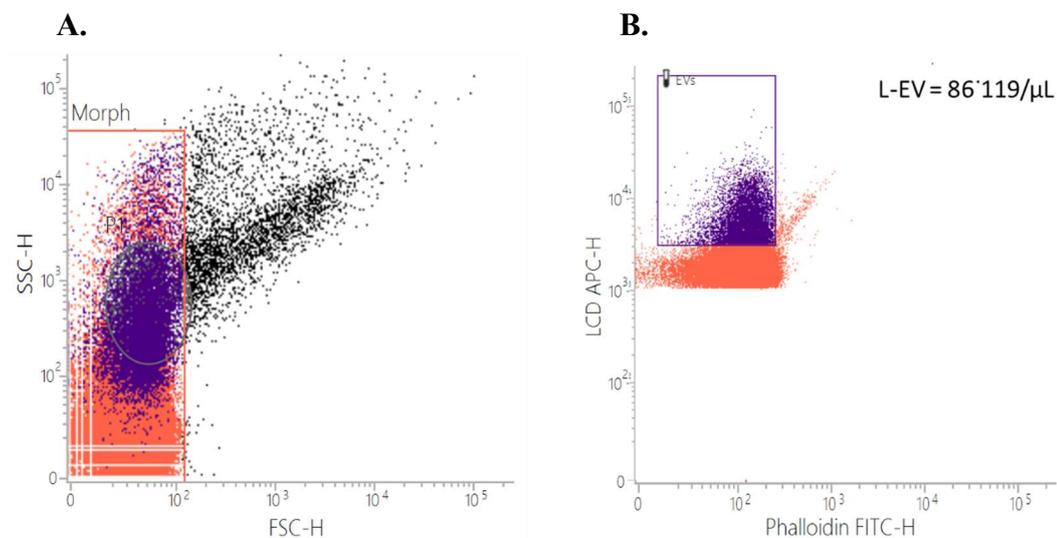


Figura 17. Dot plot rappresentativi relativi **A.** ai parametri morfologici e **B.** alla marcatura con LCD (APC-coniugato) e Falloidina (FITC-coniugato) di L-EV.

Internalizzazione delle L-EV

L'internalizzazione delle EV di limone in C- e GD-HUVEC è stata valutata mediante microscopia confocale. C- e GD-HUVEC non permeabilizzate sono state incubate per 4 ore a 37°C con la dose massima di L-EV pari a $25 \mu\text{g/mL}$ e, come mostrato dalle immagini di seguito riportate (*Figura 18*), si osserva come le L-EV, marcate con PKH67 (Green Fluorescent Cell Linker Kits), sono in grado di penetrare all'interno della cellula. La F-actina del citoscheletro, in rosso, è stata marcata utilizzando rodamina-falloidina, una sonda coniugata al colorante fluorescente, tetrametilrodamina (TRITC); il nucleo, in blu, è stato messo in evidenza con il DAPI, un colorante fluorescente intercalante del DNA che lega regioni ricche in sequenze A-T.

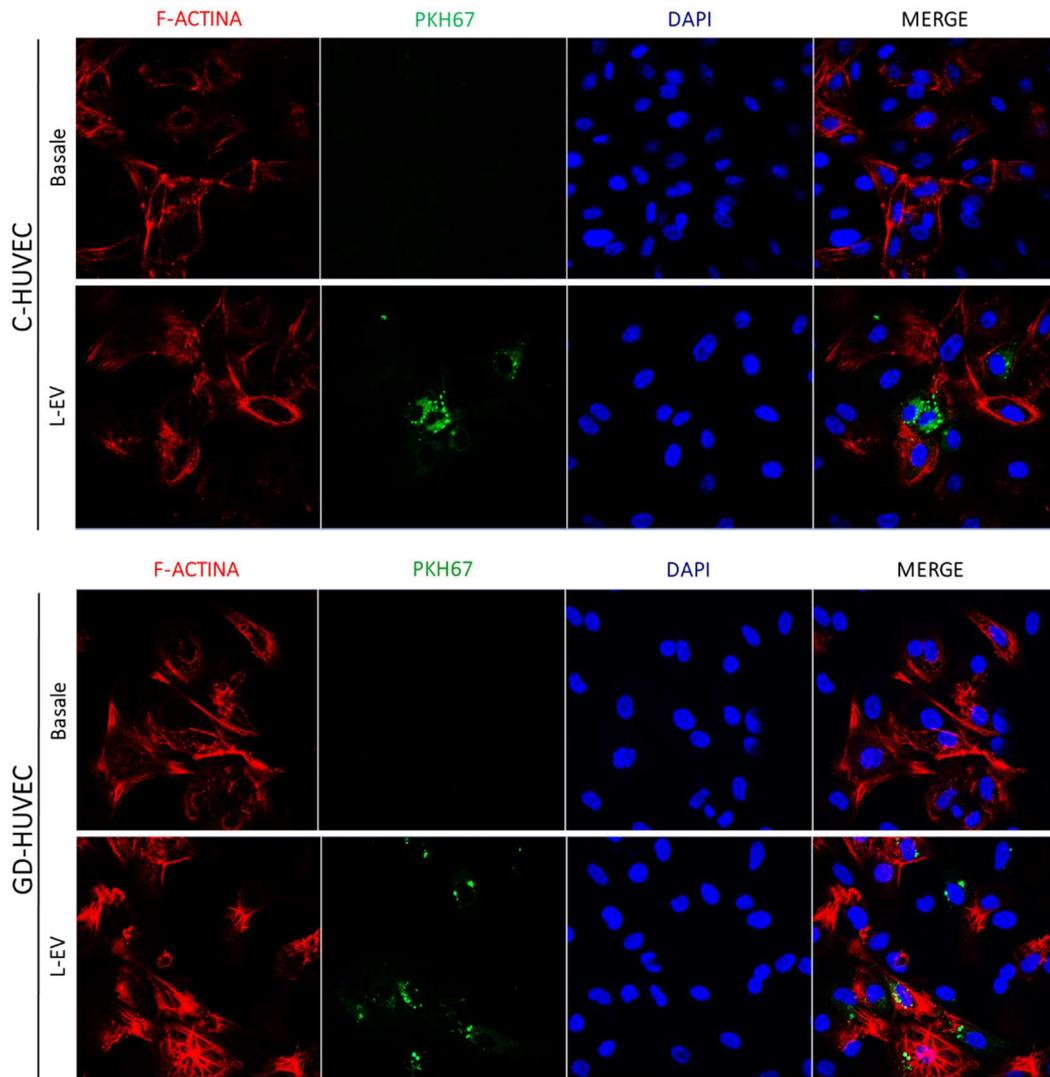


Figura 18. Immagini rappresentative relative all'internalizzazione di L-EV (25 $\mu\text{g}/\text{mL}$) in C-HUVEC e GD-HUVEC. Si osservano in rosso la F-actina (F-ACTINA), in verde le L-EV (PKH67), in blu il nucleo (DAPI) e nel MERGE la co-marcatore con F-ACTINA, PKH67 e DAPI.

Effetto delle L-EV sull'espressione totale di VCAM-1

Successivamente, mediante citometria a flusso, è stata valutata l'espressione proteica totale di VCAM-1 (molecola di adesione vascolare-1). C- e GD-HUVEC sono state pre-trattate con due diverse concentrazioni di L-EV (10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ e 25 $\mu\text{g}/\text{mL}$) per 24 ore e successivamente stimulate con TNF- α ad una concentrazione di 10 ng/mL per 16 ore. I risultati riportati nell'istogramma in *Figura 19* mostrano, innanzitutto, che lo stimolo con TNF- α incrementa l'espressione di VCAM-1 sia in C- che in GD-HUVEC, benché si raggiunga la significatività statistica solo nelle C-HUVEC ($P < 0.05$). Il trattamento con le L-EV non modifica l'espressione rispetto alla condizione Basale sia in C- che in GD-HUVEC.

Mentre, si osserva una tendenza alla diminuzione dose-dipendente solo nelle GD-HUVEC trattate con TNF- α .

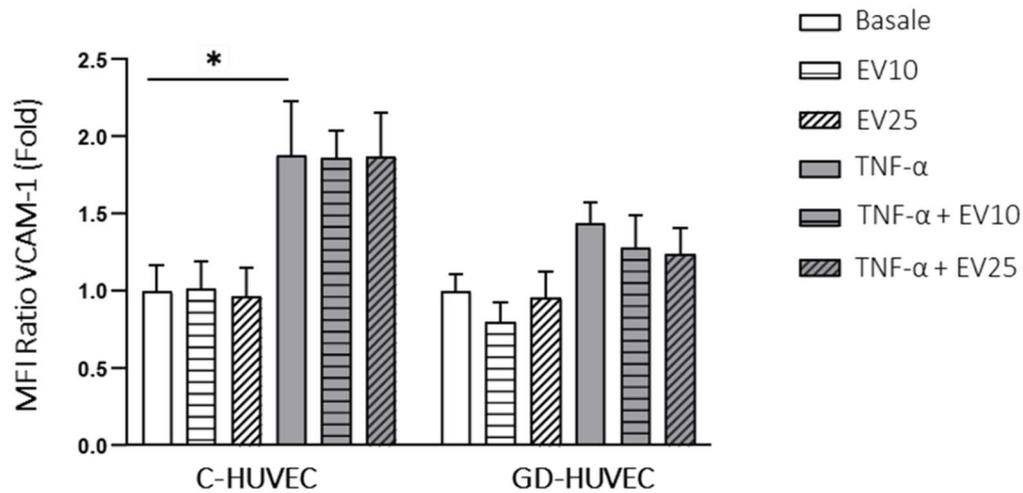
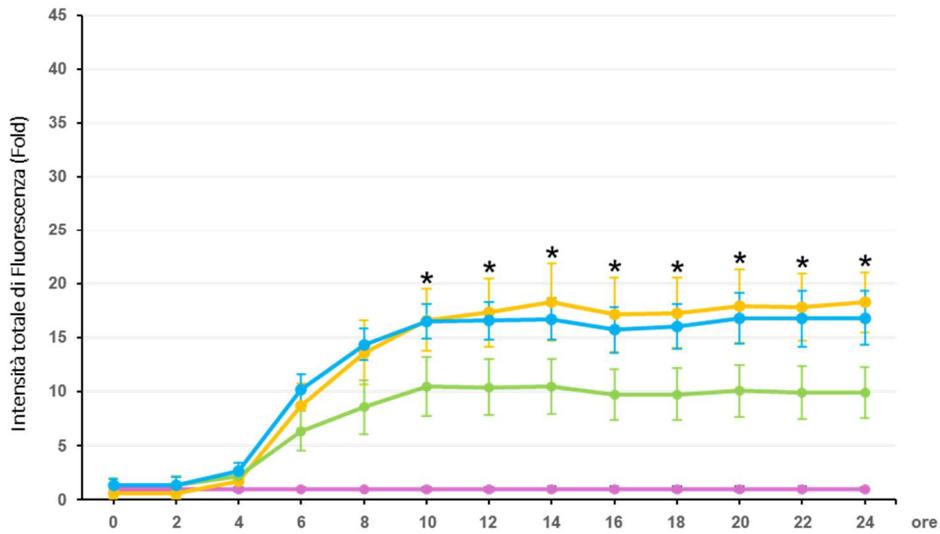


Figura 19. Istogrammi relativi all'espressione totale di VCAM-1 in C-HUVEC (n=5) e GD-HUVEC (n=5) pre-trattate (24 ore) con EV10 (10 $\mu\text{g}/\text{mL}$) e EV25 (25 $\mu\text{g}/\text{mL}$) e successivamente stimulate con TNF- α (16 ore; 10 ng/mL). I dati sono stati analizzati con FACS Diva e FlowJo v.8.8.6 software (BD) e presentati come Fold \pm SEM rispetto al Basale del Rapporto di Intensità di Fluorescenza Media (MFI Ratio), calcolato come rapporto tra l'MFI dei campioni positivi e l'MFI dei campioni negativi (Isotipo). Il calcolo della significatività statistica è stato effettuato mediante il *test ANOVA* a due vie (Two-way ANOVA) seguita dal test di Tukey per il controllo multiplo. * $P < 0.05$.

Effetto delle L-EV sull'esposizione di VCAM-1

L'esposizione di VCAM-1 sulla membrana è stata valutata mediante il sistema di imaging IncuCyte®. C- e GD-HUVEC sono state stimulate con TNF- α ad una concentrazione di 10 ng/mL dopo pre-trattamento per 24 ore con due diverse concentrazioni di L-EV: 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ e 25 $\mu\text{g}/\text{mL}$. Il grafico riportato in *Figura 20* mostra come, sia in C- che in GD-HUVEC, lo stimolo con TNF- α incrementa l'esposizione di VCAM-1, in maniera statisticamente significativa rispetto al Basale a partire dalla decima ora di stimolazione e fino a 24 ore ($P < 0.05$ vs Basale). In maniera interessante, il pre-trattamento con L-EV riduce in maniera dose-dipendente l'esposizione di VCAM-1 indotta dallo stimolo con il TNF- α , raggiungendo la significatività statistica solo nelle GD-HUVEC ad entrambe le concentrazioni di L-EV utilizzate (10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ e 25 $\mu\text{g}/\text{mL}$) ($P < 0.05$) a partire dalla decima ora di stimolazione con TNF- α e fino a 24 ore.

C-HUVEC



GD-HUVEC

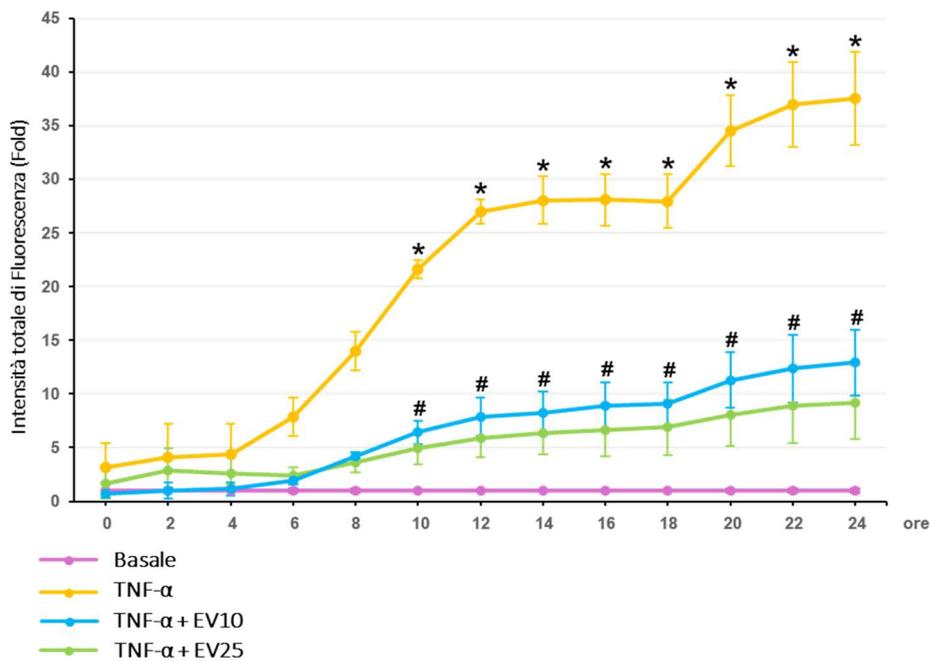
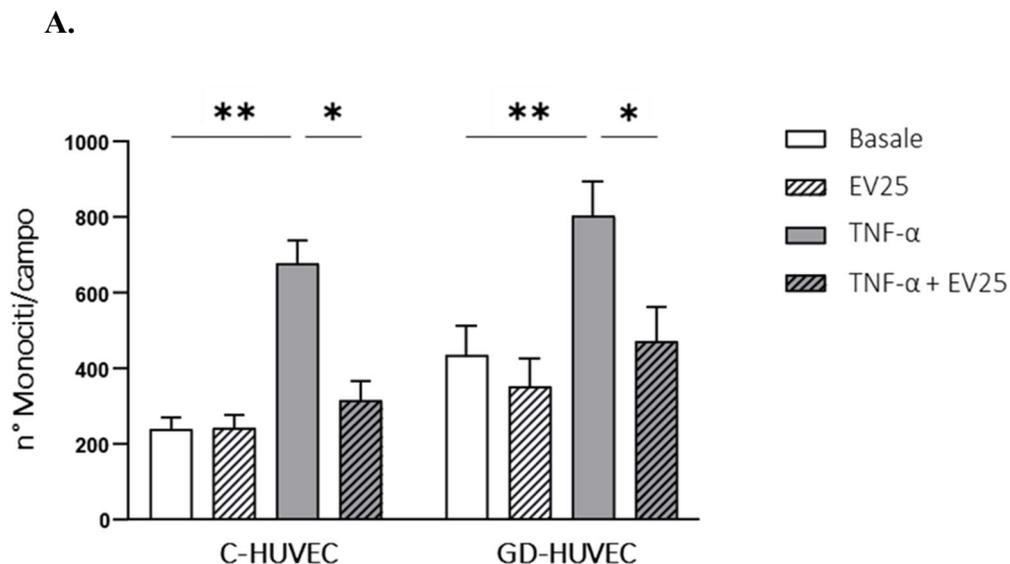


Figura 20. Grafici relativi all'esposizione su membrana di VCAM-1 in C-HUVEC (n=3) e GD-HUVEC (n=3). L'emissione di fluorescenza data dall'anticorpo anti-VCAM-1 PE-coniugato, è stata acquisita e misurata dallo strumento IncuCyte® ogni 2 ore e fino a 24 ore, a partire dal trattamento con TNF- α (10 ng/mL). L'analisi della fluorescenza è stata effettuata considerando la Media \pm SEM di 8 misurazioni effettuate per ciascuna condizione sperimentale. I dati sono stati riportati come rapporto (Fold) tra i valori ottenuti per i trattamenti rispetto alla fluorescenza emessa dalla condizione non trattata (Basale), sia per C- che per GD-HUVEC. Il calcolo della

significatività statistica è stato effettuato per ciascun tempo sperimentale mediante il *test ANOVA* a due vie (a misure ripetute) seguita dal test di Tukey. * $P < 0.05$ (TNF- α vs Basale); # $P < 0.05$ (TNF- α + EV10 e TNF- α + EV25 vs TNF- α).

Effetto delle L-EV sull'adesione di monociti U937 alle HUVEC

Il saggio di adesione permette di valutare il numero di monociti U937 adesi al monostrato di C- e GD-HUVEC trattate secondo il protocollo sperimentale precedentemente dettagliato. I risultati, mostrati sia, come istogramma (*Figura 21A*) che, come foto rappresentative ottenute mediante osservazione al microscopio (*Figura 21B*), indicano che, già basalmente, il numero di monociti adesi alle HUVEC tende ad essere aumentato nelle GD- rispetto alle C-HUVEC. Rispetto al Basale, il pre-trattamento con le L-EV, alla dose maggiore di 25 $\mu\text{g/mL}$, riduce l'adesione U937-HUVEC solo nelle GD-HUVEC, benché non si raggiunga la significatività statistica. Come atteso, lo stimolo per 16 ore con TNF- α incrementa significativamente l'adesione dei monociti al monostrato endoteliale sia in C- sia in GD-HUVEC ($P < 0.01$), e questa viene ridotta significativamente dal pre-trattamento con L-EV 25 $\mu\text{g/mL}$ ($P < 0.05$) in entrambe le colture.



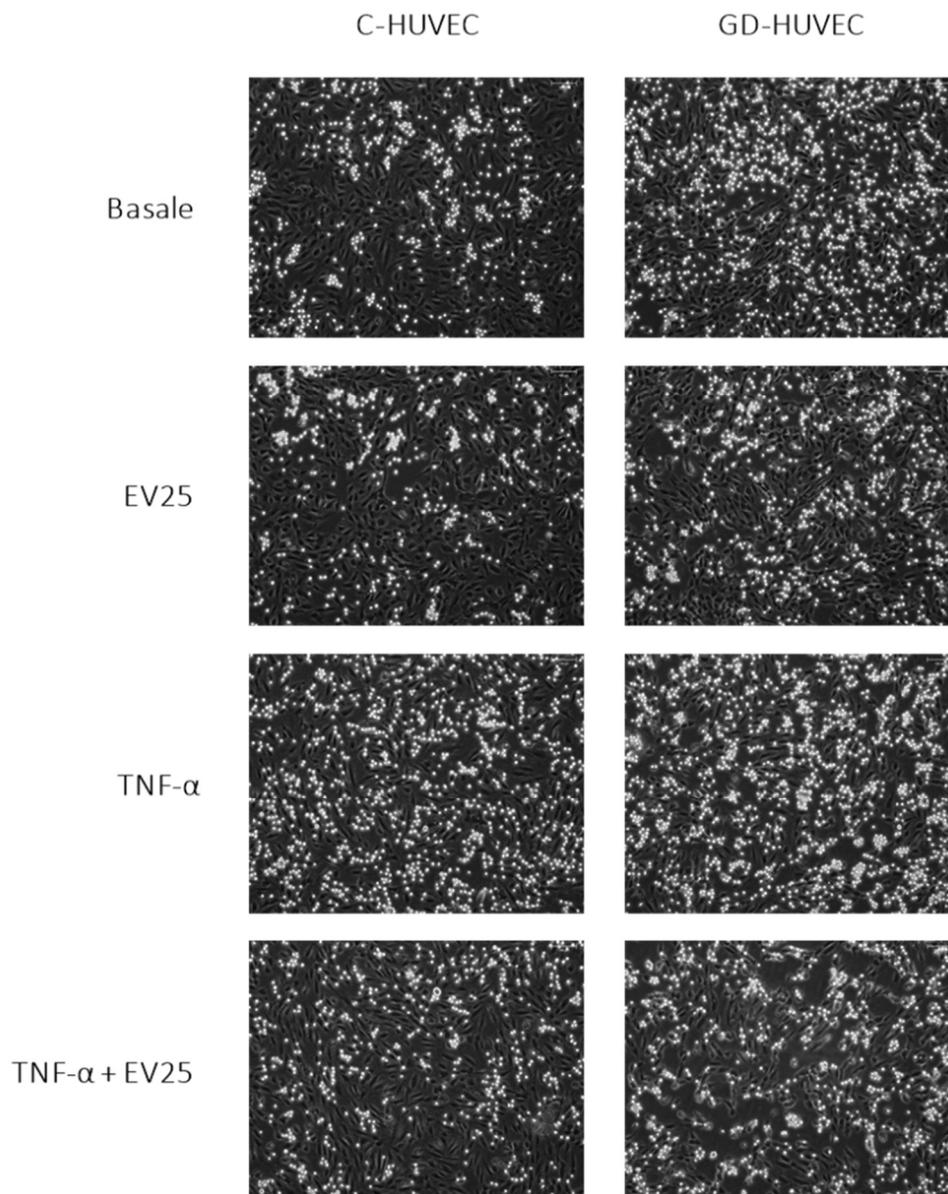
B.

Figura 21. A: Istogramma relativo al numero di monociti adesi a C-HUVEC (n=6) e GD-HUVEC (n=6) in seguito a pre-trattamento (24 ore) con L-EV 25 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (EV25) e successiva stimolazione con TNF- α (16 ore; 10 ng/mL). La conta dei monociti adesi alle HUVEC è stata effettuata mediante software ImageJ in almeno 3 foto, scelte casualmente, per ciascuna condizione sperimentale. I risultati derivano dalle medie \pm SEM di tutte le conte effettuate per ciascuna condizione sperimentale e mostrati come n° cellule/campo. Il calcolo della significatività statistica è stato effettuato mediante il test dell'ANOVA a due vie (Two-way ANOVA) seguito dal test di Tukey. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$. **B:** Immagini rappresentative che mostrano l'adesione di monociti U937 a C- e GD-HUVEC. Le immagini sono state acquisite mediante software Motic Image Plus ad ingrandimento 10X.

DISCUSSIONE

È noto che l'esposizione ad un ambiente avverso e a determinati fattori di rischio può contribuire ad innescare specifici meccanismi responsabili dell'insorgenza, dello sviluppo, di numerose condizioni patologiche. In particolare, l'esposizione all'iperglicemia, anche per periodi limitati, porta a modificazioni cellulari responsabili dell'insorgenza di una condizione pro-infiammatoria/ossidante che può persistere nel tempo, con un aumento del rischio di sviluppare malattie metaboliche e disordini cardiovascolari (Ray, 2020).

A tal riguardo, è stato ampiamente dimostrato che in donne affette da diabete gestazionale, anche se sottoposte ad un adeguato controllo metabolico, l'endotelio subisce alterazioni permanenti, riconducibili a cambiamenti epigenetici, che inducono un fenotipo pro-infiammatorio e pro-ossidante. La disfunzione endoteliale che ne deriva rappresenta, perciò, un marcatore precoce e un attore importante nello sviluppo delle complicanze cardiovascolari nella condizione diabetica (Coco et al., 2019).

In questo contesto, studi recenti condotti dal presente gruppo di ricerca hanno dimostrato che cellule endoteliali derivanti dal cordone ombelicale di donne affette da diabete gestazionale (GD-HUVEC) presentano, rispetto a cellule derivanti da donne di controllo (C-HUVEC), un'alterata omeostasi cellulare con un'aumentata attivazione delle *pathway* pro-infiammatorie, associate ad una maggior espressione ed esposizione di molecole di adesione quali VCAM-1 e ICAM-1 e ad una minore biodisponibilità di molecole vasoattive quali l'NO, con il possibile coinvolgimento del fattore di trascrizione NF-κB (Di Fulvio et al., 2014). Ne consegue che tali evidenze hanno permesso di utilizzare tale modello cellulare per condurre numerosi studi *in vitro* che hanno dimostrato l'effetto anti-infiammatorio e antiossidante di varie molecole di origine naturale (Di Tomo et al., 2012; Di Tomo et al., 2015). In particolare, è stato messo in luce che l'utilizzo preventivo di molecole protettive per l'endotelio potrebbe rappresentare un'ulteriore opportunità terapeutica.

Pertanto, nel presente lavoro è stato utilizzato il modello GD-HUVEC per valutare il potenziale ruolo anti-infiammatorio di EV isolate da *Citrus limon* L., sulla base della loro attività anti-infiammatoria osservata da studi condotti da Raimondo e collaboratori in macrofagi primari umani e murini (Raimondo et al., 2022).

In primis, è stata effettuata la caratterizzazione fenotipica di colture di HUVEC al quarto passaggio, poiché sono cellule primarie espianate dalla vena del cordone ombelicale umano, al fine di confermare che le colture utilizzate per gli esperimenti rappresentino colture pure di cellule endoteliali umane. I risultati ottenuti hanno mostrato la positività per CD31, CD34, CD105, CD144 e CD146, antigeni tipicamente presenti sulla superficie cellulare di cellule endoteliali, e la negatività per CD45, CD106 e CD326, antigeni caratteristici, rispettivamente, della linea emopoietica, di cellule endoteliali stimulate con citochine pro-infiammatorie, e di cellule epiteliali (*Tabella 3 e Figura 16*). Tali risultati hanno pertanto confermato che le cellule espianate e poi utilizzate per gli esperimenti sono colture di HUVEC.

Al fine di verificare che le L-EV isolate fossero integre, abbiamo eseguito una caratterizzazione fenotipica mediante citometria a flusso. Innanzitutto, considerando che le vescicole extracellulari di origine vegetale (PDEV) hanno dimensioni comprese tra 100 e 1000 nm (Lo et al., 2023), all'analisi citometrica sono state prese come riferimento dimensionale le piastrine (1-3 μm), e pertanto sono state considerate come EV tutte le particelle con dimensioni inferiori ad 1 μm (gate in *Figura 17A*). Le particelle considerate sono state successivamente analizzate per verificare la loro integrità di membrana, valutata sulla base della positività per LCD (un colorante lipofilico cationico che marca le membrane intatte) e la negatività per la Falloidina. Quest'ultima è infatti in grado di marcare l'actina intramembrana di particelle danneggiate. La conta di tutte le particelle così selezionate (gate in *Figura 17B*) ha permesso di verificare che in ogni μL della sospensione di L-EV analizzata sono presenti 86'119 vescicole intatte.

Successivamente, siamo andati a valutare se la sospensione di L-EV analizzata fosse capace di penetrare all'interno delle cellule HUVEC. In accordo con quanto dimostrato precedentemente dal gruppo di ricerca coordinato dal Professor

Riccardo Alessandro dell'Università degli Studi di Palermo in diversi modelli cellulari, è stato osservato che le L-EV, pre-marcate con il PKH67, e visibili come spot verdi, sono in grado di penetrare all'interno di entrambe le colture di C- e GD-HUVEC. A conferma, le cellule sono state incubate con il solo colorante (PKH67) e, come atteso, in questa condizione sperimentale non sono emersi spot verdi. Tuttavia, dalle immagini riportate, si osserva che le L-EV non sono state in grado di penetrare in tutte le cellule, poiché queste non sono state permeabilizzate per evitare il danneggiamento del doppio strato fosfolipidico delle vescicole. Ciò si evidenzia anche dal fatto che la colorazione con Falloidina (in rosso) non è omogenea per tutte le cellule del monostrato di HUVEC, mentre la colorazione con DAPI, che non necessita di permeabilizzazione, si presenta nitida ed omogenea in tutte le cellule, sia in C- che in GD-HUVEC (*Figura 18*).

La scelta delle dosi di L-EV da utilizzare in questo studio è stata effettuata sulla base dei dati ottenuti precedentemente da studi condotti da Raimondo e collaboratori, in cui è stato valutato l'effetto antinfiammatorio di L-EV su una linea di macrofagi murini (RAW264.7) e colture primarie di macrofagi umani. Nel dettaglio, in questi studi, la valutazione della vitalità cellulare effettuata su colture di RAW264.7 trattate per 24 e 48 ore con dosi crescenti di L-EV (da 1 a 50 µg/mL) non ha mostrato alcuna variazione dei parametri di vitalità cellulare (Raimondo et al., 2022). Benché si tratti di colture cellulari differenti, anche le nostre valutazioni preliminari su colture di C- e GD-HUVEC non hanno mostrato alterazioni morfologiche riconducibili a tossicità in seguito al trattamento con L-EV alle dosi di 10 e 25 µg/mL utilizzate (dati non mostrati).

Una volta stabilite le concentrazioni da utilizzare nel nostro modello cellulare, siamo andati ad indagare il potenziale effetto antinfiammatorio di EV isolate da *Citrus limon* L. in C- e GD-HUVEC pre-trattate per 24 ore con le L-EV (10 e 25 µg/mL) e successivamente stimulate per 16 ore con la citochina pro-infiammatoria TNF- α (10 ng/mL). Le ridotte quantità di EV che si riescono ad estrarre da limone e che ci sono state fornite per questo studio sperimentale ci hanno indotto a scegliere di valutare *in primis* il potenziale coinvolgimento della molecola di adesione VCAM-1 in quanto anche maggiormente modulabile da stimoli. Invece

ICAM-1, ad esempio, risulta essere già costitutivamente espressa nelle cellule endoteliali (Di Tomo et al., 2015; Ucci et al., 2019).

Pertanto, in primo luogo siamo andati a valutare l'espressione proteica totale di VCAM-1 e, come atteso, abbiamo osservato un significativo aumento in seguito a trattamento con il TNF- α , sia in C- che in GD-HUVEC. Infatti, come osservato in precedenti studi su questo stesso modello cellulare, lo stimolo con la ben nota citochina pro-infiammatoria TNF- α porta nelle GD-HUVEC ad una maggiore attivazione del fattore di trascrizione NF- κ B stimolando l'espressione di molecole di adesione come ICAM-1 e VCAM-1 (Di Tomo et al., 2015; Ucci et al., 2019). Il pre-trattamento con L-EV per 24 ore mostra un trend alla riduzione dell'espressione proteica totale di VCAM-1 solo in GD-HUVEC (*Figura 19*). Per avviare l'interazione tra leucociti e l'endotelio, VCAM-1 deve essere prima prodotto e poi esposto sulla superficie delle cellule endoteliali; la sua esposizione permetterà di interagire con l'integrina presente sulla superficie dei leucociti portando al rimodellamento dell'actina e alla rottura delle giunzioni delle cellule endoteliali, guidando la migrazione direzionale dei leucociti dalla circolazione sanguigna ai siti di lesione (Kong et al., 2018; Singh et al., 2023).

Per questo motivo, in aggiunta all'espressione totale, abbiamo valutato l'esposizione di VCAM-1 sulla membrana di cellule C- e GD-HUVEC. Nello specifico, la molecola di adesione VCAM-1 viene prima prodotta e solo la quota che verrà poi esposta sulla superficie cellulare risulta essere funzionale. In maniera interessante, dalla valutazione dell'esposizione in live (*Figura 20*) si osserva che in seguito al pre-trattamento con le L-EV (10 e 25 μ g/mL) per 24 ore e successiva stimolazione con TNF- α (10 ng/mL), l'esposizione di VCAM-1 sulla superficie cellulare diminuisce significativamente nelle GD-HUVEC ad entrambe le concentrazioni di L-EV utilizzate. Mentre si osserva un trend alla diminuzione alla dose massima EV25 (25 μ g/mL) nelle C-HUVEC. È importante sottolineare che, benché non si osservi una significativa azione delle L-EV sull'espressione totale di VCAM-1, l'effetto osservato sulla quota di VCAM-1 effettivamente esposta sulla membrana, e quindi funzionale, indica invece che è possibile ipotizzare un ruolo protettivo dato dal pretrattamento con L-EV soprattutto nelle GD-HUVEC. Precedenti studi condotti su questo modello cellulare riportano

infatti che l'esposizione di membrana di VCAM-1 aumenta maggiormente nelle GD-HUVEC, rispetto alle C-HUVEC, dopo stimolo con TNF- α , rendendo maggiormente evidente una sua riduzione operata da molecole che esercitano un effetto antinfiammatorio.

Nello specifico, studi condotti da Di Tomo e collaboratori hanno evidenziato che il pretrattamento con molecole di origine naturale, quali centella asiatica, acido lipoico e carotenoidi (β -carotene e licopene), è in grado di ridurre significativamente l'esposizione di membrana di VCAM-1, in particolar modo nelle HUVEC derivanti da donne affette da diabete gestazionale stimulate con TNF- α (Di Tomo et al., 2015; Ucci et al., 2019).

Infine, poiché *in vivo* l'esposizione di VCAM-1 e di altre molecole di adesione si traduce in un aumento di monociti adesi alle cellule endoteliali nel sito dell'infiammazione, siamo andati a valutare l'adesione di una linea di monociti (U937) a C- e GD-HUVEC pretrattate con la dose massima di L-EV 25 μ g/mL e stimulate con TNF- α (10 ng/mL). I risultati ottenuti mediante saggio di adesione, riportati in istogramma (*Figura 21A*) e nelle immagini rappresentative (*Figura 21B*), mostrano che, già basalmente, il numero di monociti adesi alle HUVEC è maggiore nelle GD- rispetto alle C-HUVEC, ed esso viene ulteriormente incrementato in seguito a stimolazione con la citochina pro-infiammatoria TNF- α , in accordo con dati riportati in precedenti studi *in vitro* (Di Tomo et al., 2015; Ucci et al., 2019). L'effetto anti-infiammatorio dato dal pre-trattamento con L-EV è stato confermato dalla riduzione significativa osservata per il numero di monociti adesi alle HUVEC-TNF- α -stimolate, sia per C-HUVEC che per GD-HUVEC. È importante ricordare che l'adesione dei monociti alle HUVEC rappresenta l'ultimo processo di un complesso meccanismo che vede coinvolti numerosi attori, tra cui varie molecole di adesione oltre VCAM-1 valutata in questo studio. Questo spiegherebbe il motivo per cui mediante il saggio di adesione è stato possibile osservare un effetto protettivo delle L-EV anche nelle C-HUVEC per le quali invece, nei risultati precedenti, che hanno considerato il solo coinvolgimento di VCAM-1, non si era osservato un effetto significativo, che invece risulta essere più evidente nelle GD-HUVEC.

Pertanto, i dati ottenuti in questo studio si associano ai risultati precedentemente ottenuti in seguito a pre-trattamento con L-EV in macrofagi murini e umani stimolati con LPS, in cui si osservano una diminuita espressione genica e proteica di citochine pro-infiammatorie, come IL-6, IL1- β e TNF- α , e una ridotta traslocazione nucleare e fosforilazione di NF- κ B (Raimondo et al., 2022).

Alla luce di tali considerazioni è auspicabile approfondire le conoscenze sui meccanismi anti-infiammatori potenzialmente associati all'uso di L-EV nel modello di cellule endoteliali utilizzato in questo studio, indagando, nello specifico, il loro effetto sulla *pathway* indotta dall'attivazione del fattore di trascrizione NF- κ B oltre che su altre molecole di adesione, come ICAM-1, citochine infiammatorie e altri *markers* infiammatori per i quali è noto un ruolo cruciale nell'infiammazione endoteliale (Di Fulvio et al., 2014; Di Tomo et al., 2015).

Benché siano necessari ulteriori studi, nel complesso questi risultati suggeriscono che le L-EV sono in grado di esercitare un'azione antinfiammatoria in un modello *in vitro* di HUVEC derivanti da cordoni di donne affette da diabete gestazionale, contribuendo a ripristinare l'omeostasi endoteliale alterata dall'esposizione cronica *in vivo* a livelli elevati di glucosio.

CONCLUSIONE

Sulla base dei risultati ottenuti da questo studio è possibile ipotizzare che le EV derivate da *Citrus limon* L. potrebbero rappresentare una futura strategia terapeutica promettente per lo sviluppo di nuovi approcci farmacologici al fine di attenuare l'infiammazione vascolare associata all'iperglicemia.

Pertanto, la ricerca futura dovrà essere focalizzata sull'identificazione di pathway molecolari e bersagli delle PDEV di limone, consentendo così una migliore comprensione degli effetti biologici regolati da queste vescicole.

In tale modo, studi futuri potrebbero contribuire allo sviluppo di nuove strategie di prevenzione utili verso l'insorgenza e la progressione delle complicanze vascolari legate al diabete gestazionale.

BIBLIOGRAFIA

- About, N. M. Al, Tupper, C., & Jialal, I. (2023). Genetics, Epigenetic Mechanism. *StatPearls*. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK532999/>
- Bianciardi, S., Merlotti, D., & Materozzi, M. (2021). Vescicole extracellulari e metabolismo osseo: ruolo e possibili implicazioni cliniche. *L'Endocrinologo* 2021 22:1, 22(1), 28–33. <https://doi.org/10.1007/S40619-021-00817-4>
- Clyne, A. M. (2021). Endothelial response to glucose: dysfunction, metabolism, and transport. *Biochemical Society Transactions*, 49(1), 313. <https://doi.org/10.1042/BST20200611>
- Coco, C., Sgarra, L., Potenza, M. A., Nacci, C., Pasculli, B., Barbano, R., Parrella, P., & Montagnani, M. (2019). Can Epigenetics of Endothelial Dysfunction Represent the Key to Precision Medicine in Type 2 Diabetes Mellitus? *International Journal of Molecular Sciences* 2019, Vol. 20, Page 2949, 20(12), 2949. <https://doi.org/10.3390/IJMS20122949>
- DeFronzo, R. A., Ferrannini, E., Groop, L., Henry, R. R., Herman, W. H., Holst, J. J., Hu, F. B., Kahn, C. R., Raz, I., Shulman, G. I., Simonson, D. C., Testa, M. A., & Weiss, R. (2015). Type 2 diabetes mellitus. *Nature Reviews Disease Primers* 2015 1:1, 1(1), 1–22. <https://doi.org/10.1038/nrdp.2015.19>
- Di Fulvio, P., Pandolfi, A., Formoso, G., Di Silvestre, S., Di Tomo, P., Giardinelli, A., De Marco, A., Di Pietro, N., Taraborrelli, M., Sancilio, S., Di Pietro, R., Piantelli, M., & Consoli, A. (2014). Features of endothelial dysfunction in umbilical cord vessels of women with gestational diabetes. *Nutrition, Metabolism and Cardiovascular Diseases*, 24(12), 1337–1345. <https://doi.org/10.1016/J.NUMECD.2014.06.005>
- Di Tomo, P., Di Silvestre, S., Cordone, V. G. P., Giardinelli, A., Faricelli, B., Pipino, C., Lanuti, P., Peng, T., Formoso, G., Yang, D., Arduini, A., Chiarelli, F., Pandolfi, A., & Di Pietro, N. (2015). Centella Asiatica and Lipoic Acid, or a combination thereof, inhibit monocyte adhesion to endothelial cells from umbilical cords of gestational diabetic women.

Nutrition, Metabolism and Cardiovascular Diseases, 25(7), 659–666.
<https://doi.org/10.1016/J.NUMECD.2015.04.002>

Galicia-Garcia, U., Benito-Vicente, A., Jebari, S., Larrea-Sebal, A., Siddiqi, H., Uribe, K. B., Ostolaza, H., & Martín, C. (2020b). Pathophysiology of Type 2 Diabetes Mellitus. *International Journal of Molecular Sciences*, 21(17), 1–34. <https://doi.org/10.3390/IJMS21176275>

Gurung, S., Perocheau, D., Touramanidou, L., & Baruteau, J. (2021). The exosome journey: from biogenesis to uptake and intracellular signalling. *Cell Communication and Signaling* 2021 19:1, 19(1), 1–19. <https://doi.org/10.1186/S12964-021-00730-1>

Katsarou A, Gudbjörnsdóttir S, Rawshani A, Dabelea D, Bonifacio E, Anderson BJ, Jacobsen LM, Schatz DA, Lernmark Å. Type 1 diabetes mellitus. *Nat Rev Dis Primers*. 2017 Mar 30;3:17016. doi: 10.1038/nrdp.2017.16. PMID: 28358037

Knapp M, Tu X, Wu R. Vascular endothelial dysfunction, a major mediator in diabetic cardiomyopathy. *Acta Pharmacol Sin*. 2019 Jan;40(1):1-8. doi: 10.1038/s41401-018-0042-6. Epub 2018 Jun 4. PMID: 29867137; PMCID: PMC6318313

Kong, D. H., Kim, Y. K., Kim, M. R., Jang, J. H., & Lee, S. (2018). Emerging Roles of Vascular Cell Adhesion Molecule-1 (VCAM-1) in Immunological Disorders and Cancer. *International Journal of Molecular Sciences*, 19(4). <https://doi.org/10.3390/IJMS19041057>

Konoshenko, M. Y., Lekhnov, E. A., Vlassov, A. V., & Laktionov, P. P. (2018). Isolation of Extracellular Vesicles: General Methodologies and Latest Trends. *BioMed Research International*, 2018. <https://doi.org/10.1155/2018/8545347>

Lekva, T., Norwitz, E. R., Aukrust, P., & Ueland, T. (2016). Impact of Systemic Inflammation on the Progression of Gestational Diabetes Mellitus. *Current Diabetes Reports*, 16(4), 1–11. <https://doi.org/10.1007/S11892-016-0715-9/FIGURES/1>

- Li, L., Zhong, L., Tang, C., Gan, L., Mo, T., Na, J., He, J., & Huang, Y. (2022). CD105: tumor diagnosis, prognostic marker and future tumor therapeutic target. *Clinical and Translational Oncology* 2022 24:8, 24(8), 1447–1458. <https://doi.org/10.1007/S12094-022-02792-0>
- Lo, K. J., Wang, M. H., Ho, C. T., & Pan, M. H. (2023). Plant-Derived Extracellular Vesicles: A New Revolutionization of Modern Healthy Diets and Biomedical Applications. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 72. https://doi.org/10.1021/ACS.JAFC.3C06867/ASSET/IMAGES/LARGE/JF3C06867_0005.JPEG
- Maraschin, J. de F. (2013). *Classification of Diabetes*. 12–19. https://doi.org/10.1007/978-1-4614-5441-0_2
- McIntyre, H. D., Catalano, P., Zhang, C., Desoye, G., Mathiesen, E. R., & Damm, P. (2019). Gestational diabetes mellitus. *Nature Reviews. Disease Primers*, 5(1). <https://doi.org/10.1038/S41572-019-0098-8>
- Medina-Leyte, D. J., Domínguez-Pérez, M., Mercado, I., Villarreal-Molina, M. T., & Jacobo-Albavera, L. (2020). Use of Human Umbilical Vein Endothelial Cells (HUVEC) as a Model to Study Cardiovascular Disease: A Review. *Applied Sciences* 2020, Vol. 10, Page 938, 10(3), 938. <https://doi.org/10.3390/APP10030938>
- Natarajan, R. (2021). Epigenetic Mechanisms in Diabetic Vascular Complications and Metabolic Memory: The 2020 Edwin Bierman Award Lecture. *Diabetes*, 70(2), 328. <https://doi.org/10.2337/DBI20-0030>
- Nguyen-Ngo C, Jayabalan N, Salomon C, Lappas M. Molecular pathways disrupted by gestational diabetes mellitus. *J Mol Endocrinol*. 2019 Oct;63(3):R51-R72. doi: 10.1530/JME-18-0274. PMID: 31416051
- Patriarca, C., Macchi, R. M., Marschner, A. K., & Mellstedt, H. (2012). Epithelial cell adhesion molecule expression (CD326) in cancer: A short review. *Cancer Treatment Reviews*, 38(1), 68–75. <https://doi.org/10.1016/J.CTRV.2011.04.002>

- Plows, J. F., Stanley, J. L., Baker, P. N., Reynolds, C. M., & Vickers, M. H. (2018). The Pathophysiology of Gestational Diabetes Mellitus. *International Journal of Molecular Sciences*, *19*(11). <https://doi.org/10.3390/IJMS19113342>
- Poznyak, A., Grechko, A. V., Poggio, P., Myasoedova, V. A., Alfieri, V., & Orekhov, A. N. (2020). The Diabetes Mellitus–Atherosclerosis Connection: The Role of Lipid and Glucose Metabolism and Chronic Inflammation. *International Journal of Molecular Sciences*, *21*(5). <https://doi.org/10.3390/IJMS21051835>
- Raimondo, S., Naselli, F., Fontana, S., Monteleone, F., Lo Dico, A., Saieva, L., Zito, G., Flugy, A., Manno, M., Di Bella, M. A., De Leo, G., & Alessandro, R. (2015). Citrus limon-derived nanovesicles inhibit cancer cell proliferation and suppress CML xenograft growth by inducing TRAIL-mediated cell death. *Oncotarget*, *6*(23), 19514. <https://doi.org/10.18632/ONCOTARGET.4004>
- Raimondo, S., Urzi, O., Meraviglia, S., Di Simone, M., Corsale, A. M., Rabienezhad Ganji, N., Palumbo Piccionello, A., Polito, G., Lo Presti, E., Dieli, F., Conigliaro, A., & Alessandro, R. (2022). Anti-inflammatory properties of lemon-derived extracellular vesicles are achieved through the inhibition of ERK/NF- κ B signalling pathways. *Journal of Cellular and Molecular Medicine*, *26*(15), 4195–4209. <https://doi.org/10.1111/JCMM.17404>
- Ray, A., & Ray, A. (2020). Introductory Chapter: Gestational Diabetes Mellitus. *Gestational Diabetes Mellitus - An Overview with Some Recent Advances*. <https://doi.org/10.5772/INTECHOPEN.86855>
- Rheinländer A, Schraven B, Bommhardt U. CD45 in human physiology and clinical medicine. *Immunol Lett*. 2018 Apr;*196*:22-32. doi: 10.1016/j.imlet.2018.01.009. Epub 2018 Jan 31. PMID: 29366662
- Sánchez-Trujillo, L., García-Montero, C., Fraile-Martinez, O., Guijarro, L. G., Bravo, C., De Leon-Luis, J. A., Saez, J. V., Bujan, J., Alvarez-Mon, M., García-Honduvilla, N., Saez, M. A., & Ortega, M. A. (2022). Considering

the Effects and Maternofoetal Implications of Vascular Disorders and the Umbilical Cord. *Medicina*, 58(12).
<https://doi.org/10.3390/MEDICINA58121754>

Siddiqui, H., Mahmood, T., Siddiqui, Mohd. H., Bagga, P., Ahsan, F., Shamim, A., Siddiqui, H., Mahmood, T., Siddiqui, Mohd. H., Bagga, P., Ahsan, F., & Shamim, A. (2019). A Clinical Insight into Gestational Diabetes. *Gestational Diabetes Mellitus - An Overview with Some Recent Advances*.
<https://doi.org/10.5772/INTECHOPEN.85892>

Singh V, Kaur R, Kumari P, Pasricha C, Singh R. ICAM-1 and VCAM-1: Gatekeepers in various inflammatory and cardiovascular disorders. *Clin Chim Acta*. 2023 Aug 1;548:117487. doi: 10.1016/j.cca.2023.117487. Epub 2023 Jul 11. PMID: 37442359

Ucci, M., Di Tomo, P., Tritschler, F., Cordone, V. G. P., Lanuti, P., Bologna, G., Di Silvestre, S., Di Pietro, N., Pipino, C., Mandatori, D., Formoso, G., & Pandolfi, A. (2019). Anti-inflammatory Role of Carotenoids in Endothelial Cells Derived from Umbilical Cord of Women Affected by Gestational Diabetes Mellitus. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 2019.
<https://doi.org/10.1155/2019/8184656>

Urzi, O., Gasparro, R., Rabienezhad Ganji, N., Alessandro, R., & Raimondo, S. (2022). Plant-RNA in Extracellular Vesicles: The Secret of Cross-Kingdom Communication. *Membranes* 2022, Vol. 12, Page 352, 12(4), 352.
<https://doi.org/10.3390/MEMBRANES12040352>

Wang, Z., Xu, Q., Zhang, N., Du, X., Xu, G., & Yan, X. (2020). CD146, from a melanoma cell adhesion molecule to a signaling receptor. *Signal Transduction and Targeted Therapy* 2020 5:1, 5(1), 1–15.
<https://doi.org/10.1038/s41392-020-00259-8>

Xavier, M. J., Roman, S. D., Aitken, R. J., & Nixon, B. (2019). Transgenerational inheritance: how impacts to the epigenetic and genetic information of parents affect offspring health. *Human Reproduction Update*, 25(5), 519–541.
<https://doi.org/10.1093/HUMUPD/DMZ017>