



*Università degli Studi di Firenze*

Dipartimento di Farmacologia Preclinica e Clinica  
“Mario Aiazzi Mancini”

DOTTORATO DI RICERCA IN  
“FARMACOLOGIA, TOSSICOLOGIA E  
CHEMIOTERAPIA”

CICLO XXV°

COORDINATORE Prof. FLAVIO MORONI

**CARATTERIZZAZIONE DI CELLULE  
DENDRITICHE UMANE NEL RIMODELLAMENTO  
VASCOLARE PATOLOGICO PER  
L’INDIVIDUAZIONE DI BERSAGLI  
FARMACOLOGICI**

Settore Scientifico Disciplinare BIO/14

**Tutore Teorico**

Prof.ssa Elisabetta Cerbai

---

**Tutore Scientifico**

Dott.ssa Astrid Parenti

---

**Dottoranda**

Dott.ssa Sara Paccosi

---

Anni 2010/2012



|  |                |
|--|----------------|
| <b>INTRODUZIONE</b>  | <b>pag. 1</b>  |
| <b>1.1 Fattori di rischio cardiovascolare</b>                          | <b>pag. 1</b>  |
| <b>1.2 Disfunzione endoteliale</b>                                     | <b>pag. 7</b>  |
| <b>1.2.1 Diabete, obesità e disfunzione endoteliale</b>                | <b>pag. 10</b> |
| <b>1.3 Rimodellamento vascolare patologico</b>                         | <b>pag. 14</b> |
| <b>1.4 Infiammazione e immunità adattativa</b>                         | <b>pag. 17</b> |
| <b>1.5 Cellule dendritiche</b>   | <b>pag. 23</b> |
| <b>1.6 Ruolo delle cellule dendritiche nelle complicanze vascolari</b> | <b>pag. 29</b> |
| <b>1.7 Cellule dendritiche e diabete</b>                               | <b>pag. 35</b> |
| <b>1.7.1 DC e diabete mellito di tipo I (DMT1)</b>                     | <b>pag. 35</b> |
| <b>1.7.2 Cellule dendritiche e diabete mellito di tipo 2 (DMT2)</b>    | <b>pag. 40</b> |
| <b>SCOPO</b>   | <b>pag. 44</b> |
| <b>MATERIALI E METODI</b>  | <b>pag. 47</b> |
| <b>2.1 Arruolamento dei pazienti e prelievi ematici</b>                | <b>pag. 47</b> |
| <b>2.2 Analisi delle DC circolanti</b>                                 | <b>pag. 49</b> |
| <b>2.3 Generazione <i>ex-vivo</i> di Mo-DC</b>                         | <b>pag. 50</b> |
| <b>2.4. Isolamento <i>ex-vivo</i> di linfociti umani</b>               | <b>pag. 51</b> |
| <b>2.5 Mixed Lymphocyte Reaction</b>                                   | <b>pag. 51</b> |
| <b>2.6 Coltura di cellule muscolari lisce coronariche umane</b>        | <b>pag. 52</b> |
| <b>2.7 Allestimento di Co-culture di DC immature e CASMC</b>           | <b>pag. 53</b> |

|  |                |
|--|----------------|
| <b>2.8 Preparazione dei terreni condizionati</b>   | <b>pag. 53</b> |
| <b>2.9 Migrazione cellulare</b>  | <b>pag. 54</b> |
| <b>2.10 Test di Adesione</b>   | <b>pag. 55</b> |
| <b>2.11 Modulazione farmacologica dell'adesione<br/>cellulare</b>  | <b>pag. 55</b> |
| <b>2.12 Immunofluorescenza</b>   | <b>pag. 56</b> |
| <b>2.13 Microscopia elettronica</b>  | <b>pag. 58</b> |
| <b>2.14 RT-PCR</b>   | <b>pag. 58</b> |
| <b>2.15 Analisi Statistica</b>   | <b>pag. 59</b> |
| <b>RISULTATI</b>   | <b>pag. 60</b> |
| <b>3.1 Caratterizzazione di DC circolanti in pazienti<br/>obese e affette da DMT2</b>                    | <b>pag. 60</b> |
| <b>3.2 Caratterizzazione fenotipica di Mo-DC generate<br/>da monociti di pazienti obese e diabetiche</b> | <b>pag. 63</b> |
| <b>3.3 Adesione di Mo-DC a cellule muscolari lisce vascolari<br/>di arteria coronarica umana</b>         | <b>pag. 64</b> |
| <b>3.4 Le CASMC stimolano la maturazione fenotipica<br/>di iDC</b>                                       | <b>pag. 67</b> |
| <b>3.5 Ultrastruttura e immunofluorescenza di DC<br/>co-coltivate</b>                                    | <b>pag. 69</b> |
| <b>3.6 Le CASMC stimolano la maturazione funzionale<br/>di iDC</b>                                       | <b>pag. 71</b> |
| <b>3.7 Il microambiente infiammatorio stimola l'adesione<br/>di mDC a CASMC</b>                          | <b>pag. 73</b> |

|  |                |
|--|----------------|
| <b>3.8 ICAM-1, VCAM-1, CD11c e CD18 sono coinvolti<br/>nell'adesione fra CASMC e DC</b>                              | <b>pag. 75</b> |
| <b>3.9 L'adesione fra mDC e CASMC è modulata dal trattamento<br/>farmacologico con Atorvastatina e Rosiglitazone</b> | <b>pag. 78</b> |
| <b>3.10 I fattori solubili rilasciati dalle mDC aumentano<br/>la capacità migratoria di CASMC</b>                    | <b>pag. 80</b> |
| <b>DISCUSSIONE E CONCLUSIONI</b>   | <b>pag. 82</b> |
| <b>BIBLIOGRAFIA</b>  | <b>pag. 95</b> |

## **INTRODUZIONE**

### **1.1 Fattori di rischio cardiovascolare**

Secondo stime della World Health Organization, le malattie cardiovascolari (CVD) rappresentano ancora oggi la prima causa di morte a livello mondiale. Solo nel 2008 sono state responsabili di più di 17 milioni di vittime [1]. L'identificazione di soggetti ad alto rischio cardiovascolare è uno degli obiettivi principali della prevenzione primaria individuale e costituisce la premessa necessaria per l'attivazione di azioni finalizzate alla riduzione dei fattori di rischio modificabili quali il cambiamento dello stile di vita o il trattamento farmacologico. Il primo a parlare di fattori di rischio cardiovascolare fu il cardiologo statunitense Thomas Royle Dawber che nel 1949 diede inizio al primo studio osservazionale condotto sulla popolazione di una intera cittadina, Framingham, nel Massachusetts [2]. Successivamente, i risultati di numerosi studi clinici osservazionali prospettici sulle patologie cardiovascolari, quali ad esempio il Framingham del 1998 [3], lo studio PROCAM [4], il progetto SCORE [5], il progetto italiano CUORE [6], il progetto Nuova Zelanda [7], hanno coerentemente portato all'identificazione di tutti quei fattori di rischio cardiovascolare che, correlando statisticamente con l'insorgenza di eventi cardiovascolari fatali e non, rappresentano elementi predisponenti e potenzialmente patogenetici. I

fattori di rischio vengono divisi tradizionalmente in **modificabili** (susceptibili di correzione mediante modifiche dell'alimentazione, del comportamento, dello stile di vita, o interventi farmacologici) e **non modificabili**.

**Fattori di rischio cardiovascolare modificabili:**

**Iperpressione:** pressione arteriosa sistolica  $\geq 160$  o diastolica 95 mmHg

*border line:* pressione arteriosa sistolica fra 140 e 159 o pressione arteriosa diastolica fra 90 e 94 mmHg.

**Ipercolesterolemia:** colesterolemia  $\geq 240$  mg/dl

*border line:* colesterolemia fra 200 e 239 mg/dl.

**Diabete:** glicemia  $\geq 126$  mg/dl o trattamento specifico.

*border line:* glicemia fra 110 e 125 mg/dl.

**Sindrome metabolica:** presenza di tre o più delle seguenti componenti:

➤ obesità centrale (circonferenza vita  $>102$  cm negli uomini e  $>88$  cm nelle donne)

➤ alterata regolazione della glicemia (glicemia a digiuno  $\geq 110$  mg/dl) o pregressa diagnosi di diabete.

➤ trigliceridemia elevata ( $\geq 150$  mg/dl)

➤ colesterolemia - HDL bassa ( $<40$  mg/dl negli uomini e  $<50$  mg/dl nelle donne)

➤ pressione arteriosa elevata ( $\geq 130/85$  mmHg) o in trattamento antipertensivo.

**Abitudine al fumo:** viene considerato fumatore chi fuma anche solo una sigaretta al giorno, a settimana o al mese; non fumatori ed ex fumatori sono considerate quelle persone che hanno smesso di fumare da almeno un anno.

**Sovrappeso:** indice di massa corporea 25,0 - 29,9 Kg/m<sup>2</sup>.

**Obesità:** indice di massa corporea (IMC)  $\geq 30$  Kg/m<sup>2</sup>.

**Adiposità addominale:**

➤ circonferenza vita > 102 cm negli uomini e 88 cm nelle donne

➤ rapporto vita/fianchi > 0,95 negli uomini e 0,85 nelle donne.

**Sedentarietà:** riguarda la sedentarietà nel tempo libero e nell'attività lavorativa.

**Fattori di rischio cardiovascolare non modificabili**

**età:** il rischio di malattie cardiovascolari aumenta con l'età e, nei pazienti anziani, l'età diviene il fattore di rischio dominante.

**sesso:** gli studi finora condotti hanno fatto emergere un rischio maggiore negli uomini rispetto alle donne in pre-menopausa. Dopo la menopausa tuttavia, il rischio cardiovascolare nelle donne tende ad aumentare rapidamente. L'effetto protettivo è esercitato, almeno in parte, dagli estrogeni che favoriscono livelli più elevati di colesterolo HDL rispetto agli uomini.

**familiarità:** il rischio di malattia coronarica è tanto maggiore quanto più diretto è il grado di parentela con un individuo già colpito,

quanto più elevato è il numero di parenti affetti, soprattutto consanguinei di primo grado, e quanto più precocemente si è manifestata la malattia in questi soggetti (ammalati o deceduti in età < 55 anni negli uomini e < 65 anni nelle donne a causa di ictus e infarto del miocardio). In alcuni casi, la familiarità è dovuta alla trasmissione ereditaria di altri fattori di rischio quali diabete, ipertensione o ipercolesterolemia [4,8,9].

Negli anni '80 le linee guida sulla prevenzione cardiovascolare identificavano i soggetti ad alto rischio da sottoporre ad un intensivo trattamento preventivo, sulla base di singoli fattori di rischio. Tuttavia, il riconoscimento che spesso differenti fattori si presentano contemporaneamente (esercitando effetti sinergici e aumentando così il rischio di sviluppare CVD), ha portato negli ultimi anni a sviluppare il concetto di Rischio Cardiovascolare Globale (RCG), il cui calcolo deriva da funzioni elaborate sulla base dei numerosi studi sopra citati. Questo indicatore permette di calcolare la probabilità, in base alla presenza e severità di più fattori di rischio, di incorrere in eventi cardiovascolari maggiori nei successivi 10 anni. Ciò permette l'identificazione di pazienti che, sebbene non siano ancora andati incontro a manifestazioni cliniche di aterosclerosi e risultino apparentemente asintomatici, data la copresenza di più fattori possono essere ad alto rischio per patologie cardiovascolari [10]. In ogni caso, i pazienti con malattia coronarica, arteriosa periferica e cerebrovascolare, ed i diabetici, sono considerati comunque ad alto rischio per

CVD e quindi da trattare con i farmaci. Un esempio di carta SCORE per la valutazione del RCG per paesi a basso rischio CVD come l'Italia è mostrata nella Figura 1.

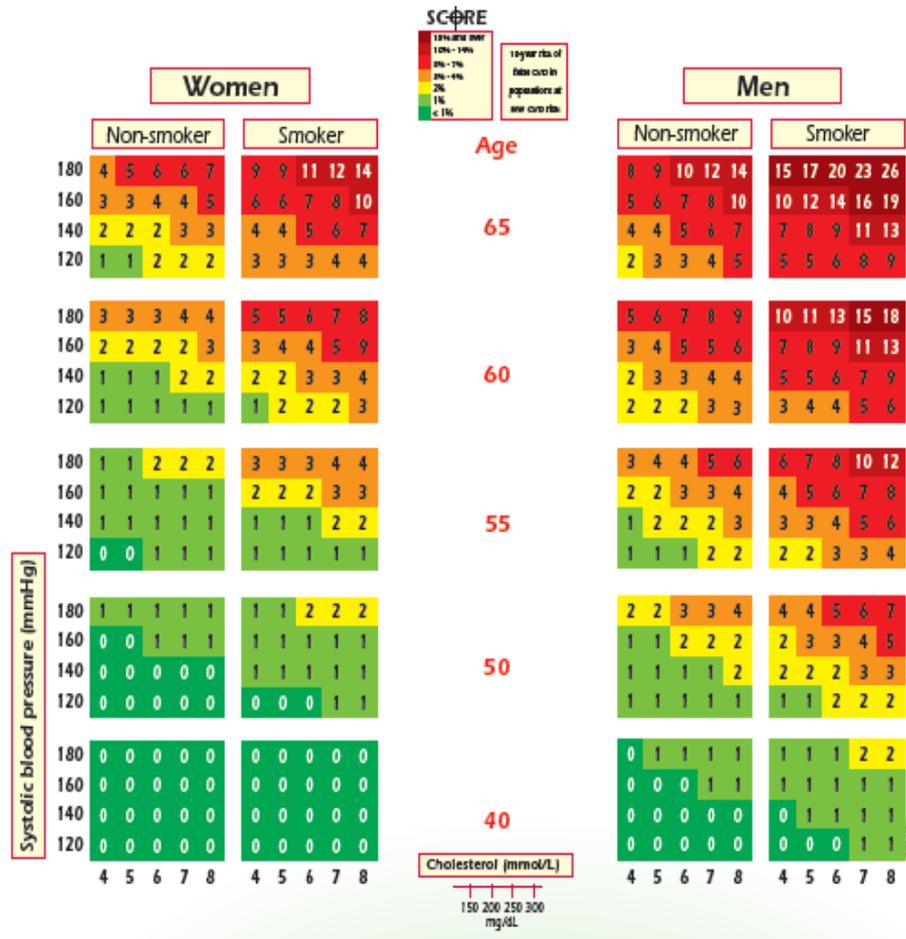


Figura 1. Stima del rischio di incorrere in un evento cardiovascolare maggiore entro 10 anni in popolazioni a basso rischio cardiovascolare. Carta basata sul colesterolo totale [5].

La maggior parte dei pazienti affetti da diabete mellito di tipo 2 (DMT2) sviluppa patologie cardiovascolari con sostanziale perdita dell'aspettativa di vita. Ciò è in qualche modo correlato all'alta

prevalenza di altri fattori di rischio, come ad esempio l'ipertensione e l'obesità [11]. L'associazione clinica fra obesità, diabete e patologie cardiovascolari è ampiamente riconosciuta, ma le basi molecolari di tale correlazione ed il loro significato fisiologico, non sono ancora ben chiari [12]. Il DMT2 è una patologia caratterizzata dalla coesistenza di gradi variabili di insulino-resistenza ed un' inappropriata secrezione insulinica con esito nell'iperglicemia [13]. Sia fattori genetici che ambientali contribuiscono al determinismo dell'iperglicemia nel DMT2. Circa l' 80% dei pazienti con DMT2 sono obesi: l'obesità stessa, in particolare quella viscerale o centrale, causa o peggiora l'insulino-resistenza. L'obesità è una condizione patologica che identifica un eccesso di tessuto adiposo. Nella stragrande maggioranza dei casi l'obesità rappresenta una componente importante della sindrome metabolica, una costellazione di fattori di rischio cardiovascolare che comprende l'aumento dei livelli plasmatici di trigliceridi, ridotti livelli di colesterolo legato alle lipoproteine ad alta densità (HDL), ipertensione arteriosa, ridotta tolleranza ai carboidrati e/o diabete mellito [14,15]. Una costante caratteristica dei pazienti con sindrome metabolica è l'insulino-resistenza, una condizione clinica che consiste nella ridotta sensibilità o responsività dei tessuti periferici, quali il muscolo scheletrico, il tessuto adiposo e il fegato, all'azione metabolica dell'insulina [16]. Gli adipociti secernono numerose adipochine (leptina, TNF- $\alpha$ , resistina, adiponectina) che modulano la secrezione insulinica, la sua azione ed il peso corporeo e potrebbero contribuire all'insulino-resistenza [17]. Il grasso viscerale

produce inoltre citochine pro-infiammatorie, IL-6, IL-8, MCP-1 (proteina chemoattrattrice dei monociti). Queste richiamano nel tessuto adiposo cellule immunitarie, i macrofagi, che a loro volta secernono grandi quantità di fattore di necrosi tumorale TNF- $\alpha$  e contribuiscono così a generare un basso grado di infiammazione cronica. Tale stato pro-infiammatorio, che promuove insulino-resistenza, porta alla disfunzione endoteliale e spesso a DMT2 e patologie cardiovascolari [18].

## **1.2 Disfunzione endoteliale**

Fino a non molti anni fa l'endotelio era considerato un semplice rivestimento monocellulare che separava il sangue circolante dalla parete vascolare. In realtà sappiamo oggi che le cellule endoteliali (EC) svolgono un ruolo attivo nell'omeostasi vascolare, tanto che l'endotelio è ormai considerato un organo autocrino-paracrino perché coinvolto nella regolazione del tono, della struttura e della pervietà vascolare, regolando l'adesione piastrinica, il "rolling", l'adesione e la migrazione tran-sendoteliale dei leucociti, la crescita e la migrazione delle cellule della muscolatura liscia vascolare (VSMC) e infine bilancia la fibrinolisi e la coagulazione [19,20]. La compromissione dell'attività endocrino-paracrina dell'endotelio è responsabile della disfunzione endoteliale.

Dal punto di vista clinico esistono varie metodologie per valutare la funzione endoteliale, che dipendono dal tipo di vaso (micro- o macrocircolo) o dal tipo di distretto vascolare (cutaneo,

muscolare, cardiaco, renale). Fra queste vi sono la misurazione della vasodilatazione endotelio-dipendente (EDV), mediante angiografia, che valuta la risposta del vaso ad agonisti endoteliali quali l'acetilcolina, metilcolina, bradichinina, serotonina, sostanza P, e la dilatazione flusso mediata (Flow mediated dilatation FMD), tecnica non invasiva e di largo impiego, che valuta ecograficamente le variazioni di calibro dell'arteria omerale a seguito di una breve ischemia indotta [17]. Studi clinici con lunghi follow up condotti su pazienti con disfunzione endoteliale hanno dimostrato che una sbilanciata vasodilatazione endotelio-dipendente è associata ad un aumento della frequenza di eventi cardiovascolari. Dati clinici, inoltre, supportano il ruolo della disfunzione endoteliale nei pazienti con sindrome coronarica acuta e dimostrano una correlazione con elevati livelli di proteina C reattiva, un marcatore aspecifico di infiammazione. Nell'insieme questi dati indicano che la valutazione della vasoreattività dell'endotelio coronarico può servire come un indicatore integrativo dello stress imposto dai vari fattori di rischio cardiovascolare sulla parete arteriosa e fornisce informazioni chiave sia come marcatore diagnostico che prognostico in pazienti a rischio CAD [21].

Un ruolo chiave nel controllo dell'omeostasi vascolare da parte dell'endotelio è esercitato dalla produzione costitutiva di una importante sostanza vasodilatatrice: l'ossido nitrico (NO). Questo è prodotto dal catabolismo della L-arginina ad opera di un enzima costitutivo chiamato NO-sintetasi (NOS) [22] sotto lo stimolo di

sostanze ad azione agonista sull'endotelio, quali acetilcolina, bradichinina, sostanza P, serotonina e altre che agiscono su recettori specifici e in risposta a stimoli meccanici quali lo stress esercitato dal flusso sanguigno sulla parete vascolare. Il NO diffonde rapidamente verso le sottostanti cellule muscolari lisce determinando rilascio attraverso l'aumento intracellulare di cGMP e la conseguente riduzione del calcio intracellulare. L'endotelio produce anche altre sostanze vasodilatanti, quali la prostaciclina (che però è una sostanza non prodotta in modo specifico dalle cellule endoteliali) e un fattore iperpolarizzante (EDHF) [22]. Quest'ultima sostanza sembra rappresentare un meccanismo vasodilatante di compenso ad una ridotta biodisponibilità di NO. Tutti i principali fattori di rischio cardiovascolare, inclusi il diabete mellito e l'obesità sono caratterizzati dalla presenza di disfunzione endoteliale [17]. In queste condizioni, infatti, è stato ampiamente documentato che la vasodilatazione endotelio-dipendente (sia flusso-mediata che attraverso la stimolazione recettoriale) è ridotta sia a livello del circolo periferico che coronarico.

La principale caratteristica della disfunzione endoteliale non è rappresentata soltanto dalla ridotta vasodilatazione endotelio-dipendente, quanto dalla ridotta biodisponibilità di NO. I maggiori fattori di rischio cardiovascolare portano anche alla produzione di sostanze ad azione vasocostrittrice da parte delle cellule endoteliali attivate, prodotte generalmente dall'azione della ciclossigenasi sull'acido arachidonico e al momento identificate come prostanoidi

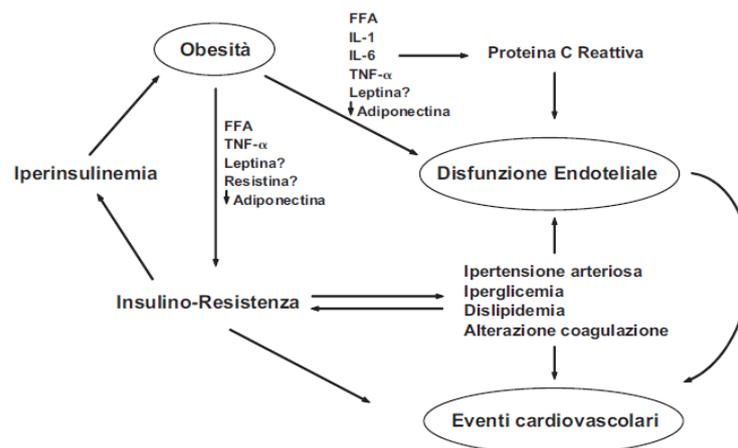
(trombossano  $A_2$  e prostaglandina  $H_2$ ) e soprattutto come radicali liberi dell'ossigeno che oltre a causare vasocostrizione, distruggono il NO, riducendone quindi la biodisponibilità [22].

Crescenti evidenze suggeriscono un ruolo cruciale del NO anche come mediatore anti-infiammatorio e antitrombotico, poiché riduce l'espressione di molecole di adesione ICAM-1 e chemochine (MCP-1) a livello endoteliale, coinvolti nella migrazione dei monociti verso la tonaca intima nel sito della formazione della placca, poiché inibisce l'attivazione, adesione e aggregazione piastrinica [23], e pro-trombotiche come PAI-1) [24].

### **1.2.1 Diabete, obesità e disfunzione endoteliale**

Studi sull'uomo suggeriscono un ruolo primario della disfunzione endoteliale nella genesi della resistenza insulinica: un'alterata vasodilatazione flusso-mediata è stata rilevata in familiari di primo grado normotesi di diabetici di tipo 2 [26-29]; anomalie nella reattività micro- e macrovascolare sono state riportate in individui a rischio per diabete mellito di tipo 2 con curva da carico di glucosio ancora nei limiti di norma [30]. In presenza di conclamata insulino-resistenza è stata documentata una ridotta risposta alla bradichinina e all'acetilcolina sia nei vasi di grosso calibro sia nella microcircolazione, sebbene questa associazione non sia stata univocamente confermata [31,32]. Il legame tra insulino-resistenza e disfunzione endoteliale sembra

essere più consistente quando l'insulino-resistenza si associa a un qualsiasi elemento della sindrome metabolica. Una ridotta produzione/attività di NO è stata riscontrata in pazienti con ipertensione arteriosa, con ipertrigliceridemia, bassi livelli di colesterolo HDL, obesità addominale, elevati livelli di acidi grassi liberi e citochine infiammatorie [33-37]. Numerosi studi clinici hanno dimostrato che anche l'obesità è caratterizzata da disfunzione endoteliale [38]. In questo caso può essere indotta con meccanismi indiretti attraverso le condizioni patologiche frequentemente associate ad essa, come l'ipertensione arteriosa, il diabete mellito e la dislipidemia, condizioni caratterizzate di per sé da una ridotta funzione endoteliale (Figura 2). Meccanismi diretti sono rappresentati da ormoni, citochine e prodotti del metabolismo dei lipidi [39].



**Figura 2. Meccanismi diretti e indiretti di relazione tra obesità, insulino-resistenza, disfunzione endoteliale ed eventi cardiovascolari.** FFA= acidi grassi liberi; IL=interleuchina; TNF=fattore di necrosi tumorale [17].

Le adipochine prodotte dagli adipociti potrebbero essere direttamente responsabili della disfunzione endoteliale associata all'obesità. Le principali adipochine coinvolte sono la leptina, la resistina e l'adiponectina. La leptina è una proteina prodotta dagli adipociti e rilasciata nel torrente circolatorio in maniera direttamente proporzionale al volume di tessuto adiposo. A livello del sistema nervoso centrale la leptina svolge numerose azioni quali l'induzione della perdita di peso attraverso la riduzione del senso dell'appetito e l'incremento della spesa energetica. Il ruolo della leptina sulla funzione endoteliale, sebbene recentemente ipotizzato, non è ancora definitivamente chiarito ed i risultati sono discordanti. Infatti, alcuni studi *in vitro* hanno dimostrato che la leptina induce un aumento dello stress ossidativo a livello delle cellule endoteliali [40]. Inoltre è stato anche osservato che la leptina sarebbe in grado di stimolare la secrezione di numerose citochine proinfiammatorie, quali TNF- $\alpha$  e l'interleuchina IL-6, le quali a loro volta inducono disfunzione endoteliale [41]. Al contrario, Lembo et al. [42] e Vecchione et al. [43] hanno dimostrato un'azione vasodilatante da parte della leptina attraverso la produzione di EDHF. Alla luce di questi dati, il ruolo della leptina sulla disfunzione endoteliale legato all'obesità necessita di ulteriori chiarimenti. La resistina è un'adipochina prodotta durante l'adipogenesi e inibisce l'uptake di glucosio nelle cellule muscolari scheletriche[44]. È stato recentemente dimostrato che nelle cellule endoteliali incubate con la resistina ricombinante umana si ha

un'aumentata produzione di endotelina-1 ed espressione di molecole di adesione VCAM-1 e MCP-1 [45]. Anche se sono necessari ulteriori studi per confermare il significato biologico degli effetti vascolari della resistina, i dati disponibili suggeriscono un ruolo diretto da parte di questa adipochina sulla parete vascolare. Decisamente più consistenti sono i dati relativi al ruolo dell'adiponectina sulla parete vascolare. Questa adipochina, specificamente espressa negli adipociti differenziati, svolge un'azione antagonista fisiologico nei riguardi delle altre sopra citate molecole. L'adiponectina stimola la sensibilità insulinica favorendo la traduzione del segnale intracellulare per l'insulina [46]. Studi sperimentali hanno dimostrato che l'adiponectina stimola la produzione di NO attraverso un processo di fosforilazione dell'enzima NOS endoteliale [47]. A conferma di ciò, a livello del microcircolo dell'avambraccio di pazienti ipertesi è stata osservata una significativa correlazione diretta tra i livelli plasmatici di adiponectina e vasodilatazione endotelio-dipendente [48]. Questa adipochina inoltre inibisce l'adesione monocitaria riducendo l'espressione delle molecole di adesione sulla parete vascolare, inibisce la trasformazione macrofagica e riduce la proliferazione e la migrazione delle cellule muscolari lisce. Questi risultati indicano le importanti proprietà anti-aterosclerotiche e protettive della parete vascolare svolte dall'adiponectina. Poiché nell'obesità/insulino-resistenza la produzione e l'attività dell'adiponectina sono notevolmente ridotte, è intuitivo comprendere come in queste condizioni si osservi uno sbilanciamento dei meccanismi che regolano

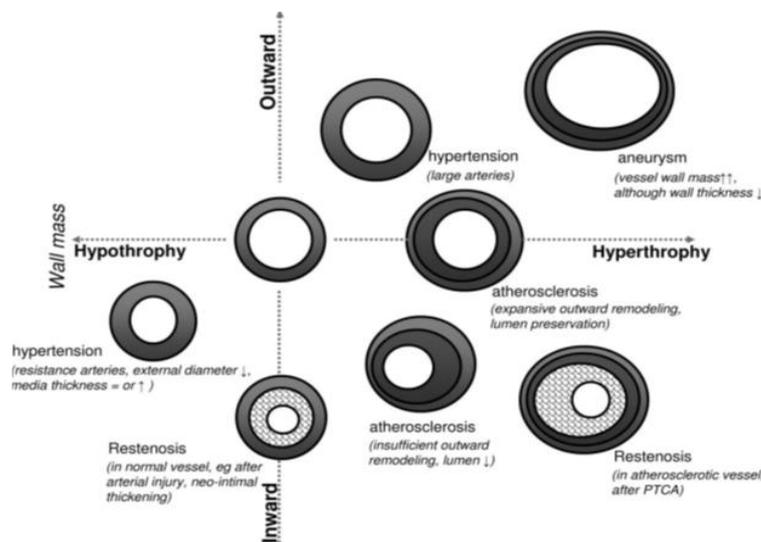
l'omeostasi vascolare a favore di tutti quei fattori che favoriscono e promuovono la disfunzione endoteliale e quindi il processo aterosclerotico (Figura 2).

### **1.3 Rimodellamento vascolare patologico**

La parete vascolare è continuamente esposta a forze emodinamiche come la pressione luminale o la tensione esercitata dal flusso sanguigno, le cui alterazioni fisiopatologiche portano a modificazioni funzionali e/o strutturali della parete vascolare [49]. Il rimodellamento vascolare patologico, caratteristica condivisa da tutti i fattori di rischio cardiovascolare, è un processo cronico multifattoriale che consiste in cambiamenti della componente cellulare e non, della parete vascolare, responsabili delle alterazioni funzionali e strutturali della stessa. Nel rimodellamento vascolare giocano un ruolo patogenetico fondamentale non solo i cambiamenti nelle forze emodinamiche, ma anche i processi infiammatori sia locali che sistemici, l'alterazione dei componenti della matrice extracellulare e il danno vascolare [50,51]. L'interazione dinamica fra fattori di crescita, sostanze vasoattive e stimoli emodinamici, le cui modificazioni prolungate nel tempo portano ad una risposta iniziale di tipo adattativo, sono poi responsabili di disordini vascolari e circolatori dando inizio a due meccanismi centrali: la disfunzione endoteliale e l'attivazione delle cellule muscolari lisce vascolari. E' largamente accettato e riconosciuto che il rimodellamento vascolare è un

importante determinante di patologie vascolari quali l'ipertensione, l'aterosclerosi, la restenosi e gli aneurismi [49].

Il tipo di rimodellamento cui va incontro la parete vascolare può variare in base alla patologia che lo genera: si ha un cambiamento strutturale della tonaca media durante l'ipertensione [52-56] (Figura 3), un rimodellamento verso l'esterno definito "outward" durante l'aterosclerosi, perché il vaso compensa la crescita interna della placca post-ponendo la progressione della lesione ad una stenosi che limiti il flusso sanguigno. Durante la restenosi, che avviene solitamente in seguito ad un intervento di rivascularizzazione, l'iperplasia della tonaca intima e un rimodellamento costrittivo generano un restringimento del lume del vaso.



**Figura 3.** Diagramma che mostra le caratteristiche del rimodellamento patologico e i suoi effetti sulla massa e sul lume della parete vascolare durante varie condizioni fisiopatologiche [54].

La risposta infiammatoria, meccanismo chiave dell'aterosclerosi [53], porta cambiamenti funzionali nelle cellule endoteliali (EC), linfociti T, macrofagi derivati dai monociti e cellule muscolari lisce vascolari (VSMC) [20,50]. L'attivazione di tali cellule genera un ampio spettro di idrolasi infiammatorie, citochine, chemochine, molecole di adesione e fattori di crescita che si aggiungono all'accumulo lipidico ed alla proliferazione di VSMC e fibroblasti, nonché a interazioni intercellulari dirette. Studi immunohistochimici hanno dimostrato una infiltrazione ed accumulo di linfociti T attivati in lesioni aterosclerotiche precoci e complicate. Le cellule dendritiche (DC), cellule presentanti l'antigene, sono presenti nella tonaca intima e avventizia delle arterie umane, come parte di un organo linfoide associato al tessuto vascolare (VALT), con il compito di ispezionare il microambiente alla ricerca di antigeni potenzialmente dannosi che devono poi presentare ai linfociti per dare inizio alla risposta immunitaria adattativa [57]. La maggior parte delle DC che si trovano nelle lesioni aterosclerotiche, si localizzano nella neointima insieme a linfociti T, cellule NK, mastociti e cellule muscolari lisce neointimali [58-60]. Lo stesso tipo di composizione cellulare è stato trovato in campioni sperimentali di risposta acuta al danno arterioso [61,62]. In questo contesto attivo dal punto di vista immuno-infiammatorio, le VSMC sono stimulate e mostrano un'alterata espressione di fattori di trascrizione, fattori di crescita, geni che regolano l'apoptosi, integrine, proteasi, acquisiscono la capacità di proliferare, migrare e secernere grandi quantità di proteine della

matrice extracellulare [63,64]. E' stato inoltre dimostrato che la disfunzione endoteliale stimola la migrazione e l'adesione delle DC all'endotelio [65].

#### 1.4 Infiammazione e immunità adattativa

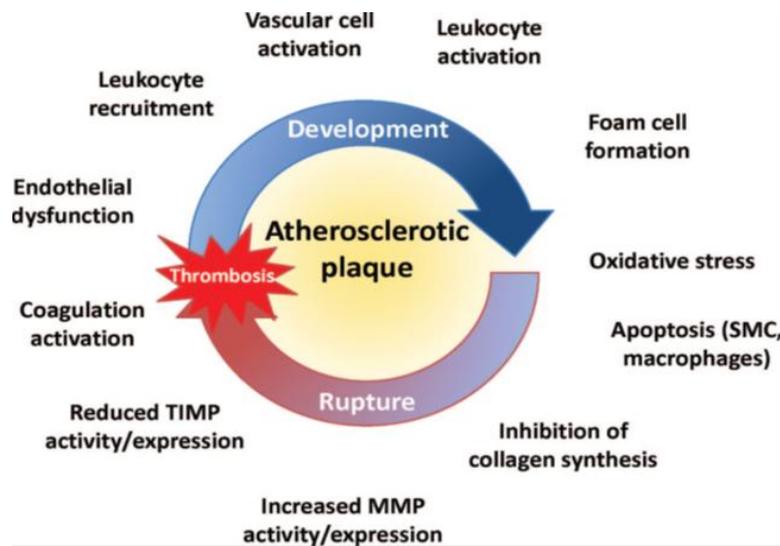
Molti lavori preclinici e clinici hanno dimostrato che l'aterosclerosi è guidata da un processo infiammatorio cronico all'interno della parete vascolare, cui partecipano attivamente anche cellule dell'immunità innata ed adattativa, come le DC e i linfociti T [66,67]. La disfunzione endoteliale è senza dubbio il primo evento patogenetico. Le EC in risposta a citochine infiammatorie come TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$  e IL-1 prodotte da macrofagi e linfociti, aumentano l'espressione di molecole di adesione e secernono a loro volta citochine e chemochine (vedi tabella 1) con cui richiamano i leucociti contribuendo al rimodellamento vascolare patologico [68].

| Cytokine     | Stimulus                        | Cellular targets <sup>a</sup> | Relevance  |
|--------------|---------------------------------|-------------------------------|--|
| IL-1         | IL-1, TNF, LPS                  | Various, Ly, Mo               | Inflammation; acute phase response; hematopoiesis    |
| IL-6         | IL-1, TNF, LPS,<br>IL-4         | Various, Ly                   | Acute phase response; hematopoiesis                  |
| IL-8         | IL-1, TNF, LPS                  | Neu, Ba, Ly, melanoma         | Leukocyte recruitment                                |
| Gro $\alpha$ | IL-1, TNF                       | Neu, melanoma                 | Leukocyte recruitment                                |
| MCP          | IL-1, TNF, LPS,<br>MM-LDL, IL-4 | Mo                            | Leukocyte recruitment                                |
| G, GM, M-CSF | IL-1, TNF                       | Neu, Eo, Mo                   | Hematopoiesis; leukocyte recruitment and activation; |

**Tabella 1. Citochine prodotte dalle cellule endoteliali che richiamano e attivano i leucociti.** Ly=linfociti; MO=monociti; Neu=granulociti neutrofili; Ba=basofili; Eo=eosinofili [68].

E' stato dimostrato che TNF- $\alpha$  e IFN- $\gamma$  possono alterare la distribuzione dei complessi caderina-catenina endoteliali e prevenire la formazione delle fibre dello stress composte da actina F [69]. TNF- $\alpha$  aumenta inoltre le concentrazioni citoplasmatiche del calcio e attiva la catena leggera della miosina e RhoA che distruggono le giunzioni endoteliali [70]. Tali eventi determinano una rimodulazione dei legami intercellulari, con perdita della funzione di barriera endoteliale, espressione di chemochine e molecole di adesione che facilitano il "rolling" e la tras migrazione nella parete vascolare di granulociti neutrofili [71], monociti [72] e linfociti T. Nella tonaca intima i leucociti possono essere permanentemente attivati dalle citochine generate localmente, in particolare IFN- $\gamma$  che può aumentare l'espressione del recettore "scavenger" per la fosfatidilserina e le LDL ossidate (oxLDL) SR-PSOX [73], coinvolto nell'assorbimento delle oxLDL, permettendo così la trasformazione dei macrofagi in cellule schiumose [74]; ha inoltre un ruolo fondamentale nell'instabilità e nella rottura della placca [75]. E' stato dimostrato inoltre che le citochine pro-aterogene IFN- $\gamma$  e IL-1 $\beta$  inibiscono l'espressione del trasportatore ATP dipendente di tipo A1, responsabile dell'efflusso del colesterolo (ABCA1), mentre citochine anti-aterogene incluse IL-10 e TGF- $\beta$ 1, ne promuovono l'espressione [76]. IFN- $\gamma$  può essere considerato un ponte molecolare fra l'attività immunitaria e il metabolismo lipidico. Ad uno stadio più avanzato della lesione aterosclerotica, le citochine pro-infiammatorie destabilizzano la placca promuovendo l'apoptosi cellulare e la degradazione della matrice

extracellulare (Figura 4). L'apoptosi dei macrofagi comporta la formazione di frammenti cellulari che contribuiscono ad accrescere il nucleo lipidico della lesione, mentre quella delle VSMC è responsabile dell'assottigliamento del cappuccio fibroso, favorendo la rottura della placca stessa [77-79].



**Figura 4. Effetti delle citochine sulla progressione dell'aterosclerosi e sulla destabilizzazione della placca.**

Sono molte le citochine che riescono ad indurre l'apoptosi dei macrofagi e delle VSMC, in particolare l'associazione fra IL-1, TNF- $\alpha$  e IFN- $\gamma$  e inoltre FAS e il suo ligando [80]. Le citochine pro- e anti-infiammatorie sono coinvolte significativamente nel regolare l'espressione delle metalloproteasi della matrice extracellulare (MMPs) e i loro inibitori, agendo in sinergia con fattori di crescita o lipidi ossidati, nell'indurre un sostanziale rimodellamento di molte

componenti della matrice extracellulare [81]. Ad esempio, IFN- $\gamma$  inibisce la sintesi del collagene [82] mentre IL-1 e TNF- $\alpha$  inducono una forte espressione di MMP-1, -3, -8, e -9 da parte delle cellule vascolari. La citochina IL-4, secreta dai linfociti Th2, inibisce la produzione della maggior parte di MMPs da parte dei macrofagi [83] e induce la produzione dell'elastasi MMP-12 [84]. Infine IL-1 e TNF- $\alpha$  possono alterare profondamente le proprietà antitrombotiche delle EC [85]. IL-1 e TNF- $\alpha$  aumentano l'attività pro-coagulante tissutale e sopprimono quella anticoagulante mediata dal sistema trombomodulina-proteina C, diminuendo la trascrizione dei geni per la trombomodulina e per il recettore della proteina C. La regolazione negativa dei mediatori anticoagulanti può così interessare il processo infiammatorio. Le citochine pro-infiammatorie modificano le proprietà fibrinolitiche delle EC diminuendo la produzione dell'attivatore tissutale del plasminogeno e aumentando la produzione del suo inibitore PAI-1 [86]. Come risultato finale le citochine proinfiammatorie possono far precipitare la lesione nella formazione di un trombo e promuovere lo sviluppo della sindrome coronarica acuta.

Dal punto di vista immunitario, esami istologici di lesioni aterosclerotiche dimostrano la presenza di linfociti T CD4<sup>+</sup> helper (Th), ma anche linfociti citotossici CD8<sup>+</sup> (Tc) e linfociti T regolatori (Treg). Le cellule T presenti nelle lesioni, sebbene rappresentino una minoranza rispetto alle cellule monocitoidi, possono influenzare profondamente il corso della patologia esercitando effetti opposti:

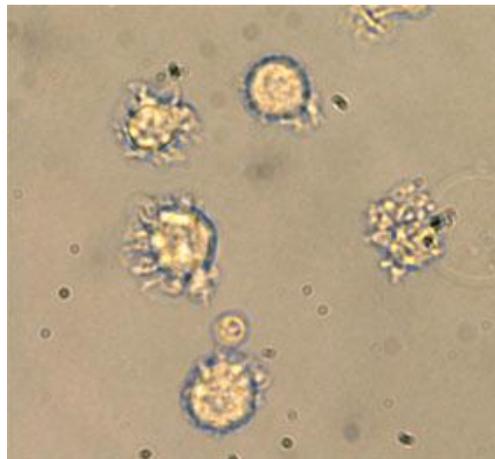
quelle pro-infiammatorie e Th1-correlate promuovono lo sviluppo e la progressione della patologia, mentre quelle anti-infiammatorie e le cellule T regolatorie esercitano attività anti-aterogena [87,88]. Topi SCID, privi di linfociti T e B per blocco precoce della maturazione linfocitaria dai precursori midollari, se re-infusi con linfociti Th CD4<sup>+</sup> allogenici, accelerano l'aterosclerosi [89] promuovendo l'espansione di cellule Th a discapito di una limitata attività delle Treg [90]. Una carenza di CXCL10, arricchisce invece la popolazione Treg nella parete arteriosa portando ad una riduzione della patologia [91]. A questo proposito è interessante notare che una dieta ipercolesterolemica indotta nell'animale da esperimento, limita profondamente la popolazione e la funzionalità delle cellule Treg nelle lesioni aterosclerotiche [92], mentre una correzione dell'ipercolesterolemia impedisce la perdita delle Treg e ne conserva la funzione. Questi dati suggeriscono che l'abbassamento del colesterolo possa influenzare, almeno in parte, l'aterosclerosi modificando la distribuzione e l'attività delle popolazioni di cellule T all'interno parete arteriosa. L'impatto profondo delle cellule T nell'aterosclerosi correla con la loro funzione nella modulazione immunitaria. Frammenti istologici di lesioni aterosclerotiche dimostrano co-localizzazione di cellule T, con cellule presentanti l'antigene ed esprimenti MHC di classe II come le cellule dendritiche e i macrofagi [87]. Questi risultati sono in linea con modelli di immunità adattativa in cui le cellule T diventano attivate attraverso l'interazione con cellule presentanti l'antigene. Queste ultime sono

tipicamente cellule dendritiche mature che hanno un'alta densità superficiale di antigeni MHC necessari per la conversione delle cellule T "naive" a cellule effettrici/memoria che propagano l'immunità adattativa. Perciò relativamente poche cellule Th e dendritiche hanno la capacità di promuovere l'espansione dell'immunità adattativa. Modelli classici di transizione dell'immunità da innata (immediata) ad adattativa (a lungo termine) comportano la migrazione di cellule T e cellule dendritiche mature verso organi linfoidi secondari, dove la presentazione dell'antigene da parte delle cellule dendritiche nei confronti delle cellule T permette la loro differenziazione e attivazione. Una componente chiave di questo processo è il recettore CCR7, necessario per la co-localizzazione e l'interazione fra cellule dendritiche e cellule-T negli organi linfoidi. Pertanto, una carenza di CCR7 comporta difetti nel passaggio della risposta immune da innata ad adattativa, e questo paradigma si estende all'aterosclerosi [87]. Topi privi di CCR7 su un background privo del recettore LDL, presentano una riduzione del 50% nella formazione di lesioni aterosclerotiche [93], senza alcun impatto sui livelli di colesterolo dipendenti dall'assenza di CCR7. Nelle lesioni, la mancanza di CCR7 era associata ad un ridotto contenuto di macrofagi e, sorprendentemente, un aumento del numero di cellule dendritiche e cellule T [93]. Questi ultimi due tipi cellulari erano assenti da linfonodi di topi privi di CCR7, suggerendo che l'aterosclerosi dipenda da un traffico di cellule T e cellule dendritiche tra la parete del vaso e organi linfoidi secondari.

Concludendo, queste osservazioni indicano che la patogenesi dell'aterosclerosi debba essere ri-definita, includendo anche il ruolo degli organi linfoidi secondari [87].

### 1.5 Cellule dendritiche

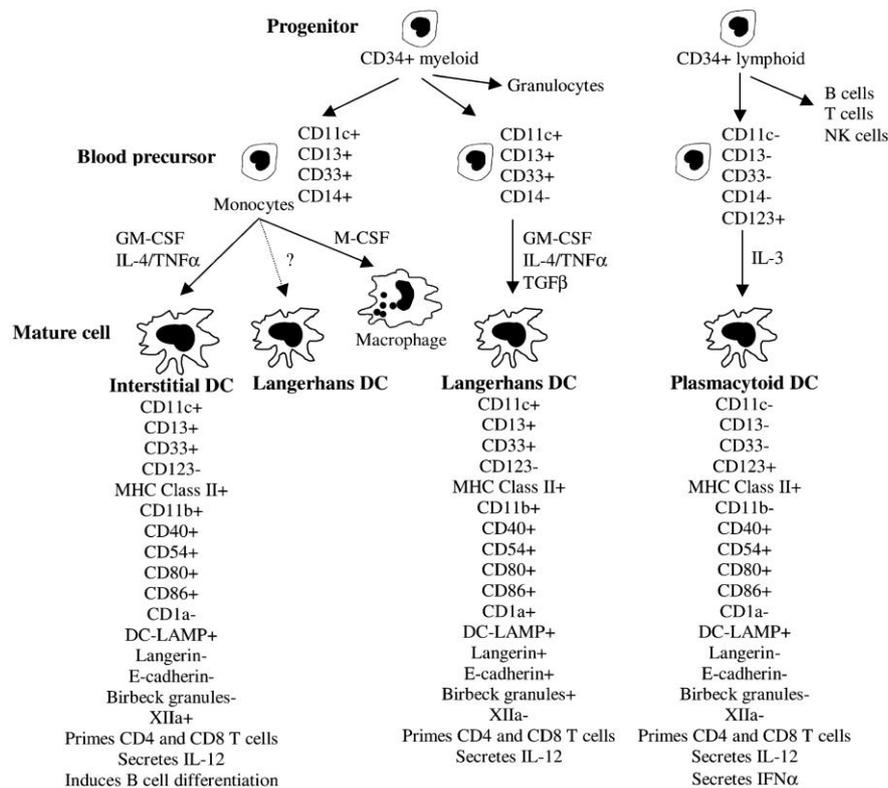
Le cellule dendritiche, originariamente descritte da Steinman e Cohn nel 1973, sono cellule presentanti l'antigene (APC) che svolgono un ruolo fondamentale nella risposta immunitaria [50] (Figura 5). Le DC sono specializzate nella cattura dell'antigene e sono le cellule più potenti nell'indurre e regolare una risposta immunitaria mediata da linfocita T, stimolando non solo cellule T della memoria ma soprattutto linfociti T "naive" (vergini) e linfociti B.



**Figura 5: Cellule dendritiche in coltura.** Foto al microscopio ottico, 200x

*In vivo* le DC derivano da cellule staminali del midollo osseo CD34<sup>+</sup> (Figura 6) che, con opportune citochine, possono evolversi in

monoblasti, promonociti e una volta nel sangue in monociti (CD11c<sup>+</sup>, CD14<sup>+</sup>), oppure diventare pro-linfociti e linfociti [94-96]. Dalla linea monocitaria deriva una forma intermedia di DC (CD11c<sup>+</sup>/ CD14<sup>+</sup>) che poi si differenzia nella forma immatura mieloide (CD11c<sup>+</sup>/ BDCA3<sup>+</sup>/ DC-SIGN<sup>+</sup>) ed in seguito nella matura mieloide CD11c<sup>+</sup>/ BDCA1-3<sup>+</sup>/ CD14<sup>-</sup>/ CD123<sup>-</sup>/ HLADR<sup>+</sup> che secerne IL-12. Dalla linea CD34<sup>+</sup> linfoide originano le DC plasmacitoidi: CD14<sup>-</sup>/ CD11c<sup>-</sup>/ CD123<sup>+</sup>/ BCA2-4<sup>+</sup>/ CD62L<sup>+</sup>/ Langerin<sup>-</sup> [94].



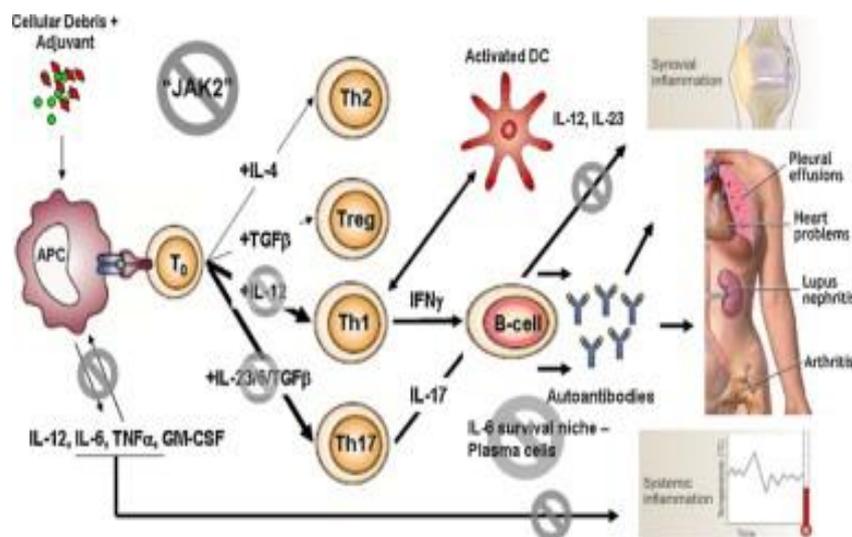
**Figura 6. Origine e sviluppo delle varie sottopopolazioni di cellule dendritiche umane**. I progenitori CD34<sup>+</sup>, sia mieloidi che linfoidi, si trovano nel midollo osseo e nel sangue e danno luogo alle rispettive DC in risposta a stimoli diversi. Le popolazioni di DC interstiziali e di Langerhan si trovano nei siti all'interfaccia con l'ambiente esterno; le DC plasmacitoidi negli organi linfoidi in corrispondenza delle zone dei linfociti T, nel timo e nel sangue [94].

Sia le cellule dendritiche mieloidi che plasmacitoidi attraversano vari stadi di differenziazione sia fenotipica che funzionale [94-96]: passano da cellule progenitrici (prima fase) a cellule dendritiche immature (seconda fase) e infine a cellule dendritiche mature (terza fase). Le **cellule CD34<sup>+</sup>** circolanti sono cellule con caratteristiche di staminalità e pertanto non esprimono antigeni specifici per cellule differenziate come le dendritiche. Le cellule **dendritiche immature** sono ampiamente distribuite nell'organismo, tuttavia, in qualunque parte dello stesso, rappresentano circa lo 0.1-1% delle cellule mononucleate del sangue. Le cellule dendritiche immature, ad esempio quelle della cute (di Langerhans), contengono strutture specifiche: i granuli di Birbeck e il sistema tubulo-vescicolare (l'apparato di Golgi molto esteso con numerosi vescicole endosomiali) [97,98]. E' stato evidenziato che queste strutture sono coinvolte nel riconoscimento dell'antigene e nel trattamento dell'informazione raccolta dal microambiente extracellulare [96,97]. Tuttavia, non tutte le DC immature contengono i granuli di Birbeck; di solito tali cellule in letteratura vengono chiamate "cellule dendritiche interstiziali". Le popolazioni di DC interstiziali e di Langerhans si trovano nei siti all'interfaccia con l'ambiente esterno e sono indicate come DC mieloidi. Le DC plasmacitoidi si trovano invece negli organi linfoidi in corrispondenza delle zone dei linfociti T, nel timo e nel sangue. Lo sviluppo dei differenti tipi di cellule dendritiche è regolato dalla presenza nel microambiente delle varie citochine: TNF- $\alpha$ , TRANCE/RANK, IL-4, GM-CSF, TGF- $\beta$  ed il ligando FIT-3

[33,99,100]. La funzione principale delle cellule dendritiche nella risposta immunitaria cellulo-mediata è quella di presentare epitopi antigenici ai linfociti T e B [96,101,102] attraverso due stati funzionali diversi: 1) cellula immatura; 2) cellula matura. Le cellule dendritiche immature, che si trovano negli organi periferici, hanno la capacità di riconoscere antigeni sia solubili che particolati, nonché microrganismi che inglobano mediante fagocitosi e macropinocitosi e poi processano in epitopi per ri-esporli sulla loro superficie cellulare mediante le molecole HLA-DR. In questo stadio non sono ancora capaci di presentare gli epitopi antigenici ai linfociti perché mancano di tutti i segnali di membrana necessari per la loro attivazione. Una volta processato l'antigene, ricevono segnali che promuovono la migrazione attraverso i vasi linfatici alla volta dei tessuti linfoidi secondari come la milza e i linfonodi. Durante questo percorso le DC immature subiscono significativi cambiamenti strutturali, morfologici e funzionali. Quelli strutturali sono la perdita del sistema tubulo-vescicolare e dei granuli di Birbeck, mentre il cambiamento morfologico consiste nella trasformazione di sottili prolungamenti endoplasmatici nei cosiddetti "veli" tali da conferire loro il nome di "cellule velate" [96,101]. Negli organi linfoidi le cellule velate entrano nella fase finale del loro sviluppo che permette loro di diventare DC mature, con caratteristiche funzionali diverse e specializzate [96,101]. Con la maturazione le DC perdono la capacità di riconoscere ed inglobare gli antigeni, ma sono fortemente capaci di attivare le cellule T. Per questo processo aumentano l'espressione sulla membrana di

alcune molecole chiave nell'interazione tra APC e linfociti: molecole di adesione (ICAM-1, ICAM-3, LFA-3), molecole del sistema HLA (HLA-DR, -DQ, -DP), il marker di maturazione specifico CD83 [96] e molecole di co-stimolazione (CD40, CD80, CD86) [50,96,102,103], le quali interagendo con il proprio ligando presente sui linfociti T (CD28, CTLA-4, CD40L), forniscono il "secondo segnale" indispensabile per indurre al momento del riconoscimento antigenico una risposta proliferativa dei linfociti [94-96]. In mancanza di una sufficiente co-stimolazione le cellule T perdono la loro completa capacità di attivarsi e possono andare incontro a morte cellulare e/o apoptosi. DC mature esprimono inoltre alti livelli di proteine che controllano il fattore trascrizionale NF-kappa B come Rel A/p65, Rel B, Rel C, p50 e p52. Tali proteine regolano l'espressione di geni codificanti proteine immunitarie o infiammatorie. L'inibizione della traslocazione nucleare di NF-kappa B blocca la maturazione delle DC prevenendo l'induzione della differenziazione linfocitaria. In siti di infiammazione, quali le placche aterosclerotiche instabili, la presenza e l'attività delle DC mature è correlata alla cronicizzazione del processo infiammatorio [104]. Le DC mature mieloidi CD11<sup>c</sup>/BDCA1-3<sup>+</sup>/CD14<sup>-</sup>/CD123<sup>-</sup>/HLADR<sup>+</sup> producono un vasto numero di citochine, tra cui IL-12, che ha la funzione di promuovere una risposta immunitaria di tipo citotossico attraverso la differenziazione delle cellule TH0 in cellule TH1, che rilasciano IFN- $\gamma$  e IL-2. Recentemente è stato dimostrato che durante il riconoscimento antigenico, i linfociti T-helper attivano le DC mediante l'interazione CD40-CD40L e le DC

così attivate sono capaci di stimolare una risposta T-killer e secernere IL-12 [103]. Le DC sono capaci anche di indurre tolleranza, mediante la differenziazione dei T naive-helper (Th0) verso T-helper 2 o verso cellule T reg [96]. Le DC mieloidi (mDC) sono molto efficienti nella presentazione degli antigeni alle cellule T. Le pDC sono in grado di produrre una elevata quantità di interferone di tipo I, il quale svolge un ruolo importante nella stimolazione dei linfociti T [105]. Inoltre, svolgono un ruolo importante nella regolazione della formazione delle plasmacellule che produce gli anticorpi [101] (Figura 7).



**Figura 7. Attivazione delle cellule immunocompetenti [106].**

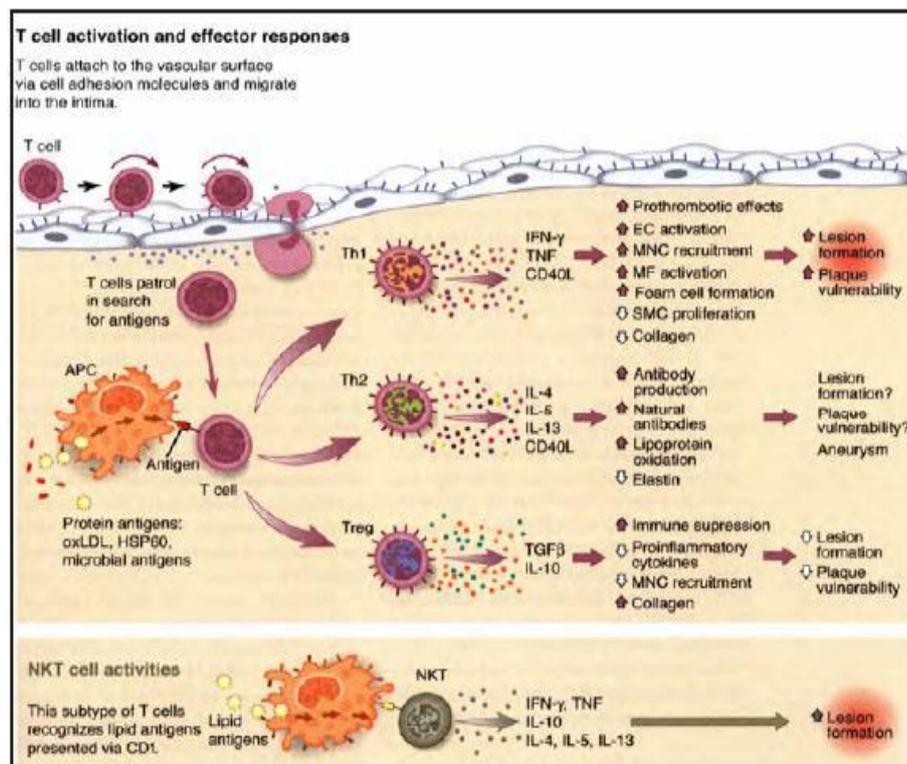
Le più importanti proprietà delle DC sono quindi la capacità di percepire stimoli ambientali (antigeni) e decidere il “destino” dei linfociti T in risposta agli antigeni, e la loro capacità di migrare, che permette ai linfociti T vergini di entrare in contatto con antigeni periferici.

## **1.6 Ruolo delle cellule dendritiche nelle complicanze vascolari**

Più di 10 anni fa Bobryshev Y.V. e collaboratori [59,107,108] hanno dimostrato per la prima volta che le DC si accumulano nelle lesioni aterosclerotiche suggerendo quindi che possano svolgere un ruolo importante nell'aterogenesi. Ciò ha portato ad ipotizzare il loro utilizzo come agente immunoterapico [107]. Infatti DC ottenute da sangue periferico possono essere pulstate *ex vivo* con una sospensione di materiale derivante dalla placca aterosclerotica, per poi essere re-infuse, una volta attivate, nel paziente [107].

Wick G e collaboratori hanno dimostrato la presenza di DC immature nello strato sub-endoteliale già nelle arterie sane di bambini di 8 settimane fino a 10 anni di età. Hanno quindi ipotizzato che questa rete di DC fosse una sorta di tessuto linfoide secondario, chiamato appunto tessuto linfoide associato ai vasi (VALT), con il peculiare ruolo di controllare costantemente il microambiente vascolare dalla presenza di antigeni [57]. Le DC presenti nei vasi sanguigni si caratterizzano dalla presenza del sistema tubulo-vescicolare e dei granuli di Birbeck [98]. È stato anche dimostrato che la proteina-S100, prodotta dalle DC è intensamente presente nelle lesioni aterosclerotiche [108]. Vi sono alcune differenze strutturali nelle DC presenti nelle arterie, suggerendo eventuali differenze circa la loro funzione nella parete arteriosa in processi patologici come l'aterosclerosi. E' noto che le DC aumentano di numero nelle lesioni aterosclerotiche, rispetto ai vasi sani. La loro localizzazione risiede

soprattutto nelle zone a rischio di rottura della placca aterosclerotica e il loro numero aumenta all'aumentare della complicazione della lesione [109]. Si è infatti dimostrato che in pazienti anginosi sintomatici il numero di DC presenti all'interno delle lesioni aterosclerotiche è significativamente superiore a quello dei pazienti asintomatici [109]. Le DC appartenenti al VALT sono cellule immature e quindi "sentinelle" per eventuali antigeni, mentre nella lesione aterosclerotica sono state descritte come cellule mature, cioè capaci di attivare i linfociti T e i Natural killer (Figura 8). Nelle lesioni aterosclerotiche le DC mieloidi riconoscono principalmente gli eventuali antigeni, mentre le DC plasmocitoidi si specializzano nel rilevamento di frammenti virali e hanno il potenziale unico di produrre grandi quantità di interferone di tipo I. Negli ateromi umani l'eccessiva produzione dell'interferone di tipo I determina una sovra-regolazione delle molecole TRAIL [110] (le molecole chiave dell'apoptosi) che svolgono il loro effetto citotossico portando all'apoptosi le cellule residenti della placca.



**Figura 8. Reclutamento ed attivazione delle cellule T nell'ateroma [25].**

Nelle placche aterosclerotiche con assottigliamento del cappuccio fibroso il numero delle DC è notevolmente aumentato, specialmente nelle aree di neo-vascularizzazione [59]. Li [109] ha dimostrato che le DC ottenute da precursori circolanti di pazienti con angina instabile, subiscono cambiamenti fenotipici e funzionali, poiché esprimono maggiormente molecole co-stimolatorie, come il CD86, e sono maggiormente capaci di stimolare i linfociti T [109]. E' possibile poter identificare le due sottopopolazioni di DC, mieloidi e plasmacitoidi, (mDC e pDC) mediante citometria a flusso, con anticorpi monoclonali che riconoscono particolari antigeni selettivi di

superficie, BDCA-1 e BDCA-3 per mDC, e BDCA-2 e BDCA-4 per le pDC. In questi ultimi anni sono stati fatti studi per enumerare le DC circolanti in pazienti con CAD, allo scopo di poter trovare una correlazione tra quantità (e qualità delle DC) e progressione della malattia. I dati riportati sono però a volte controversi. Shi e collaboratori [111], studiando pazienti con angina stabile, hanno trovato un aumento delle mDC circolanti ma non delle pDC. Nello studio di Van Vre A. [112] i pazienti ricoverati per angiografia coronarica sono stati suddivisi in quattro gruppi: gruppo di controllo (pazienti con dolore toracico ma senza coronarostenosi conclamata), gruppo dei pazienti con CAD e con “stable-one vessel” in coronarografia, gruppo con “stable-tre vessel” e gruppo con “unstable-one vessel”. Oltre alla coronarografia ai pazienti sono stati misurati i livelli di IL-6, IL-10, TNF- $\alpha$  e proteina C reattiva (PCR), per analizzare se la disfunzione delle cellule endoteliali fosse correlabile con le DC circolanti, suggerendo così il reclutamento delle DC nelle arterie dei pazienti con CAD. Questo studio ha dimostrato che la CAD documentata angiograficamente è associata ad una diminuzione del numero di pDC e mDC circolanti rispetto al controllo sano, senza alcuna differenza all'interno del gruppo con CAD.

Gli agenti farmacologici sono in grado di ridurre il numero delle DC nelle placche aterosclerotiche instabili [113]. In particolare, le statine sono in grado di stabilizzare la placca riducendo significativamente il numero delle DC nella stessa. Al contrario, la somministrazione di farmaci ipolipemizzanti e  $\beta$ -bloccanti ha

dimostrato un aumento delle mDC, ma non delle pDC. Nello stesso lavoro inoltre Yilmaz e collaboratori hanno studiato in vitro gli effetti di atorvastatina e simvastatina sulle DC. I loro risultati dimostrano che questi farmaci sono in grado di modulare l'espressione dei marcatori CD40, CD83, CD86 e HLA-DR sia in DC immature che nelle mature, di inibire l'endocitosi, la secrezione basale di citochine pro-infiammatorie (IL-6, IL-8, IL -12 e TNF- $\alpha$ ) e la capacità di attivare i linfociti T [113].

Le mDC e pDC sembrano poter influenzare in modo diverso l'infiammazione durante l'aterosclerosi. Era stato precedentemente ipotizzato che i pazienti con disfunzione endoteliale potessero avere un numero minore di DC circolanti. Invece Van Vre e collaboratori hanno dimostrato che i pazienti con disfunzione endoteliale (diminuita FMD) presentavano livelli significativamente più elevati di BDCA-1<sup>+</sup> DC (incremento del 37%) e lin<sup>-</sup>/HLADR<sup>+</sup> DC (incremento del 28%). L'assunzione di aspirina, ACE-inibitori, calcio antagonisti non modificava il numero delle DC circolanti, mentre le mDC aumentavano in pazienti trattati con farmaci antidislipidemicici e  $\beta$ -bloccanti. Inoltre gli effetti della disfunzione delle cellule endoteliali e CAD erano indipendenti e additivi. Questo studio suggerisce l'implicazione di entrambe le pDC e mDC nell'aterosclerosi sistemica, ma dimostra che le sottopopolazione di DC hanno una diversa funzione: solo le mDC aumentano con la disfunzione endoteliale o l'assunzione di  $\beta$ -bloccanti o farmaci ipolipemizzanti e diminuiscono quando i livelli circolanti di IL-6 e PCR aumentano.

Lo studio di Brussel [74] ha enumerato le sottopopolazioni di DC, nei pazienti con CAD, mediante citometria a flusso, grazie agli anticorpi monoclonali BDCA-1 e CD11c per le DC mieloidi e BDCA-2, CD123 per le plasmacitoidi. I risultati dello studio hanno mostrato che in pazienti con CAD il numero di DC circolanti diminuiva, indipendentemente dal marcatore delle sottopopolazioni mieloidi o plasmacitoidi utilizzato. Dopo l'attivazione *in vitro* delle cellule isolate, i livelli di BDCA-2 erano diminuiti, mentre i livelli delle CD11c e CD123 erano aumentati. Ciò implica che i rapporti di espressione delle CD11c/BDCA-1 e delle CD123/BDCA-2 sono in grado di determinare lo stato di attivazione delle DC. Confrontando questi rapporti tra il gruppo di controllo e i pazienti con CAD non sono state trovate differenze di attivazione delle DC circolanti in entrambi i gruppi. Dato che CD11c/BDCA-1 e CD123/BDCA-2 sono più abbondantemente espressi sulle superfici delle DC circolanti rispetto ad altri marcatori di attivazione tipici di DC mature, come CD83, CD86 o CCR-7, utilizzare questo rapporto può essere un sistema semplice ed affidabile per determinare l'attivazione delle DC nel sangue periferico dei pazienti. Questo studio pertanto suggerisce che lo stato di attivazione di tutti i sottogruppi di DC ha sempre bisogno di essere verificato, in quanto una diminuzione di BDCA-2<sup>+</sup> o CD123<sup>+</sup> delle pDC o un aumento di CD11c<sup>+</sup> delle mDC possono essere dovuti all'espressione alterata di questi marcatori durante l'attivazione delle cellule. Cioè una diminuzione di BDCA-2 delle pDC può essere dovuta a una sotto-regolazione d'espressione di

questo marcatore durante l'attivazione delle DC, mentre il numero effettivo di pDC non differisce tra i due gruppi (con CAD e controlli); lo stesso vale per un aumento di CD11c<sup>+</sup> delle mDC o di CD123<sup>+</sup> delle pDC.

## **1.7 Cellule dendritiche e diabete**

Diversi studi suggeriscono l'importanza del ruolo delle DC nella progressione della reazione infiammatoria che porta ad uno sbilancio dell'immunità associata al diabete. Infatti negli esperimenti con topi non obesi diabetici (NOD), Manirarora J.N. [114] ha osservato che i livelli di IL-12 sono elevati e stimolano le cellule Th1- che secernono IFN- $\gamma$ , coinvolte nello sviluppo del diabete. Al contrario, la stimolazione delle DC nei topi NOD con lattobacilli (batteri non patogeni rivolti verso i TLR2 con la capacità di indurre DC tollerogeniche) favorisce preferenzialmente la produzione della citochina anti-infiammatoria IL-10 a discapito di IL-12 e diminuisce l'incidenza del diabete.

### **1.7.1 DC e diabete mellito di tipo I (DMT1)**

Utilizzando il modello sperimentale animale di topi NOD, Saxena e collaboratori [115] hanno evidenziato una attività compensatoria fra DC mieloidi e DC plasmacitoidi. In questo contesto l'ablazione (mediante tecnica transgenica) delle mDC CD11c<sup>+</sup>/CD11b<sup>+</sup> porta ad una perdita dell'attivazione dei linfociti T, insulite e

diabete mediato dai linfociti CD4<sup>+</sup>, mentre le pDC modulano negativamente l'insulite e la loro ablazione ne accelera la progressione. Le mDC presentano pertanto un'importanza critica per la stimolazione dei linfociti T CD4<sup>+</sup> naive, mentre le pDC controllano la funzione dei CD4<sup>+</sup> nei tessuti. Gli autori di questo studio ipotizzano che un "innate imbalance" in NOD tra mDC e pDC controlli il tempo e lo sviluppo finale del diabete di tipo 1 nei topi diabetici e non obesi. In uno studio recente, gli autori Surendar e Mohan [116] hanno misurato i livelli serici di GM-CSF e hanno studiato lo stato di attivazione delle DC nei pazienti con DM2. I risultati mostrano che i livelli di GM-CSF erano significativamente più alti nei soggetti diabetici rispetto ai soggetti sani; inoltre i livelli serici di GM-CSF erano più bassi nel gruppo di pazienti trattati con l'insulina e farmaci ipoglicemizzanti orali rispetto al gruppo trattato solo con farmaci ipoglicemizzanti orali. Infine, maggiori livelli serici di GM-CSF erano associati ad uno stato funzionale attivato sia delle mDC che delle pDC. Secondo gli autori lo stato attivo di mDC e pDC nei soggetti diabetici potrebbe essere dovuto ad un aumento dei livelli di GM-CSF e di altre citochine pro-infiammatorie. Sebbene studi recenti si siano concentrati sui ruoli dei vari tipi di cellule T regolatorie, le cellule presentanti l'antigene, sono da tempo riconosciute come le cellule che svolgono un ruolo centrale nella patogenesi/protezione delle malattie autoimmuni perché sono in grado di attivare le cellule T effettrici o cellule Treg [117]. Negli ultimi anni ha ricevuto una certa attenzione il ruolo delle DC nella patogenesi del DM1. Recentemente è stato

dimostrato un ruolo protettivo delle pDC nei topi NOD. In questi topi, le pDC sono aumentate dopo il trattamento con GCSF, che protegge contro il diabete. Gli studi sull'uomo sono più limitati a causa della mancanza di marcatori specifici e delle difficoltà generali connesse agli studi basati sui pazienti, come la variabilità individuale, le differenze etniche, la variazione nel tempo e la disponibilità del campione. Un primo studio ha suggerito che i pazienti con DMT1 presentavano un aumento nel numero di pDC rispetto ai controlli sani [118], mentre un altro studio non ha trovato nessuna differenza nel numero delle DC tra i pazienti con DMT1 e controlli [119]. Recentemente sono state evidenziate due nuove sottofamiglie di DC mieloidi. Il sottogruppo mDC1 è positivo per BDCA-1 (CD1c), mentre il sottogruppo mDC2 è positivo per BDCA-3. Chen e colleghi [120] hanno studiato tre sottogruppi di DC circolanti: pDC, mDC1 e mDC2 in 72 pazienti con DMT1 e in 75 soggetti sani. Questo studio ha osservato che la frequenza di pDC nel sangue risultava essere negativamente correlata con l'età dei soggetti in entrambi i gruppi (sia sani che diabetici), mentre la frequenza di mDC1 e mDC2 non era significativamente cambiata con l'età dei soggetti. Inoltre, la frequenza media di pDC nel sangue era, dopo l'aggiustamento per età, significativamente più bassa nel gruppo con diabete di tipo 1 rispetto ai soggetti sani, mentre nessuna differenza era stata osservata per mDC1 e mDC2 tra DMT1 e gli stessi. I pazienti con DMT1 presentavano una percentuale minore di pDC e maggiore di mDC1 tra la popolazione totale di DC nel sangue rispetto ai soggetti sani. Questi

risultati indicano che la frequenza di pDC nel sangue e il rapporto di pDC/mDC1 sono negativamente associati con DMT1. Una carenza in pDC sembra essere una caratteristica comune delle malattie autoimmuni. Ad esempio, il numero di DC e pDC (BDCA-2<sup>+</sup>/CD123<sup>+</sup>/HLADR<sup>+</sup>) è risultato significativamente inferiore nei pazienti con lupus eritematoso sistemico rispetto ai controlli [121]. Le pDC ridotte nel sangue riflettono la gravità della malattia infiammatoria nella nefrite lupica [122]. Pertanto, non è ancora chiaro se la riduzione delle pDC osservata nel sangue periferico di pazienti con DMT1 è una conseguenza del diabete o un difetto che può contribuire allo sviluppo del diabete. Analisi di pDC degli studi prospettici aiuteranno a rispondere a questa domanda. È stato dimostrato che le pDC, oltre ad avere una funzione immunogenica, possono anche avere una funzione tollerogena. Il numero delle pDC inferiore trovate nei pazienti diabetici suggerisce che le pDC possono giocare un ruolo importante nella patogenesi del DMT1. Gli studi nei topi NOD, come è già stato indicato, hanno mostrato che la perdita delle pDC è associata con un'accelerazione di insulite [123], mentre un aumento delle pDC mediante trattamento con GCSF è correlato con una ridotta incidenza del diabete in topi NOD [115].

Le cellule mDC sono potenti stimolatori della proliferazione delle cellule T, mentre le pDC sono in grado di attivare cellule T regolatorie. Sarà interessante determinare se lo squilibrio delle pDC rispetto alle mDC nei pazienti con DMT1 osservato nello studio di Chen [120], contribuisca alla funzione di soppressione ottimale della

proliferazione delle cellule T nei pazienti con diabete mellito. Inoltre, il trattamento di topi NOD normoglicemici con DC ottenute dal midollo osseo e geneticamente modificate per esprimere interleuchina 4 (IL-4) riduce la comparsa di iperglicemia in un numero significativo di animali [122]. Tuttavia, il meccanismo attraverso cui le DC esprimono IL-4 e la sua funzione nella prevenzione del diabete autoimmune e se questo trattamento può invertire la malattia in topi NOD pre-diabetici non sono noti. Lo studio ha evidenziato che il trattamento con le DC modificate per esprimere IL-4 in topi NOD sia normoglicemici che prediabetici è un trattamento efficace per il diabete di tipo 1. Nel modello di topo NOD, l'insulite inizia in genere intorno a 3-4 settimane di età e il diabete si verifica nel 60-80% tra i topi. Anche se molti interventi sono efficaci nel prevenire il diabete in topi più giovani, non è possibile prevenire l'insorgenza del diabete nei topi NOD anziani con insulite più avanzata. Lo studio Ruffner [122] ha indagato il potenziale terapeutico delle DC in fasi successive della progressione della malattia nei topi prediabetici NOD. I risultati dimostrano che il trattamento dei topi con DC modificate geneticamente per sovra-esprimere IL4 (DC/sIL4) previene la comparsa del diabete in topi NOD normoglicemici di 12 settimane. Inoltre, le DC/sIL4 inoculate in topi prediabetici NOD di 12-16 settimane, diminuivano il numero di topi che progredivano verso il diabete e diminuivano l'infiltrato di cellule mononucleate nelle isole pancreatiche. Collettivamente, i dati di Ruffner dimostrano che l'inoculo di DC/sIL-4 previene la distruzione delle isole negli stadi più

avanzati della insulite attraverso la modulazione delle risposte mediate dalle cellule T. Questa è la prima dimostrazione che DC/sIL-4 sono in grado di prevenire l'insorgenza della malattia in una fase tardiva della insulite, e inoltre, suggerisce che questo approccio possa essere clinicamente rilevante per il diabete di tipo 1.

### **1.7.2 Cellule dendritiche e diabete mellito di tipo 2 (DMT2)**

La produzione del TNF- $\alpha$  da parte delle DC agisce in maniera autocrina per regolare la loro maturazione e promuove inoltre la risposta infiammatoria. Corrales e colleghi [123] hanno confrontato il numero dei monociti circolanti e delle sottopopolazioni di DC, nonché la loro capacità di produrre le citochine infiammatorie IL-1, IL-6, e TNF- $\alpha$  nei pazienti DMT2 con complicanze aterosclerotiche e nei soggetti sani. I risultati dello studio mostrano che i pazienti DMT2 con complicanze aterosclerotiche avevano una significativa riduzione della secrezione spontanea di IL-6 da monociti e da DC CD16<sup>+</sup> e del TNF- $\alpha$  da DC CD16<sup>+</sup>, rispetto ai pazienti diabetici senza complicanze aterosclerotiche. Nei pazienti senza complicanze aterosclerotiche era possibile misurare la secrezione spontanea di IL-1 $\beta$  da monociti e DC CD16<sup>+</sup> e di IL-6 dalle pDC CD33<sup>+</sup>, ma non nei pazienti con complicanze. Presi insieme questi risultati indicano che i pazienti DMT2 con complicanze aterosclerotiche mostravano una risposta immunologica mediata dalle cellule presentanti l'antigene (sia monociti che DC) quantitativamente e qualitativamente inferiore. La

difettiva produzione di citochine infiammatorie da parte di queste cellule può influenzare le risposte immunologiche mediate appunto da APC nonché le risposte antigene-specifiche mediate da altre cellule come le cellule T. Dato l'importante ruolo immunomodulante del TNF- $\alpha$  prodotto in maniera autocrina e paracrina dalle DC [124-125], lo studio di Blank [124] è stato disegnato per confrontare il numero delle DC circolanti e la produzione intracellulare di TNF- $\alpha$  fra le donne in post-menopausa DMT2 con controlli sani. Questo studio ha mostrato che le donne con DMT2 presentavano concentrazioni plasmatiche di TNF- $\alpha$  significativamente maggiori rispetto alle donne sane. Le pazienti con DMT2 con scarso controllo glicemico (DMT2 controllo cattivo, HbA1c $\geq$ 7%), riportavano un minor numero di pDC circolanti rispetto alle pazienti con DMT2 ma con un buon controllo glicemico (DMT2 buon controllo, HbA1c <7%) e rispetto alle donne sane. Nello studio è stata anche osservata un'interazione significativa tra gli effetti del glucosio plasmatico e l'espressione intracellulare di TNF- $\alpha$  nelle pDC stimulate. La produzione intracellulare di TNF- $\alpha$  nelle pDC era significativamente maggiore nei soggetti sani rispetto ai soggetti con DMT2 (con scarso controllo glicemico) ed i soggetti con DMT2 (con buon controllo glicemico), ma non differiva tra i sottogruppi di DMT2. Il numero di mDC e la produzione intracellulare di TNF- $\alpha$  non differiva tra i gruppi. Questi risultati indicano che la produzione di TNF- $\alpha$  dalle pDC è ridotta nelle pazienti con DMT2 e il numero delle pDC circolanti è correlato al controllo glicemico. Alcuni farmaci utilizzati nel trattamento del diabete hanno

proprietà anti-infiammatorie, come ad esempio gli agonisti del recettore dei perossisomi attivato dalla proliferazione (PPAR- $\gamma$ ), e sono stati proposti come agenti terapeutici per il trattamento di disordini infiammatori TH-1 associati. Nello studio di Thompson e colleghi, concentrazioni nanomolari di rosiglitazone aumentavano la produzione di IL-10 da parte di cellule dendritiche umane attivate di origine mieloide [126]. In un altro studio rosiglitazone era in grado di inibire la migrazione delle DC dall'epidermide verso i linfonodi drenanti inibendo inoltre il priming antigene specifico dei linfociti T, suggerendo che PPAR- $\gamma$  possa essere implicato nella regolazione della migrazione di DC dall'epidermide verso i linfonodi, e quindi contribuisca all'innesco di una risposta immunitaria [127]. Lo studio di Carreño e collaboratori [128] offre una spiegazione meccanicistica dell'induzione di DC tollerogeniche da parte di PPAR- $\gamma$ , poichè dimostra *in vivo* ed *in vitro* che rosiglitazone aumenta significativamente le capacità tollerogeniche delle DC tramite l'inibizione di NF-kB [128]. Ciglitazone, sempre appartenente alla classe dei tiazolidinedioni, è in grado di ridurre l'espressione immunofenotipica di CD40, CD1a, e HLA-DR in DC attivate con oxLDL, nonché ridurre altri eventi correlati sempre alle oxLDL, come l'aumentata endocitosi e la secrezione di citochine pro-infiammatorie (IL-12, 116 $\pm$ 29 contro 34 $\pm$ 3 pg/ml\*; IL-10, 49 $\pm$ 1 contro 28 $\pm$ 9 pg/ml\*; TNF- $\alpha$ , 46 $\pm$ 16 contro 24 $\pm$ 8 pg/ml\*, \*P <0.05 vs ox-LDL da solo) [129]. Diversa è la risposta di DC murine a rosiglitazone. Lo studio di Faveeuw e collaboratori [130] dimostra che rosiglitazone non

interferisce con la maturazione delle DC *in vitro*, né modifica la loro capacità di attivare i linfociti T naive *in vivo*. Ma il risultato più interessante che ottengono è che agonisti PPAR- $\gamma$  possono modulare la secrezione di IL-12 indotta da CD-40, un potente fattore TH-1 stimolante, suggerendo un possibile ruolo di PPAR- $\gamma$  nella regolazione della risposta immune [130].

## SCOPO

E' noto che esiste una stretta correlazione fra differenti fattori di rischio cardiovascolare, tra cui l'obesità che media lo sviluppo di uno stato infiammatorio cronico di basso grado, e DMT2, patologia spesso associata a infezioni opportunistiche caratterizzate da immunosoppressione. In questo contesto infiammatorio, ma deregolato dal punto di vista immunitario, è lecito supporre un'alterata partecipazione in termini di numero e/o attività delle cellule dendritiche (DC), cellule deputate al riconoscimento dei patogeni. Esistono meccanismi patogenetici multipli nella ben nota, ma ancora poco conosciuta, associazione fra obesità, patologie cardiovascolari e comorbidità come l'insulino-resistenza. Nel presente studio abbiamo voluto quantificare e caratterizzare il fenotipo e la funzione delle DC derivate da pazienti a rischio cardiovascolare (nel nostro caso sono state scelte donne in post-menopausa, obese e con diagnosi di DMT2) al fine di potere promuovere tali cellule come biomarcatori precoci di disfunzione endoteliale e infiammazione vascolare.

Abbiamo dunque prima analizzato il numero dei precursori di DC circolanti mediante citofluorimetria e in seguito studiato la capacità delle DC generate *ex-vivo* (a partire da precursori monocitari di tali pazienti) di maturare o interagire *in vitro* con altre cellule della

parete vascolare, quali le cellule muscolari lisce vascolari di arteria coronarica umana (CASMC), rispetto ai controlli sani.

Il rimodellamento vascolare è una caratteristica condivisa da tutti i fattori di rischio cardiovascolare e consta di un processo cronico multifattoriale in cui l'infiammazione sistemica o locale gioca un ruolo fondamentale. L'infiammazione partecipa al processo aterosclerotico dalla disfunzione endoteliale fino alle complicazioni trombotiche finali della lesione. E' noto che in questo contesto attivo sia dal punto di vista infiammatorio che immunologico, le cellule muscolari lisce vascolari sono stimulate e mostrano un'alterata espressione di fattori di trascrizione, fattori di crescita, geni che regolano l'apoptosi, integrine, proteasi e inoltre assumono una maggiore capacità di proliferare, migrare e secernere grandi quantità di matrice extracellulare [63-64]. E' stato dimostrato che la disfunzione endoteliale stimola la migrazione e l'adesione delle DC [65]. Tuttavia ancora non è chiaro se e quale ruolo abbiano le DC nell'attivazione e nel mantenimento in uno stato alterato delle cellule muscolari lisce vascolari (VSMC) come caratteristica peculiare delle lesioni aterosclerotiche e reciprocamente quale sia il possibile ruolo delle VSMC nella localizzazione ed attivazione delle DC nelle lesioni.

Altro scopo di questa tesi di dottorato è stato quello di studiare *in vitro* le interazioni fra cellule muscolari lisce coronariche umane e DC umane e la possibile modulazione di tali interazioni da parte di un ambiente infiammatorio o di farmaci utilizzati in prevenzione primaria

con noti effetti pleiotropici anti-aterogeni e immunomodulanti quali statine e agonisti PPAR- $\gamma$ .

## **MATERIALI E METODI**

### **2.1 Arruolamento dei pazienti e prelievi ematici**

Gli studi clinici disponibili in letteratura concordano nell'affermare che il genere maschile possiede un rischio cardiovascolare maggiore rispetto alle donne in età fertile [131]. Superata la menopausa tuttavia, il rischio nelle donne tende ad aumentare rapidamente. L'effetto protettivo è esercitato, almeno in parte, dagli estrogeni che favoriscono livelli più elevati di colesterolo HDL nelle donne, rispetto agli uomini. Presso le Agenzie di Obesiologia, Diabetologia e dalla SOD intra SOD di Malattie Metaboliche e Diabetologia AUO-Careggi sono state arruolate ventisei donne obese ed in post-menopausa, al fine di eliminare qualsiasi potenziale fattore confondente legato alle fluttuazioni ormonali correlate al ciclo mestruale, in prevenzione cardiovascolare primaria. L'età media era di 70 anni e il loro Indice di Massa Corporea (BMI) $>30$  kg/m<sup>2</sup>. Diciassette avevano una diagnosi di diabete mellito di tipo 2 ed erano sottoposte al relativo trattamento farmacologico. Ciascuna paziente è stata valutata per il suo profilo lipidico e glicemico (glicemia a digiuno; Tabella 2). I criteri di esclusione utilizzati: presenza di insufficienza epatica, cardiaca o renale, cancro, terapia insulinica e qualsiasi evento cardiovascolare pregresso. Il gruppo di controllo consisteva in venti donne sane e in post-

menopausa. Le pazienti sono state informate della possibilità di mettere a disposizione una minima parte del sangue per la ricerca ed hanno espresso in maniera libera, esplicita e per iscritto il proprio consenso alla partecipazione allo studio tramite firma dell'apposito modulo di consenso informato. Lo studio è stato approvato dal Comitato Etico locale (protocollo n. 0011762) [132].

Per ciascuna partecipante allo studio sono stati prelevati 3 campioni di sangue venoso periferico, ciascuno di circa 5 ml, in vacutainer<sup>®</sup> con EDTA (BD-Pharmingen; San Diego, CA). Il campione di sangue periferico è stato immediatamente processato per l'analisi dei precursori circolanti e per l'ottenimento *ex vivo* delle cellule dendritiche mieloidi [132].

|                          | Obese diabetic patients<br>(n= 17) | Obese non diabetic<br>patients (n= 9) |
|--------------------------|------------------------------------|---------------------------------------|
| Age                      | 70.3 ± 5.8                         | 63 ± 13                               |
| BMI (kg/m <sup>2</sup> ) | 31 ± 2.5                           | 34.5 ± 5.1                            |
| Plasma glucose (mg/dL)   | 123.48 ± 48                        | 98.2 ± 13.3                           |
| HbA1c < 7%               | 6.38 ± 0.4                         | 5.3 ± 0.4                             |
| HbA1c > 7%               | 8.18 ± 1.16                        | -                                     |
| TOT cholesterol (mg/dL)  | 177.41 ± 36                        | 179.6 ± 10.8                          |
| HDL-C (mg/dL)            | 52.41 ± 12                         | 40.6 ± 12.8                           |
| LDL-C (mg/dL)            | 97.65 ± 37                         | 108 ± 17.2                            |
| TG (mg/dL)               | 148.35 ± 54                        | 150.6 ± 59                            |

**Tabella 2. Caratteristiche cliniche delle pazienti studiate [132].**

## 2.2 Analisi delle DC circolanti

Dai campioni di sangue venoso periferico fresco delle pazienti o dei controlli sani prelevati la mattina stessa dell'esperimento è stata isolata la frazione di cellule mononucleate (PBMC). Da queste sono state identificate e quantificate le DC circolanti mediante immunofluorescenza diretta rilevata in citofluorimetria a singola piattaforma [133]. A tal scopo il sangue intero è stato diluito 1:3 con PBS-EDTA pH 7.2, in seguito stratificato su gradiente di Ficoll/Paque (Sigma-Aldrich, St Louis, MO) e quindi è stato recuperato l'anello di mononucleati (PBMC).  $5 \times 10^5$  cellule per punto sperimentale sono state marcate con anticorpi monoclonali per la quantificazione in citofluorimetria dei diversi sottotipi di DC circolanti. Dalle restanti PBMC sono stati isolati monociti  $CD14^+$  (vedi paragrafo 2.3) per generare *ex-vivo* Mo-DC. Le diverse sottoclassi di cellule dendritiche presenti all'interno della popolazione PBMC sono state evidenziate mediante l'utilizzo di anticorpi monoclonali che riconoscono esclusivi antigeni di superficie: BDCA-2-FITC per DC linfoidi, BDCA-1-PE e BDCA-3-FITC per due sottotipi di DC mieloidi (BDCA1,2,3, Miltenyi Biotec, Calderara di Reno, IT). Le popolazioni sopracitate sono state evidenziate all'interno di una popolazione con caratteristiche negative per popolazioni linfocitarie:  $CD3^- / CD14^- / CD16^- / CD19^- / CD20^- / CD56^-$  (Lin1-FITC, BD-Pharmingen) [133].

### 2.3 Generazione *ex-vivo* di Mo-DC

Cellule dendritiche mieloidi immature e mature sono state generate da PBMC di soggetti reclutati per lo studio (vedi paragrafo 2.1) e da buffy coat di donatori sani. I PBMC sono stati stratificati su gradiente di densità di Ficoll/Paque (Sigma-Aldrich). In seguito, è stato recuperato e lavato l'anello dei PBMC e, grazie ad una selezione immunomagnetica positiva operata con l'ausilio di anticorpi monoclonali anti-CD14 legati a microbiglie (Miltenyi Biotech), è stata recuperata una popolazione arricchita di cellule CD14<sup>+</sup> [134]. DC mieloidi (Mo-DC) sono quindi state generate *ex-vivo* coltivando le cellule precedentemente selezionate in RPMI 1640 con 800 U/ml rGM-CSF (Leucomax; Sandoz-Wander Pharma, Bern, CH) e 1000 U/ml IL-4 (R&D System, Minneapolis, MN) per 6 giorni, ottenendo così cellule dendritiche immature (iDC) per trans-differenziazione dai monociti. Il settimo giorno le iDC sono state raccolte ed il fenotipo è stato verificato mediante citometria a flusso (FACScanto BD Biosciences, Bedford, MA) marcandole con 5µl di anticorpi diretti contro i seguenti antigeni di superficie: il marcatore di maturazione CD83-FITC, le molecole co-stimolatorie CD80-PE, CD86-FITC, CD40-PE e la molecola del complesso maggiore di istocompatibilità-II HLADR FITC (BD-Pharmingen) [135]. La vitalità cellulare è stata testata mediante marcatura con 7-actinomicina (Molecular Probes). Per generare DC mature (mDC) le cellule sono state stimulate per 24h con singole citochine: 10 ng/ml TNF- $\alpha$  (R&D), 1000 U/ml IL-6 o 10 ng/ml, IL1- $\beta$  (Invitrogen, Carlsbad, CA) oppure con un cocktail di

maturazione composto da tutte le precedenti. Il fenotipo delle cellule ottenute è stato analizzato mediante citometria a flusso.

#### **2.4. Isolamento *ex-vivo* di linfociti umani**

PBMC ottenuti da buffy coat di donatori sani e isolati secondo la metodica descritta nel paragrafo 2.3, sono stati seminati in piastre di Petri da 10 cm di diametro in terreno RPMI-1640 al 10% FBS e incubati 40 minuti in atmosfera al 5% di CO<sub>2</sub> a 37°C per permettere l'adesione dei monociti alla piastra. Allo scadere dell'incubazione, la frazione linfocitaria in sospensione è stata raccolta, centrifugata a 1200 rpm per 10 minuti e quindi utilizzata per allestire gli esperimenti di Mixed Lymphocyte Reaction (MLR).

#### **2.5 Mixed Lymphocyte Reaction**

I linfociti sono stati seminati in multipozzetti da 96 alla densità di  $1 \times 10^5$  cellule/pozzetto a cui sono state aggiunte cellule dendritiche allogene (5 x 10<sup>3</sup>). Le due popolazioni sono state incubate per 5 giorni in atmosfera al 5% di CO<sub>2</sub> a 37°C.

Nelle ultime 18 ore di incubazione è stato aggiunto a ciascun pozzetto 1 µCi di [methyl-<sup>3</sup>H]thymidine (Amersham Pharmacia Biotech, Little Chalfont, UK). Le cellule sono state raccolte su un apposito filtro grazie ad un Filtermate Cell Harvester (Perkin-Elmer, Waltham, MA). I filtri sono stati in seguito lavati più volte con una

soluzione tampone ghiacciata e asciugati over-night a temperatura ambiente e sotto flusso aspiratore. L'incorporazione di  $^3\text{H}$ -Thymidine da parte dei linfociti è stata quantificata con un contatore TopCount NXT Microplate Scintillation (Perkin-Elmer) [136]. Ciascun esperimento è stato effettuato in triplicato.

## **2.6 Coltura di cellule muscolari lisce coronariche umane**

Colture primarie di cellule muscolari lisce vascolari di arteria coronarica umana (CASMC, lotti 0000184180;0000169150) sono state acquistate dalla Lonza Walkersville (Italia). Su tali cellule Lonza ha controllato e certificato il fenotipo muscolare liscio mediante marcatura positiva per alfa-actina del muscolo liscio ( $\alpha$ -SMA) e negativa per il fattore VIII. Le cellule sono state cresciute in terreno di base SmBM (Lonza) addizionato con un cocktail di fattori fornito dalla ditta: fattore di crescita epiteliale umano (hEGF), insulina, fattore di crescita fibroblastico umano (hFGF-B), gentamicina/amfotericina-B (SmGM-2 SingleQuots<sup>TM</sup> (Lonza), in presenza di siero fetale bovino inattivato dal calore 5% (v/v) (FBS, Defined Hyclone; Thermo Scientific, Waltman, MA), 100 U/ml penicillina, 100  $\mu\text{g}/\text{ml}$  streptomycina e 2 mmol/l glutammina (Sigma-Aldrich, St Louis, MO), in un'atmosfera umidificata al 5% di  $\text{CO}_2$ . Il terreno di coltura è stato cambiato ogni 2 giorni. Le cellule sono state utilizzate per gli esperimenti fra il 5<sup>th</sup> e il 10<sup>th</sup> passaggio.

## **2.7 Allestimento di co-culture di DC immature e CASMC**

Per studiare se le interazioni fra DC e CASMC potessero essere mediate da fattori solubili, le cellule muscolari (CASMC) sono state seminate in multiwell da 6 pozzetti con o senza pretrattamento di 24 h con le citochine infiammatorie TNF- $\alpha$  e IFN- $\gamma$ , ciascuna utilizzata alla concentrazione 50 ng/ml. Le cellule muscolari lisce venivano quindi messe in contatto indiretto con le iDC grazie a inserti particolari, transwell (6-well Millicell, Merk-Millipore, Darmstadt, Germany) dotati di pori con 0.4  $\mu\text{m}$  di diametro che impedivano qualsiasi contatto diretto fra i due tipi cellulari ma permettevano la condivisione dello stesso terreno di coltura RPMI-1640 al 10% FBS. Trascorse 36h di co-cultura in atmosfera al 5% di CO<sub>2</sub> a 37°C, le DC co-coltivate con CASMC in assenza (ccDC) o in presenza di pretrattamento con citochine (ccDC cito) venivano raccolte e analizzate fenotipicamente mediante citofluorimetria, come riportato nel paragrafo 2.3 e funzionalmente mediante esperimenti di MLR.

## **2.8 Preparazione dei terreni condizionati**

I terreni condizionati dalle mDC o ccDC sono stati preparati come segue: 60000 DC/ml sono state coltivate in RPMI-1640 al 10% di FBS per 2 giorni (in presenza del cocktail convenzionale di citochine infiammatorie per le mDC e in assenza di pretrattamento delle CASMC o aggiunta al terreno condiviso per le ccDC co-coltivate

su CASMC) a seguito dei quali sono stati recuperati i surnatanti. Da questi sono state rimosse le cellule e i detriti con una centrifugazione a 550 g per 5 minuti. I surnatanti recuperati sono stati aliquotati e conservati a -20°C fino all'utilizzo.

## **2.9 Migrazione cellulare**

Per gli studi di chemiotassi è stata utilizzata una camera di Boyden modificata (piastra a 48 pozzetti; Neuroprobe Gaithersburg, MD) con filtri di policarbonato Polyvinyl-pyrrolidone-free con pori di 8µm di diametro, ricoperti con collagene di tipo 1 100 µg/ml e 10 µg/ml di fibronectina (BD) [135]. Nei pozzetti inferiori della camera sono stati inseriti i terreni condizionati di mDC o ccDC preparati come descritto sopra, mentre  $12 \times 10^3$  CASMC in 50 µl di SmBM all'1% FBS, pretrattate o meno con TNF-α e IFN-γ (50 ng/ml), sono state aggiunte nelle camere superiori. La camera è stata messa in incubatore a 37°C per 6 h. Le cellule che avevano attraversato il filtro, richiamate dallo stimolo del terreno condizionato, sono state fissate con metanolo a 4°C per 12 ore. Le cellule sono state colorate con metodo Diff-Quik e , dopo aver rimosso meccanicamente le cellule sedimentate sulla faccia superiore del filtro, quelle migrate sulla faccia inferiore del filtro sono state contate al microscopio ottico in 10 campi selezionati casualmente, con un ingrandimento 400X. Ciascun punto sperimentale è stato misurato in triplicato.

## **2.10 Test di Adesione**

L'adesione di Mo-DC mature (mDC) alle CASMC è stata analizzata col kit Vybrant Cell Adhesion Assay Kit (Molecular Probes, OR, USA), un sistema che utilizza calceina fluorescente. Le DC sono state incubate per 30 minuti con la molecola fluorescente calceina alla concentrazione finale di 5  $\mu$ M, poi lavate con RPMI 1640 per rimuovere il tracciante in eccesso, e successivamente una sospensione di 30.000 mDC in 100  $\mu$ l di RPMI-1640 è stata seminata su un monostrato di CASMC semiconfluenti ed è stata fatta seguire un'incubazione di 45 minuti in incubatore a 37°C. Dopo un lavaggio per rimuovere le cellule non adese, l'adesione è stata misurata con un lettore multi pozzetto a fluorescenza Victor 3 (Perkin Elmer) [132]. In alcuni esperimenti è stato valutato l'effetto di citochine infiammatorie sul fenomeno dell'adesione. A questo scopo, CASMC sono state pretrattate per 12, 24 o 36 h con TNF- $\alpha$  o IFN- $\gamma$ , ciascuno alla concentrazione di 50 ng/ml, in SmBM con 1% (v/v) FBS prima dell'allestimento dell'adesione con le DC.

## **2.11 Modulazione farmacologica dell'adesione cellulare**

Per valutare l'effetto di farmaci sul fenomeno dell'adesione fra mDC e CASMC, quest'ultime sono state pretrattate per 1 h con concentrazioni crescenti dei farmaci in studio prima del trattamento con le singole citochine infiammatorie TNF- $\alpha$  o IFN- $\gamma$ . In seguito sono stati allestiti gli esperimenti di adesione, come descritto nel

paragrafo precedente. Allo scopo di studiare quali potessero essere i contro-recettori integrinici presenti sulle DC mature e coinvolti nel processo di adesione alle CASMC, sono stati utilizzati i seguenti anticorpi monoclonali neutralizzanti: anti-CD18 (0,5 µg/pozzetto, BioLegend, San Diego CA), anti-CD11c (0,5 µg/pozzetto, Chemicon Int, Millipore), o anti-DC-SIGN (0,5 µg/pozzetto, R&D) o immunoglobuline non immuni IgG2b e IgG1 (Millipore, Milano, Italia) per i controlli. L'adesione è stata quindi misurata come descritto precedentemente.

## **2.12 Immunofluorescenza**

2.12.1 Marcatura di DC adese su CASMC: CASMC sono state coltivate in appositi vetrini Lab-Tek (Thermo scientific) e, dopo avervi fatto aderire per 45 minuti le Mo-DC, le cellule in adesione sono state fissate in tampone fosfato al 2% di formaldeide per 10 minuti, lavate con PBS e saturati i siti aspecifici con 2% BSA (Sigma). Le cellule sono state in seguito incubate over-night a 4°C con l'anticorpo monoclonale anti-human  $\alpha$ -SMA (diluizione 1:50; Dako A/S, Danimarca) e marcate per 1h a temperatura ambiente con un anticorpo secondario goat-anti mouse coniugato al fluoroforo Alexa Fluor 594 (diluizione 1:250; Molecular Probes- Invitrogen). Le cellule sono state successivamente incubate per 2 h a temperatura ambiente con un anticorpo primario anti-human HLADR-FITC (diluizione 1:10 BD Pharmigen, MA, USA) seguito dall'aggiunta dell'anticorpo

amplificatore di fluorescenza anti-FITC-Alexa Fluor 488 (diluizione 1:100; Molecular Probes- Invitrogen) per 90 minuti a temperatura ambiente. I campioni sono stati quindi esaminati con un microscopio a fluorescenza e le immagini acquisite col software Comet Assay IV (Perceptive Instruments, UK).

2.12.2. Marcatura di iDC e mDC. Citospin preparati a partire da  $10^5$  iDC o mDC sono stati fissati con acetone per 5 minuti a temperatura ambiente. Dopo aver bloccato siti di legame non specifici con 10 ng/mL di albumina di siero bovino (BSA) (Sigma) in 0.1 mol/l di tampone fosfato pH 7.4, i vetrini sono stati marcati over-night a temperatura ambiente con anticorpi primari contro CD207/langerin (IgG2b, clone 12D6; Novocastra Laboratories, Newcastle, UK) diluizione 1:100, e DC-SIGN (policlonale; Sigma) diluizione 1:50. In seguito sono stati utilizzati come secondari degli anticorpi policlonali FITC-coniugati anti-mouse o anti-rabbit (Sigma) diluizione 1:50, per 60 minuti a 37°C temperatura ambiente. Per i controlli negativi la marcatura con gli anticorpi primari è stata sostituita con i rispettivi anticorpi irrilevanti o la marcatura è stata omessa del tutto. Come controlli positivi sono state utilizzate sezioni di pelle che includevano lo strato epidermico (contenente cellule di Langerhans langerin positive, DC-SIGN negative) e dermico (contenente cellule dendritiche di tessuto connettivo langerin negative, DC-SIGN positive). I vetrini sono stati montati utilizzando Gel/Mount (Biomed, Foster City, CA), osservati in un microscopio Axioskop equipaggiato per l'epifluorescenza (Zeiss, Oberkochen, Germany) e fotografate con

un sistema Axio Vision 4 che consisteva in un modulo digitale multicanale fluorescente e il relativo software (Zeiss).

### **2.13 Microscopia elettronica**

DC ottenute *ex vivo*, sia mediante stimolazione standard con citochine, sia mediante co-coltura che in seguito all'adesione con CASMC, sono state raccolte, centrifugate, fissate prima in 0.1 mol/l tampone cacodilato con 2% formaldeide e 2.5% glutaraldeide, pH 7.4, poi con acido osmico e infine incluse in resina epossica. Le sezioni, di spessore approssimativamente intorno ai 70 nm, sono state marcate con acetato di piombo e uranile acetato e osservate al microscopio elettronico JEM 1010 (Jeol, Tokyo, Japan), a 80 kV e fotografate con una fotocamera Mega View III (Jeol) connessa con un computer portatile fornito del software AnalySIS (Jeol).

### **2.14 RT-PCR**

CASMC sono state seminate all'80% di confluenza in piastre di Petri da 6 cm di diametro in terreno con fattori di crescita al 5% (v/v) di FBS. Dopo 24h di starving (terreno senza fattori allo 0,1% FBS) le CASMC sono state stimulate con TNF- $\alpha$  o IFN- $\gamma$  50ng/ml per ciascuna citochina. L'RNA totale è stato estratto utilizzando il TRI-reagent (Sigma) seguendo le indicazioni del produttore e la trascrizione di 1 $\mu$ g di RNA totale è stata effettuata utilizzando il kit

Stratagene (Quiagen, Venlo, Norvegia) e random primers. Il cDNA finale è stato ottenuto dopo 30 cicli di amplificazione utilizzando il kit HotStar Taq (Quiagen) e specifici primers (Tabella 3). I prodotti così ottenuti sono stati oggetto di elettroforesi in gel di agarosio all'1%. L'espressione genica è stata misurata in maniera semi-quantitativa come il rapporto fra la densità ottica del gene target e il gene di riferimento GAPDH.

| Gene   | Sequenza                     | Base pair | Temp. Annealing |
|--------|------------------------------|-----------|-----------------|
| ICAM-1 | F-5'-CAGTCACCTATGGCAACGAC-3' | 243       | 60°C            |
| ICAM-1 | R-5'-ATTCAGCGTCACCTTGGCTC-3' |           |                 |
| VCAM-1 | F-5'-TGTTGAGATCTCCCCTGGAC-3' | 301       | 60°C            |
| VCAM-1 | R-5'-GCCACCACTCATCTCGATTT-3' |           |                 |
| GAPDH  | F-5'-CCATGGAGAAGGCTGGGG-3'   | 193       | 60°C            |
| GAPDH  | R-5'-CAAAGTTGTCATGGATGACC-3' |           |                 |

**Tabella 3. Primers per RT-PCR.**

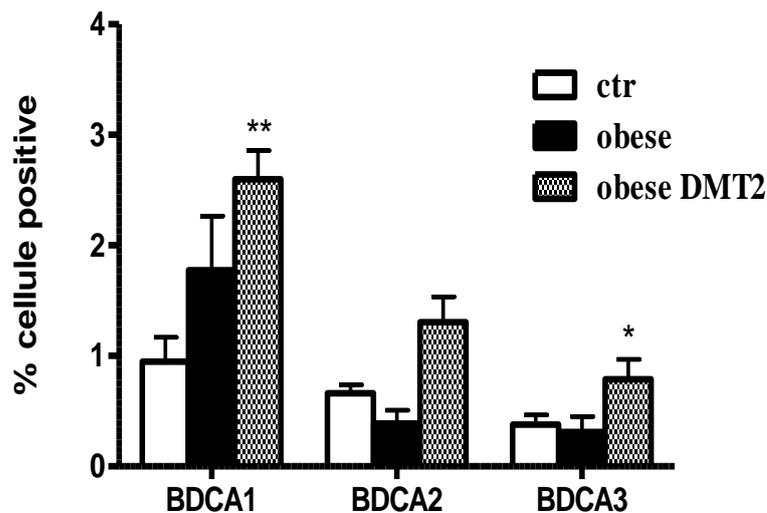
### **2.15 Analisi Statistica**

I dati sono riportati come media  $\pm$  deviazione standard dalla media (SEM). L'analisi statistica è stata effettuata utilizzando lo Student's t-test per dati non accoppiati e l'ANOVA test (test di Bonferroni e di comparazione multipla di Dunnett). I risultati con  $P < 0.05$  sono stati considerati significativi.

## RISULTATI

### **3.1 Caratterizzazione di DC circolanti in pazienti obese e affette da DMT2**

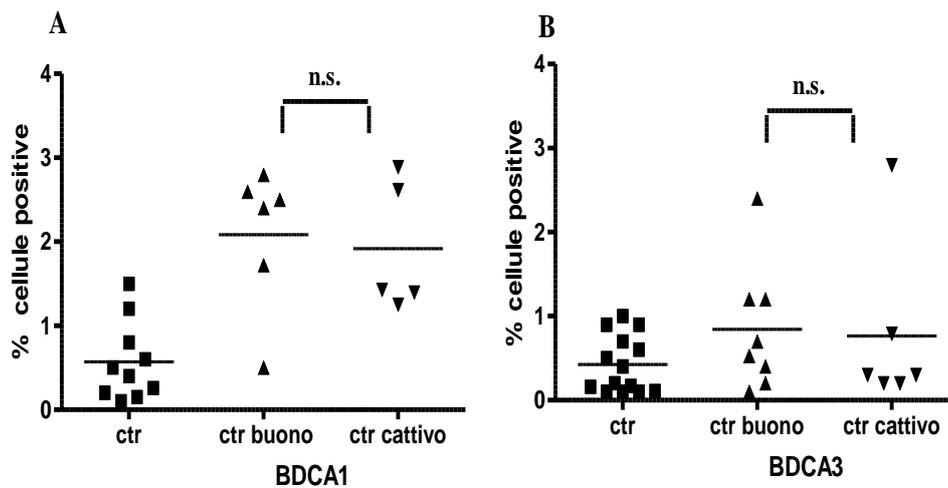
Dai campioni di sangue periferico freschi delle pazienti obese e obese con diagnosi di diabete mellito di tipo 2 (DMT2) è stata fatta una caratterizzazione dei differenti sottotipi di cellule dendritiche (DC) circolanti mediante citofluorimetria, al fine di valutare l'effetto dei fattori di rischio cardiovascolare delle pazienti sulla mobilitazione di tali precursori dal midollo osseo. Le DC mieloidi circolanti BDCA-1<sup>+</sup> erano lievemente aumentate nelle pazienti obese se confrontate coi soggetti sani, mentre le cellule BDCA-2<sup>+</sup> o BDCA-3<sup>+</sup> non erano significativamente cambiate (Figura 9). Le DC mieloidi positive sia per BDCA-1 o per BDCA-3 erano significativamente aumentate nelle pazienti obese e diabetiche (obese DMT2): le BDCA-1 positive infatti rappresentavano il  $2.59 \pm 0.59\%$  della popolazione cellulare totale (incremento doppio rispetto ai controlli sani,  $P < 0.01$ ) e le BDCA-3 positive erano il doppio rispetto ai soggetti sani ( $0.79 \pm 0.18\%$  vs.  $0.38 \pm 0.08\%$ ;  $P < 0.05$ ). Le cellule dendritiche plasmacitoidi BDCA-2<sup>+</sup> aumentavano se confrontate ai soggetti sani, benché tale differenza non fosse significativa ( $1.30 \pm 0.43\%$  vs.  $0.6 \pm 0.09\%$ , Figura 9) [132].



**Figura 9. Caratterizzazione dei differenti sottotipi di DC circolanti mieloidi e linfoidi in pazienti obese e con DMT2.** Analisi citofluorimetrica dei sottotipi di DC circolanti effettuata su PBMC isolate da pazienti obese (obese), obese e diabetiche (obese DMT2) e controlli sani (ctr). Media  $\pm$  SEM di cellule positive. \* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$  vs ctr. [132].

Il controllo glicemico è un indice che permette di identificare la concentrazione plasmatica media del glucosio per un periodo di circa 3 mesi. Si misura l'emoglobina glicata, la cui sigla è HbA1c, che riflette i valori della glicosilazione avvenuta nel corso degli ultimi tre mesi (vita media degli eritrociti). Viene definito cattivo controllo glicemico il valore di HbA1c  $\geq 7\%$  e buon controllo glicemico il valore  $< 7\%$  [136]. Nel lavoro di Seifarth e collaboratori vengono riportate differenze nella percentuale di mDC e pDC in pazienti affette solamente da DMT2 e che presentano un cattivo controllo glicemico rispetto ai controlli sani. Al contrario, pazienti con buon controllo glicemico avevano una riduzione meno evidente, ma sempre significativa, di tali cellule e in particolare di mDC [137]. Sulla base

di queste informazioni ottenute dalla letteratura internazionale, abbiamo quindi analizzato i dati precedentemente ottenuti con la citofluorimetria, in funzione del controllo glicemico delle pazienti, al fine di valutare se esistesse una correlazione tra l'aumento significativo delle DC mieloidi, osservato nelle pazienti obese DMT2, ed il loro controllo glicemico. Non abbiamo osservato alcuna correlazione tra il numero delle DC mieloidi (BDCA-1<sup>+</sup>, BDCA-3<sup>+</sup>, delle pazienti con DMT2 ed il loro controllo glicemico, come si può osservare nella Figura 10 [132].



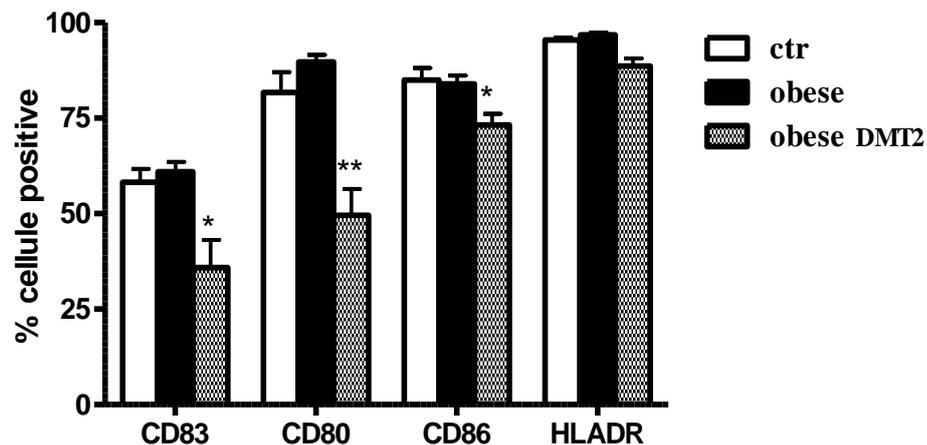
**Figura 10. Analisi di DC mieloidi circolanti in funzione del controllo glicemico.** Analisi citofluorimetrica di DC mieloidi BDCA-1<sup>+</sup> (A) e BDCA-3<sup>+</sup> (B) in pazienti obese e DMT2 con buono (ctr buono) o cattivo (ctr cattivo) controllo glicemico. Per l'analisi statistica è stato utilizzato il test ANOVA [132].

### **3.2 Caratterizzazione fenotipica di Mo-DC generate da monociti di pazienti obese e diabetiche**

Al fine di valutare se nelle pazienti arruolate nello studio i fattori di rischio cardiovascolare, rappresentati dal DMT2 e/o dall'obesità, potessero influire sull'omeostasi delle DC mieloidi mature, abbiamo analizzato la capacità dei precursori monocitari, isolati dalle pazienti, di transdifferenziarsi *in vitro* in DC mature (Mo-DC). Abbiamo innanzitutto valutato la resa, in percentuale, del numero di DC mature da precursori isolati dalle pazienti, rispetto ai soggetti sani. I risultati ottenuti dimostrano che la percentuale Mo-DC che si ottengono dalle pazienti, non differiva significativamente da quello dei soggetti sani, essendo circa il 2% delle cellule mononucleate periferiche circolanti recuperate [132].

E' stata effettuata una caratterizzazione del fenotipo delle Mo-DC generate *ex-vivo* a partire dai precursori monocitari, mediante l'analisi in citofluorimetria dei marcatori di superficie: CD83 (marcatore di maturazione), CD80 e CD86 (molecole co-stimolatorie), HLA-DR (molecola del complesso maggiore di istocompatibilità II). I risultati mostrano che la percentuale delle mDC ottenute da pazienti obese e DMT2 era significativamente inferiore rispetto a quella dei soggetti sani o solo obesi (Figura 11). Si è osservato un 38% ( $P < 0.01$ ), 40% ( $P < 0.05$ ) e 14% ( $P < 0.05$ ) di riduzione nei marcatori CD83, CD80 e CD86, rispettivamente, se confrontati con i controlli sani. La percentuale di Mo-DC ( $CD83^+ / CD80^+ / CD86^+$ ) ottenute da pazienti

obese non differiva significativamente da quella dei soggetti sani (Figura 11) [132].

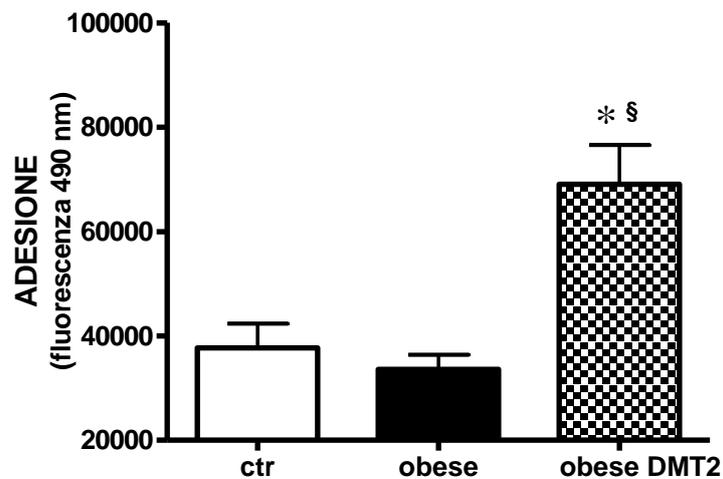


**Figura 11. Caratterizzazione fenotipica di Mo-DC mature in pazienti obese e diabetiche.** Analisi citofluorimetrica di Mo-DC mature ottenute *ex-vivo* da sangue periferico di controlli sani (ctr), pazienti obese (obese), pazienti obese e diabetiche (obese DMT2). Media  $\pm$  SEM di cellule positive. \* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$  vs ctr [132].

### 3.3 Adesione di Mo-DC a cellule muscolari lisce vascolari di arteria coronarica umana

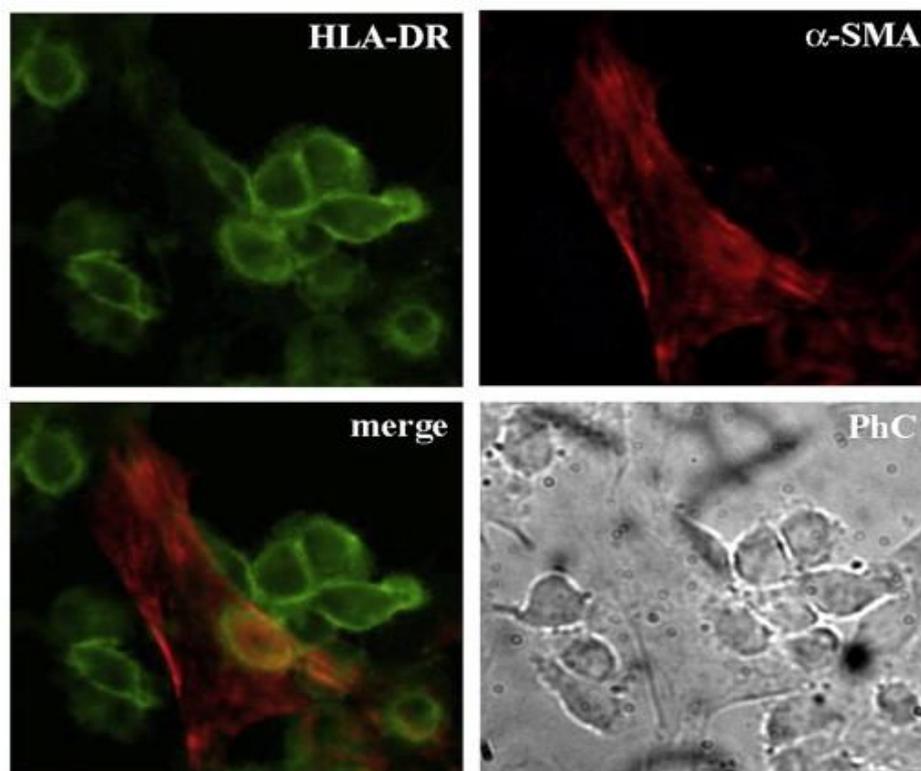
Poiché è noto che le DC si accumulano nella lesione aterosclerotica [59] suggerendone così un ruolo nella patogenesi e/o nelle complicanze della malattia, abbiamo indagato la capacità di Mo-DC generate *ex-vivo* dalle pazienti obese e con DMT2, di aderire ad un monostrato di cellule muscolari lisce di arteria coronarica umana. A tale scopo abbiamo marcato Mo-DCs ottenute da pazienti obese,

obese e diabetiche e controlli sani con calceina fluorescente e abbiamo seminato le cellule su monostrati di CASMC per 45 minuti. Le Mo-DC ottenute dalle pazienti obese e diabetiche erano significativamente più capaci di aderire alle cellule muscolari se confrontate con le DC dei soggetti sani (+ 81% rispetto al controllo sano,  $P < 0.05$ , Figura 12) [132]. Tale adesione è stata documentata anche in microscopia a fluorescenza, come riportato nella Figura 13 in cui Mo-DC marcate con HLADR-FITC aderiscono a CASMC marcate con  $\alpha$ -SMA-Alexa Fluor 594.



**Figura 12. Adesione di Mo-DC a cellule muscolari lisce coronariche umane (CASMC).** Mo-DC ottenute dalle pazienti solo obese (obese) o in comorbilità con DMT2 (obese DMT2) marcate con calceina sono state fatte aderire ad un monostrato di CASMC e in seguito è stata misurata l'emissione di fluorescenza della calceina a 490 nm. Media  $\pm$  SEM di cellule aderenti. \* $P < 0.05$  vs controlli sani (ctr), § $P < 0.01$  vs obese [132]

L'adesione delle Mo-DC ottenute dalle pazienti obese e diabetiche era significativamente maggiore rispetto a quella ottenuta da Mo-DC di pazienti obese ma non diabetiche ( $P < 0.01$  vs obese), la cui adesione era sovrapponibile a quella dei controlli sani (Figura 12) [132].

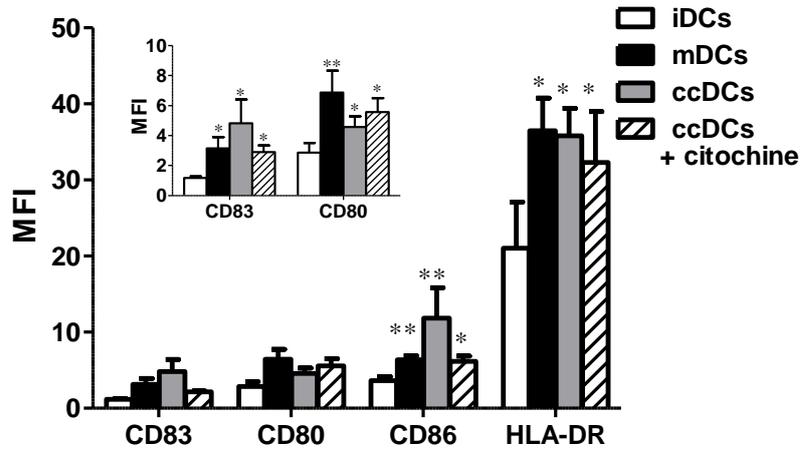


**Figura 13. Immunofluorescenza dell'adesione di Mo-DC di pazienti obese e diabetiche su CASC.** Analisi in immunofluorescenza dell'adesione di Mo-DC marcate con HLA-DR (verdi) su CASC marcate con  $\alpha$ -SMA (rosse). La doppia colorazione è indicata come *merge*. PhC rappresenta l'immagine al contrasto di fase. Ingrandimento 400X [132].

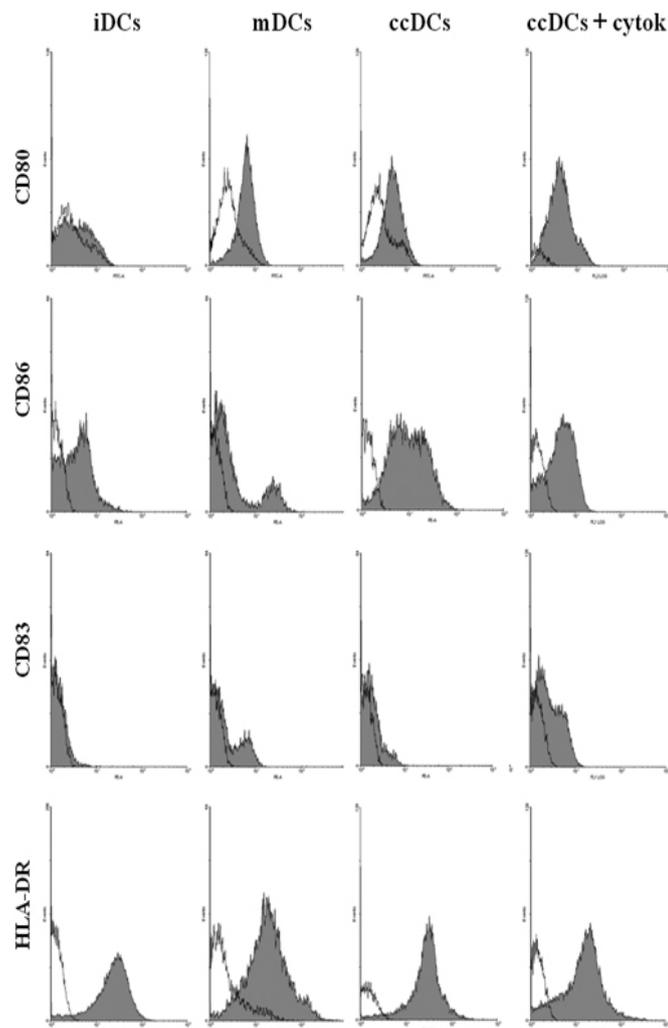
### **3.4 Le CASMC stimolano la maturazione fenotipica di iDC**

E' noto che DC immature (iDC) possono migrare nella neointima, caratterizzata dalla presenza di cellule muscolari lisce e da un ambiente infiammatorio. Abbiamo allestito *in vitro* una condizione sperimentale che potesse riproporre, almeno in parte, la situazione sopra-riportata, allo scopo di studiare le interazioni tra cellule muscolari lisce e DC. Sono state pertanto allestite co-culture, come riportato nella sezione 2.7 dei materiali e metodi. Le iDC dopo 36h di co-cultura con CASMC aumentavano significativamente l'espressione dei marcatori di superficie CD83, CD80 e CD86, HLA-DR (colonne grigie, figura 14 A-B), indicante una completa maturazione cellulare. I valori della MFI sono infatti del tutto sovrapponibili a quelli ottenuti con DC maturate mediante citochine secondo il protocollo standard (colonne nere). Il pretrattamento di CASMC per 24h con IFN- $\gamma$  e TNF- $\alpha$  (50 ng/mL) non induceva alcun aumento dell'espressione delle molecole co-stimolatorie, né di CD83 da parte delle DC ottenute dopo co-cultura (colonne tratteggiate).

**A**



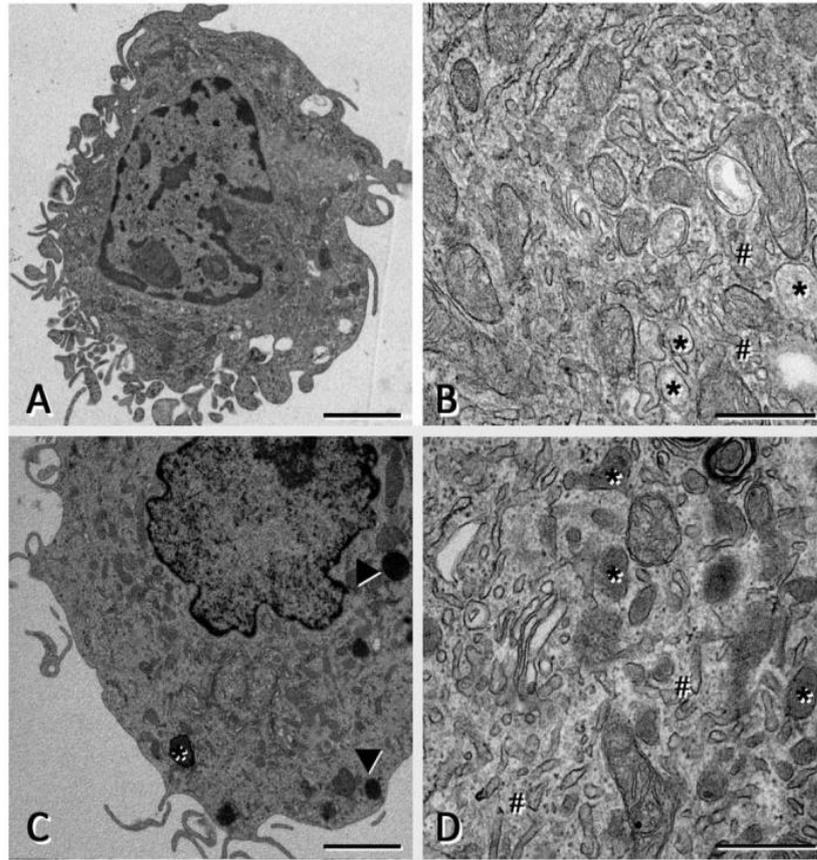
**B**



**Figura 14. Analisi immunofenotipica di Mo-DC.** A) Misura citofluorimetrica di marcatori di maturazione in DC immature (iDC), DC maturate con protocollo standard (mDC), DC co-coltivate con CASMC (ccDC), DC co-coltivate con CASMC pretrattate con TNF- $\alpha$  e IFN- $\gamma$  (ccDC+ cytok). Media  $\pm$  SEM della mediana di intensità di fluorescenza (MFI), n=9; \*P<0.05, \*\*P<0.01 vs. iDC. Insetto della figura: dettaglio della media  $\pm$  SEM di MFI per CD80 e CD83. B) Istogrammi rappresentativi di DC marcate con specifici anticorpi (istogrammi pieni) e isotipi di controllo (istogrammi vuoti).

### **3.5 Ultrastruttura e immunofluorescenza di DC co-coltivate.**

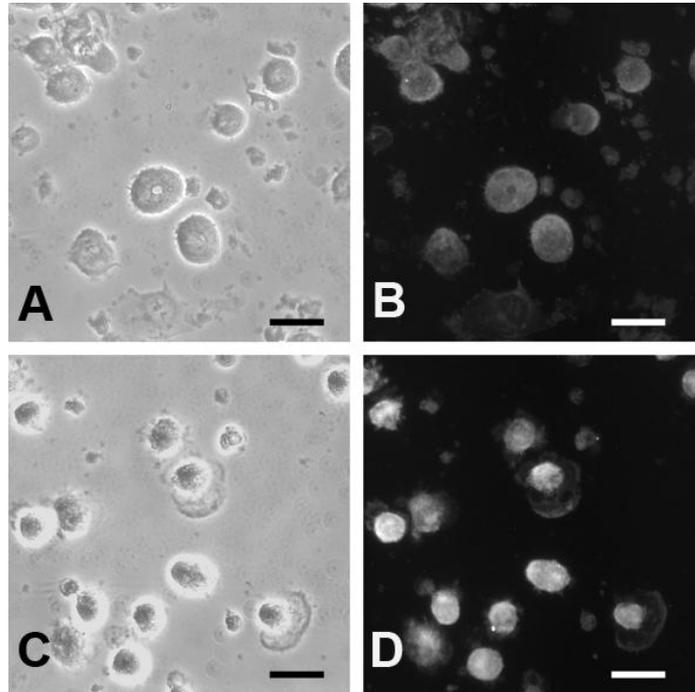
E' stata effettuata un'accurata analisi al microscopio elettronico per confermare la piena maturazione delle DC ottenute dalla co-coltura. Al microscopio elettronico le ccDC erano caratterizzate da reticolo endoplasmatico liscio e apparato del Golgi ben sviluppati, pochi corpi multi vescicolari e alcuni lisosomi, la maggior parte dei quali erano piccoli e dal contenuto omogeneo (Figura 15A-B). Le medesime caratteristiche morfologiche, tipiche di cellule dendritiche ben differenziate, erano visibili nelle mDC, ovvero le cellule maturate con le citochine secondo il protocollo standard (Figura 15C-D).



**Figura 15. Caratterizzazione di DC co-coltivate.** Microscopia elettronica di DC maturate nei transwell della co-coltura con CASMC (A, B) o con citochine (C, D). Gli asterischi indicano lisosomi; i cancelletti indicano reticolo endoplasmatico liscio. Le frecce indicano gocce lipidiche che le cellule accumulano occasionalmente in coltura. Barre=2 $\mu$ m (A), 2.5 $\mu$ m (C) o 0.5 $\mu$ m (B, D).

E' stata effettuata anche l'analisi dell'espressione di DC-SIGN, lectina di tipo C coinvolta nell'adesione a ICAM-3 e nel riconoscimento di vari patogeni. Questa molecola viene espressa debolmente da iDC ed intensamente da mDC (Figure 16A-D), mentre né le iDC né le mDC esprimevano CD207/langerin, proteina espressa dalle cellule di Langerhans, ovvero iDC dell'epidermide e della mucosa (dati non mostrati). Questi risultati dunque indicano che le

cellule ottenute ex vivo hanno caratteristiche di DC del tessuto connettivo.

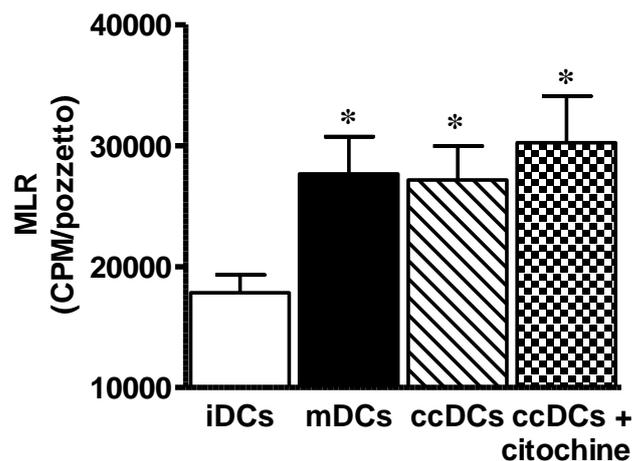


**Figura 16. Immunofluorescenza di DC co-coltivate.** A-D) Presenza di DC-SIGN in DC maturate con citochine. Microscopia a contrasto di fase (A, C) e microscopia a fluorescenza (B, D) di DC immature (iDC; A, B) e mature DC (mDC; C, D) marcate per DC-SIGN. Barra=30µm.

### 3.6 Le CASMC stimolano la maturazione funzionale di iDC

Poiché una delle più importanti funzioni delle DC mature è quella di attivare i linfociti per generare una risposta immunitaria adattativa efficace, abbiamo analizzato tale capacità nelle DC co-coltivate con le cellule muscolari, pre-trattate o meno con le citochine infiammatorie (ma sempre in assenza de cocktail standard di maturazione). All'analisi MLR, come atteso, le iDC stimolavano debolmente la

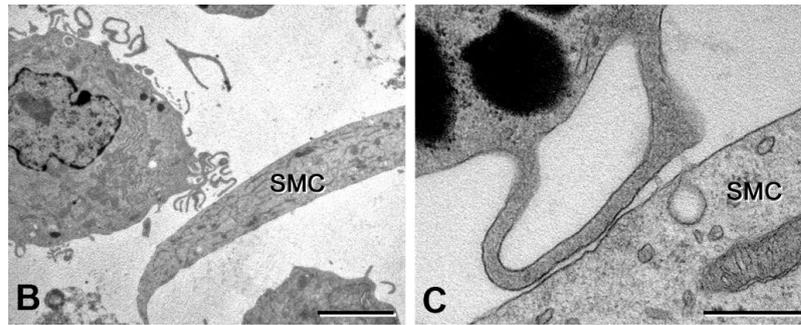
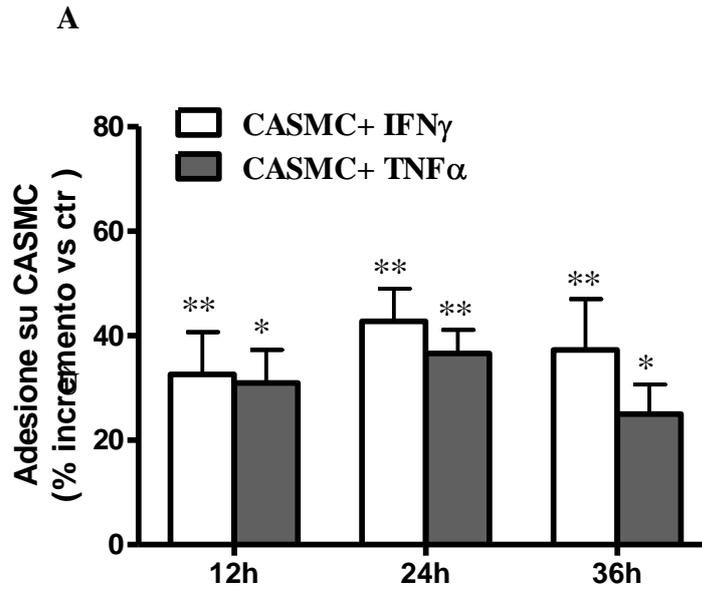
proliferazione linfocitaria (Figura 17). Le DC ottenute dalla co-coltura (cc-DC), mostravano di essere DC pienamente mature in quanto capaci di stimolare significativamente la proliferazione dei linfociti allogenici (Figura 17, colonne rigate). Tale effetto era del tutto sovrapponibile a quello ottenuto con DC maturate con la metodica standard (mDC, Figura 17, colonne nere); il pretrattamento delle CASMC con  $TNF-\alpha$  o  $IFN-\gamma$  non portava ad alcun aumento della proliferazione linfocitaria indotta dalle ccDC (Figura 17, colonne quadrettate).



**Figura 17. Caratterizzazione funzionale delle ccDC mediante MLR.** Proliferazione linfocitaria in presenza di DC immature (iDC), DC maturate con il protocollo standard (mDC), DC co-coltivate con CASMC (ccDC), DCs co-coltivate con CASMCs pretrattate con  $TNF-\alpha$  e  $IFN-\gamma$  (ccDC + citochine), espressa come numero di colpi emessi dalla timidina triziata per minuto/pozzetto. Media  $\pm$  SEM di 4 esperimenti, ciascuno in triplicato; \* $P < 0.05$  vs. iDC.

### **3.7 Il microambiente infiammatorio stimola l'adesione di mDC a CASMC**

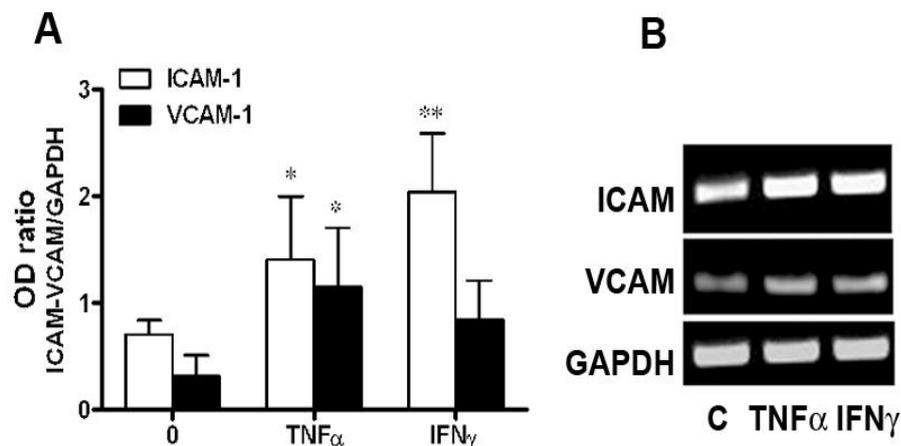
E' noto che esiste una correlazione fra la presenza di DC mature in lesioni aterosclerotiche umane e la progressione della malattia [109]. Sulla base dei risultati ottenuti con le Mo-Dc generate dalle pazienti obese e diabetiche, che dimostrano come tali cellule avevano una maggiore capacità adesiva su CASMC rispetto ai controlli, abbiamo indagato i probabili meccanismi cellulari responsabili dell'accumulo di DC in tali lesioni. A tal fine abbiamo riproposto *in vitro* un microambiente infiammatorio per valutare se questo potesse esercitare una modulazione dell'adesione fra mDC e CASMC. La percentuale di mDC umane che aderivano a CASMC risultava essere del  $35.8 \pm 3.9\%$  (n=6). Il pretrattamento di CASMC con TNF- $\alpha$  o IFN- $\gamma$  (50 ng/ml) per 12, 24 e 36h aumentava significativamente l'adesione delle mDC ( $42.7 \pm 6\%$  e  $36.6 \pm 4.3\%$  per rispettivamente un pretrattamento di 12h con IFN- $\gamma$  o TNF- $\alpha$ , Figura 18A). L'adesione è stata confermata anche in microscopia elettronica: le immagini nelle figure 18 B, C dimostrano che le DC aderiscono alle CASMC mediante i loro dendriti, con piccole aree di contatto stretto fra le due membrane cellulari ( $\approx 20\text{nm}$ ).



**Fig 18. Adesione di mDC a CASMC.** A) Adesione tempo-dipendente di mDC a CASMC pretrattate con citochine infiammatorie. Media  $\pm$  SEM di 6 esperimenti, ciascuno in triplicato. I risultati sono espressi come percentuale dell'adesione delle mDC su CASMC non trattate (controllo). \* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$  vs. controllo. B, C) Microscopia Elettronica di mDC aderenti a CASMC trattate con citochine; SMC: Cellule Muscolari Lisce. Barre = 4 $\mu$ m (B) o 0.5 $\mu$ m (C).

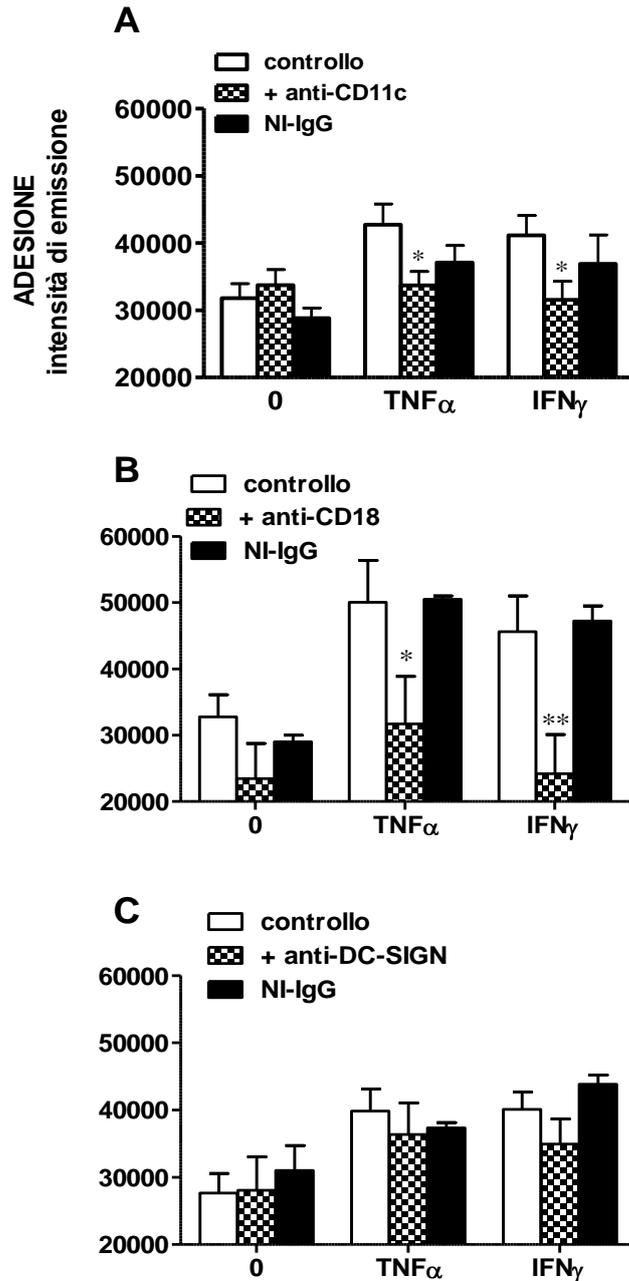
### 3.8 ICAM-1, VCAM-1, CD11c e CD18 sono coinvolti nell'adesione fra CASMC e DC

L'analisi RT-PCR in CASMC trattate con TNF- $\alpha$  o IFN- $\gamma$ , ha dimostrato un aumento significativo e tempo dipendente dell' mRNA di importanti molecole di adesione quali ICAM-1 e VCAM-1, con effetto massimo ottenuto dopo 24h di stimolazione (95% e 270% di incremento dell' mRNA per ICAM-1 e VCAM-1 vs CASMC non stimolate, Figura 19 A, B). Ventiquattro ore di stimolazione con IFN- $\gamma$  aumentavano significativamente l'espressione dell'mRNA di ICAM-1 nelle CASMC rispetto alle stesse non trattate (+ 190%), senza alterare significativamente l'espressione per VCAM-1.



**Figura 19. Effetto delle citochine infiammatorie sull'espressione di molecole di adesione in CASMC.** A) RT-PCR. analisi semi-quantitativa dell'espressione di mRNA di ICAM-1 e VCAM-1 da parte di CASMC non trattate (0) e CASMC stimolate con TNF- $\alpha$  o IFN- $\gamma$  (50 ng/ml per citochina) per 24h. I risultati sono espressi come rapporto di intensità della banda del gene di interesse vs. il gene di riferimento GAPDH. Media  $\pm$  SEM di 4 esperimenti per ICAM-1 e 3 esperimenti per VCAM-1. \*P<0.05, \*\*P<0.01 vs. CASMC non trattate (0). B) Gel rappresentativi di RT-PCR.

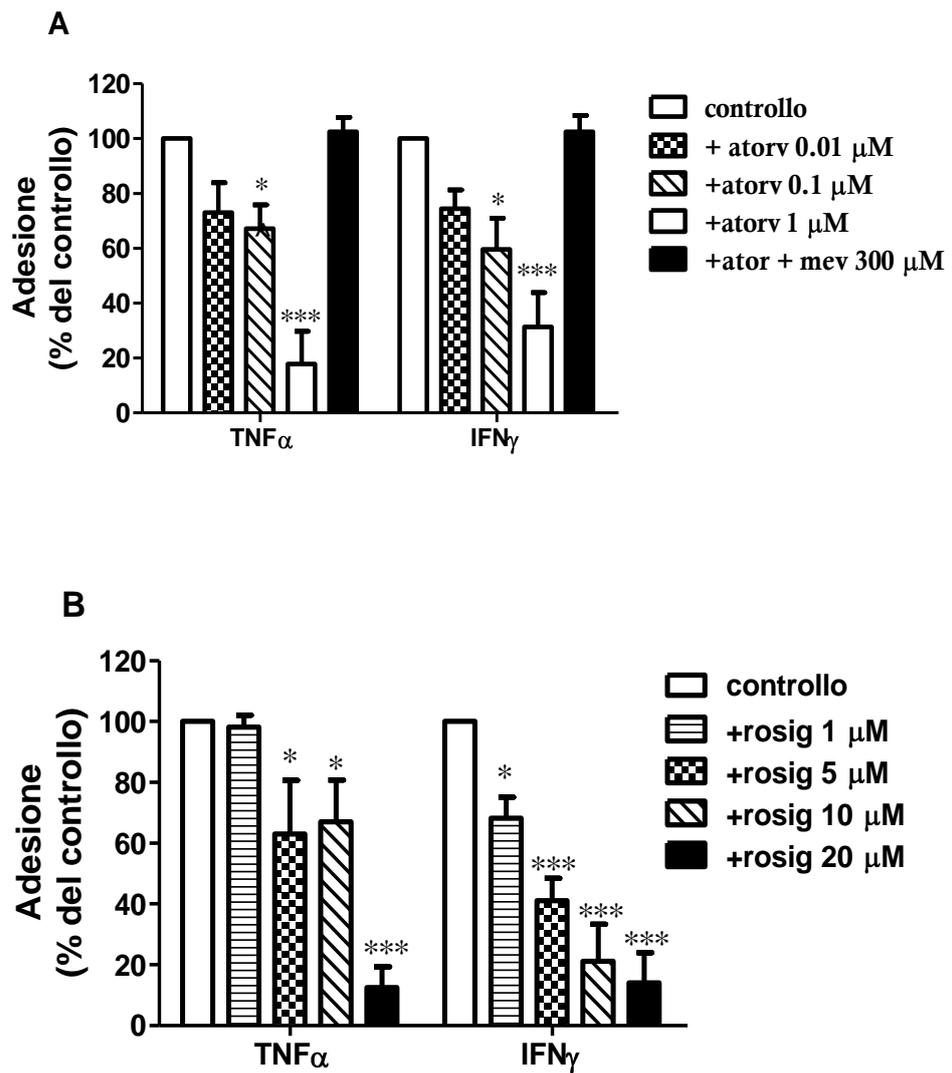
Il ruolo di ICAM-1 e VCAM-1 nell'aumentato legame delle mDC alle CASMC è stato confermato mediante anticorpi monoclonali neutralizzanti anti-CD11c (subunità  $\alpha_x$  anche detta CR4) e anti-CD18 (subunità  $\beta_2$  dell'integrina LFA1), che sono contro-recettori rispettivamente di ICAM-1 e VCAM-1. Quando le mDC venivano pretrattate per 1h con gli anticorpi neutralizzanti anti-CD11c e anti-CD18, la loro adesione alle CASMC era significativamente ridotta (Figura 20 A, B), mentre le IgG non rilevanti erano prive di effetto. Data l'espressione di DC-SIGN da parte delle DC mature e il suo proposto ruolo nel processo di adesione alle cellule endoteliali, abbiamo inoltre valutato l'effetto di un anticorpo neutralizzante contro DC-SIGN sul fenomeno di adesione di mDC a CASMC: tale anticorpo però si è rivelato inefficace nell'ostacolare l'adesione delle DC a qualsiasi concentrazione utilizzata (Figura 20 C).



**Figura 20. Contro-recettori coinvolti nell'adesione di mDC a CASMC.** A-C) Effetto di anticorpi neutralizzanti sull'adesione di mDC a CASMC. mDC pretrattate con anticorpi neutralizzanti (A) anti-CD11c (0.5  $\mu$ g/pozzetto), B) anti-CD18 (0.5  $\mu$ g/pozzetto), o C) anti-DC-SIGN (0.5  $\mu$ g/pozzetto). CASMC non trattate (0) o stimolate con TNF- $\alpha$  o IFN- $\gamma$  per 24h a seguito delle quali veniva valutata l'adesione delle mDC come indicato nella figura. NI-IgG: IgG non immune. Media  $\pm$  SEM di 5 esperimenti, ciascuno in triplicato. \*P<0.05, \*\*P<0.01 vs. controllo.

### **3.9 L'adesione fra mDC e CASMC è modulata dal trattamento farmacologico con atorvastatina e rosigitazione**

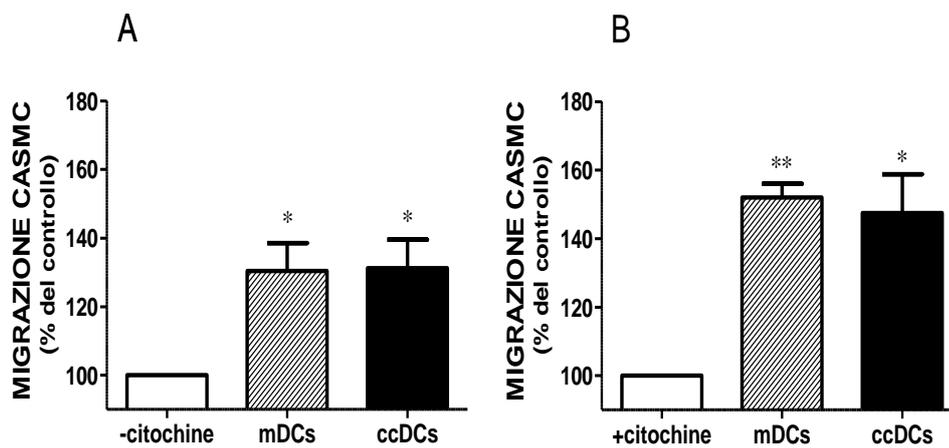
Dato il ruolo anti-aterogeno e anti-infiammatorio delle statine, inibitori di HMG-CoA reduttasi, e dei tiazolidinedioni, agonisti PPAR $\gamma$ , abbiamo valutato l'effetto di atorvastatina e rosigitazione sull'adesione fra mDC e CASMC. A tal scopo abbiamo pretrattato le CASMC per 1h con atorvastatina (0.01-1  $\mu$ M) o rosigitazione (1-20 $\mu$ M) e in seguito le abbiamo stimulate per 24h con IFN- $\gamma$  o TNF- $\alpha$  prima di misurare la loro adesività alle mDC. I risultati dimostrano un'inibizione concentrazione-dipendente dell'adesione di mDC alle CASMC sia da parte di atorvastatina che di rosigitazione (Figura 21). L'effetto massimo si otteneva con rosigitazione 20 $\mu$ M, che inibiva l'adesione di mDC a CASMC dell'  $87.0 \pm 9\%$  e dell'  $87.8 \pm 9.8\%$ , indotta rispettivamente da TNF- $\alpha$  e IFN- $\gamma$  e con atorvastatina 1 $\mu$ M che inibiva l'adesione di mDC a CASMC del  $79.6 \pm 10\%$  e del  $68.93 \pm 13\%$ , rispettivamente indotta da TNF- $\alpha$  e da IFN- $\gamma$  (Figura 21). L'effetto inibitorio di atorvastatina era da considerare selettivo sull'enzima HMG-CoA reduttasi, poiché l'aggiunta di mevalonato revertiva l'effetto della statina, utilizzata alla massima concentrazione (Figura 21A).



**Figura 21. Effetto di Atorvastatina e Rosiglitazone sull'adesione di mDC a CASCs.** CASCs sono state pretrattate con atorvastatina (0.01-1  $\mu$ M) o rosiglitazone (1-20  $\mu$ M) prima di stimolarle con 50 ng/ml di TNF- $\alpha$  o IFN- $\gamma$  per 24h. In seguito è stato effettuato il test di adesione. L'adesione è riportata come percentuale di quella indotta dal TNF- $\alpha$  o IFN- $\gamma$  (controllo). Media  $\pm$  SEM di 8 esperimenti, ciascuno in triplicato. \*P<0.05, \*\*\*P<0.001 vs. controllo.

### **3.10 I fattori solubili rilasciati dalle mDC aumentano la migrazione di CASMC**

In questa tesi abbiamo dimostrato come le CASMC stimolano la piena maturazione delle DC. Tuttavia, è lecito supporre che la comunicazione fra i due tipi cellulari non sia univoca. Per verificare l'ipotesi che anche le DC potessero avere un'influenza sull'attivazione delle cellule muscolari lisce vascolari, CASMC non trattate (controllo) o trattate con TNF- $\alpha$  e IFN- $\gamma$  per 24h sono state fatte migrare in risposta al terreno condizionato di mDC o di ccDC, in assenza quindi di altro stimolo. Se confrontata alla migrazione spontanea (controllo) delle CASMC, quella indotta dai terreni condizionati dalle DC era significativamente maggiore. Si aveva un aumento del  $30.4 \pm 8\%$  e del  $31.2 \pm 7\%$ , in risposta ai terreni condizionati di mDC e ccDC rispettivamente (n=4; P<0.05; Figura 22). Quando le CASMC venivano pretrattate per 24h con IFN- $\gamma$  e TNF- $\alpha$ , la loro capacità di migrare verso i terreni condizionati di mDC o ccDC era potenziata (+  $52 \pm 8\%$  e +  $47.5 \pm 9\%$  rispettivamente, n=4; P<0.01 e P<0.05 rispettivamente, in confronto alle cellule non stimolate, Figura 22B).



**Figura 22. Effetti del terreno condizionato da DC sulla migrazione di CASMC.** CASMC non trattate (-citochine, A) o pretrattate con citochine (+citochine, B) sono state fatte migrare in risposta a terreno condizionato di DC maturate con protocollo standard (mDC) o DC co-coltivate con CASMC (ccDC). La migrazione è espressa come percentuale di migrazione spontanea (controllo). Media  $\pm$  SEM di 4 esperimenti, ciascuno in triplicato. \* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$  vs. migrazione spontanea.

## DISCUSSIONE E CONCLUSIONI

Nella prima parte di questa tesi di dottorato si è cercato di effettuare un'analisi quantitativa e qualitativa dei precursori circolanti delle cellule dendritiche (DC), in pazienti che presentano rischio cardiovascolare. Si dimostra che in pazienti obese e con diagnosi di DMT2, in assenza di eventi clinici ischemici, le DC circolanti presentavano alterazioni quantitative se confrontate a quelle di pazienti solo obese (non diabetiche) o soggetti sani. In particolare, si è misurato un numero significativamente superiore di DC di origine mieloidi, mentre un aumento più contenuto è stato osservato per le pDC. Il loro aumento nel torrente circolatorio potrebbe far pensare ad una loro mobilitazione dal midollo osseo in risposta alle citochine e/o chemochine infiammatorie generate dalle condizioni di obesità e DMT2. È interessante notare come, inoltre, i precursori monocitari di tali pazienti abbiano una ridotta capacità di maturazione in risposta ad un cocktail standard di citochine infiammatorie rispetto ai controlli. Ciò può rendere conto della diminuita capacità, in questi pazienti, di rispondere alle infezioni opportunistiche. Il risultato più importante in questa prima parte dello studio è che le DC mieloidi mature (Mo-DC) generate da pazienti obese e con DMT2 aumentavano significativamente la loro adesione alle cellule muscolari lisce coronariche umane rispetto a quelle di pazienti solo obese o ai controlli sani. Tale adesione è confermata per mezzo di analisi in

immunofluorescenza di cellule muscolari lisce positive per  $\alpha$ -SMA e Mo-DC positive per HLA-DR. L'incremento dell'adesione alle cellule muscolari lisce vascolari può suggerire un aumento delle molecole di adesione o di altri recettori solo da parte delle DC isolate dalle pazienti, dato che le CASMC, in questa prima parte dello studio, non sono state stimulate con alcuna citochina infiammatoria.

E' noto che l'infiammazione rappresenta un processo chiave nel rimodellamento vascolare patologico: è stato infatti dimostrato che la condizione diabetica stimola l'adesione dei monociti alle cellule muscolari lisce vascolari, suggerendo in tal modo che il processo infiammatorio presente nella parete vascolare dei pazienti diabetici, possa accelerare l'aterosclerosi [138]. E' ben noto che l'obesità e l'insulino-resistenza sono associate ad un leggero stato infiammatorio che può portare al rimodellamento vascolare [11,139]. L'obesità esacerba condizioni cliniche croniche incluso il DMT2. Il nesso fra DMT2 e sovrappeso/obesità è indiscutibile. Il rischio di sviluppare il diabete cresce col grado di eccesso di peso [140]. Evidenze epidemiologiche suggeriscono che il rischio cardiovascolare comincia a svilupparsi molti anni prima della diagnosi di DMT2. L'insulino-resistenza è di per sé associata ad un aumento del rischio cardiovascolare e ad altre comorbidità come ipertensione, dislipidemia, obesità e stato pro-trombotico [11,141]. La disfunzione endoteliale, promossa dall'insulino-resistenza, è associata a cambiamenti deleteri della parete vascolare, coinvolti nello sviluppo dell'aterosclerosi e dell'ipertensione [141,142]. Una funzione

endoteliale alterata ha un impatto significativo sull'adesione delle DC all'endotelio [65], benché non sia stata ancora riportata alcuna informazione, per quanto ne siamo a conoscenza, sull'interazione fra VSMC e DC in condizioni di insulino-resistenza e funzionalità immunitarie compromesse. Benché sia stato dimostrato che le DC risiedono nella tonaca intima di un vaso fra le cellule muscolari lisce vascolari ( $\alpha$ -SMA<sup>+</sup>) [59], nella lesione aterosclerotica sono principalmente localizzate nella neointima insieme ad altre cellule infiammatorie. Sappiamo che le cellule muscolari lisce vascolari sono esse stesse residenti nella neointima in seguito a disfunzione endoteliale, e lì possono interagire con le DC contribuendo al rimodellamento vascolare.

Questa tesi dimostra le anomalie quantitative nei precursori circolanti delle DC. Queste consistono in un significativo aumento del numero di DC circolanti mieloidi (BDCA-1<sup>+</sup> o BDCA-3<sup>+</sup>), in confronto ai controlli sani. Per le DC plasmacitoidi non si sono osservate differenze importanti fra i due gruppi di pazienti. I pazienti obesi ma non diabetici, mostravano un incremento di DC mieloidi BDCA-1<sup>+</sup> senza mostrare differenze significative se confrontate con i soggetti sani [132].

Altro dato significativo riportato in questa tesi è che, nonostante l'aumento dei precursori circolanti, gli stessi non erano in grado di differenziarsi *ex vivo* in DC pienamente mature. Sembra ragionevole pensare che le pazienti obese e con DMT2 presentassero uno sbilanciamento delle DC mieloidi, le principali cellule coinvolte

nelle risposte Th1-mediate, che potesse essere controbilanciato da un aumento del numero di precursori mieloidi circolanti (BDCA-1<sup>+</sup> e BDCA-3<sup>+</sup>). Stiamo ancora valutando la funzionalità di tali cellule ottenute dalle pazienti obese e diabetiche per verificare questa ipotesi.

E' una esperienza clinica piuttosto comune quella che vede le pazienti di DM2 essere suscettibili di infezioni opportunistiche. Le ragioni che sottendono tale immunodeficienza non sono completamente chiare, ma una possibile spiegazione, ipotizzabile in base ai risultati presentati in questa tesi, è che le Mo-DC di queste pazienti difficilmente raggiungono uno stato di piena maturazione e ciò può portare alla maggiore suscettibilità ai patogeni per fenomeni di tolleranza. Abbiamo confrontato i nostri dati con la letteratura internazionale. Il confronto non è facile ed immediato, perché la presenza di più comorbidità e/o la presenza di eventi ischemici pregressi, incidono sul fenotipo e/o funzione delle DC. E' stato recentemente dimostrato che la frequenza assoluta e relativa sia di DC mieloidi che plasmacitoidi era significativamente diminuita in pazienti maschi diabetici (ma non obesi) con scarso controllo glicemico, se confrontata con i controlli sani, suggerendo che l'iperglicemia avesse un ruolo chiave nell'omeostasi delle DC [137]. In un altro lavoro, donne diabetiche con scarso controllo glicemico selezionate dallo studio ACCORD, presentavano un minor numero di DC plasmacitoidi circolanti rispetto ai controlli [124]. I nostri risultati sono apparentemente in contrasto con questi dati. Dobbiamo precisare che nello studio ACCORD, le pazienti selezionate erano ad alto rischio

cardiovascolare [124] e provenivano da uno studio multicentrico, controllato e randomizzato nel quale sono stati testati i benefici cardiovascolari relativi ad un intenso controllo della glicemia, pressione sanguigna e stato lipidico per mezzo di 3 diversi trattamenti farmacologici. Le pazienti selezionate nel nostro studio non presentavano un elevato rischio cardiovascolare, avevano un normale profilo lipidico e non avevano manifestato nessun evento cardiovascolare pregresso. Inoltre, abbiamo utilizzato un pannello di anticorpi monoclonali selettivi che riconoscono i diversi marcatori di progenitori (BDCA1,2,3) per l'analisi delle DC circolanti che permettono il rilevamento di sottopopolazioni di DC piccole ed eterogenee come BDCA-3, una piccola popolazione di DC circolanti CD123<sup>-</sup>/CD11c<sup>+</sup> [143]. I risultati finora mostrati dimostrano che in condizioni di diabete e obesità c'è una de-regolazione dei precursori mieloidi delle DC, che possono essere correlati alle compromesse funzioni immunitarie.

Altra caratteristica funzionale che abbiamo evidenziato nelle Mo-DC ottenute dalle pazienti obese e con DMT2 è che raddoppiano la loro capacità di aderire ad un monostrato di cellule muscolari lisce coronariche umane. Nonostante non siano state valutate le integrine e molecole di adesione eventualmente implicate in questo processo, i dati suggeriscono che le DC ottenute dalle pazienti possano avere proprietà adesive maggiori grazie a molecole di adesione e altri sistemi potenziati dall'aumentata infiammazione e disfunzione endoteliale, sicuramente presente nelle pazienti. Questo ci porta ad

ipotizzare che queste cellule possano essere proposte come biomarcatori precoci di infiammazione/disfunzione endoteliale.

Nella seconda parte della tesi è stato approfondito lo studio dei meccanismi di interazione fra cellule dendritiche e muscolari lisce vascolari in un sistema *in vitro* che potesse il più possibile mimare l'ambiente infiammatorio. Abbiamo dimostrato che:

- 1) Le cellule muscolari lisce coronariche umane (CASMC) stimolano la differenziazione delle DC da immature ad un efficiente fenotipo maturo immunostimolante;
- 2) Le interazioni fra DC e CASMC sono mediate da mediatori solubili;
- 3) Cellule dendritiche mature possono aderire alle CASMC almeno in parte grazie al legame CD11c e ICAM-1 e fra CD18 e VCAM-1;
- 4) L'aggiunta di citochine nel sistema *in vitro*, al fine di mimare un ambiente infiammatorio, potenzia sia l'influenza delle CASMC sulle DC che l'adesione fra CASMC e DC mature;
- 5) A seguito della stimolazione delle CASMC sia con atorvastatina (inibitore della HMG-CoA reduttasi) che con rosiglitazone (agonista PPAR $\gamma$ ), si ottiene un'inibizione significativa e dose-dipendente dell'aumento dell'adesione fra DC e CASMC operato dalle citochine;
- 6) DC mature umane sono in grado di stimolare la migrazione di CASMC, effetto che viene potenziato dal pretrattamento delle cellule muscolari con citochine. Le DC, oltre ad essere cellule presentanti l'antigene, possono regolare i processi infiammatori indipendentemente dai meccanismi immunitari adattativi, questo grazie alla loro capacità di stimolare il reclutamento

dei granulociti neutrofili [144], delle cellule natural killer (NK) [145] e mediante la secrezione di IFN di tipo I [146]. Abbiamo precedentemente descritto la presenza fisiologica di iDC, derivate da precursori circolanti, nella parete delle arterie umane e la loro co-localizzazione nella tonaca avventizia con linfociti T, mastociti e cellule muscolari lisce vascolari della neointima sia nelle lesioni aterosclerotiche umane [58-60] che in modelli di arteria carotide di ratto sottoposta a lesione sperimentale [61,62]. Le cellule muscolari lisce migrate nella neointima, come abbiamo visto, possono secernere proteine della matrice extracellulare, interleuchine, chemochine e fattori di crescita, incluso il fattore di crescita tumorale TNF- $\alpha$  e possono diventare inoltre cellule schiumose [147,148]. E' lecito supporre che la loro capacità di interagire con le DC e altre cellule del sistema immunitario giochi un ruolo importante nel mantenere l'infiammazione a livello locale. Tuttavia rimane ancora poco chiaro come le cellule dendritiche vengano reclutate nella lesione vascolare, meccanismo che può avere inizio da un richiamo dei precursori circolanti o dal coinvolgimento delle iDC residenti nella parete arteriosa, o entrambi. Un evento chiave di tale processo può consistere nel reclutamento di cellule infiammatorie o immunitarie da parte dell'endotelio "disfunzionale". E' stato dimostrato infatti che un'alterata funzionalità dell'endotelio stimola l'adesione, la migrazione delle DC attraverso esso [65] e inoltre la loro maturazione, evento che è condiviso anche dalle piastrine [149-151]. Tutti questi fenomeni suggeriscono che ci sia un richiamo nella neointima di DC

che attivandosi e maturando contribuiscono all'inflammation vascolare locale. Dal momento che non ci sono informazioni su come le VSMC possano interagire con altre cellule immunitarie nel contesto della parete vascolare concorrendo in tal modo alla progressione e complicazione dell'ateroma, abbiamo sfruttato un modello sperimentale di inflammation vascolare *in vitro* per studiare il fenomeno. Abbiamo così potuto dimostrare che le DC e CASMC possono interagire reciprocamente. Nel nostro modello *in vitro* di co-coltura nel quale DC mieloidi immature venivano messe in contatto indiretto (mediante la sola condivisione del mezzo di coltura) con CASMC, i fattori solubili che venivano rilasciati dalle cellule muscolari lisce vascolari stimolavano la completa maturazione di queste ultime (ccDC). La maturazione era assolutamente sovrapponibile a quella che si otteneva con protocolli standard per la loro maturazione *in vitro* (mDC). E' stato infatti misurato un aumento del marcatore di maturazione CD83, come delle molecole co-stimolatorie CD80 e CD86 nella popolazione di DC co-coltivata con le CASMC (ccDC) rispetto alle DC immature. Le DC maturate dal mezzo di coltura condiviso, erano inoltre capaci di stimolare la proliferazione di linfociti allogenici in misura sovrapponibile alla capacità delle mDC generate con protocolli standard. E' stato precedentemente dimostrato che le piastrine e le cellule endoteliali sono in grado di attivare e modulare la maturazione delle DC [149-151], rafforzando così l'importante ruolo delle DC e delle loro interazioni a livello della parete vascolare nella progressione di un

microambiente infiammatorio. I risultati che abbiamo ottenuto inoltre suggeriscono che le VSMC possono contribuire a trattenere le DC nella parete arteriosa mediante l'adesione intercellulare. Tale fenomeno infatti è significativamente potenziato sotto stimolazione delle cellule muscolari lisce con citochine infiammatorie. L'aumento dell'adesione delle DC alle CASMC appare essere mediato da una sovra-regolazione delle molecole di adesione ICAM-1 e VCAM-1 nelle CASMC, dal momento che anticorpi monoclonali neutralizzanti sub-unità integriniche dei loro contro-recettori quali anti-CD18 e anti-CD11c riescono a inibire significativamente tale fenomeno. I nostri risultati sono quindi in linea con dati precedenti in letteratura che dimostrano come il reclutamento di DC nella lesione aterosclerotica sia mediato da P- E- selettina e VCAM-1, molecole necessarie per l'adesione all'endotelio attivato [50]. I risultati di microscopia elettronica suggeriscono che l'adesione fra DC e CASMC è di limitata stabilità, perciò non impedisce la conseguente interazione delle DC con altri tipi cellulari. E' stato inoltre già dimostrato che le VSMC contribuiscono a trattenere i monociti e i granulociti neutrofili nella parete vascolare [152] e studi che si sono avvalsi di tecniche di immunistoichimica hanno dimostrato un aumento dell'espressione di ICAM-1 e VCAM-1 nelle tonache media e intima dei vasi aterosclerotici [153,154].

Abbiamo inoltre dimostrato che le DC erano capaci di modulare la funzionalità delle VSMC, dal momento che abbiamo misurato un aumento significativo della migrazione spontanea delle

CASMC in risposta al terreno condizionato proveniente da mDC e ccDC. La migrazione delle VSMC è un processo chiave della formazione della neointima e perciò il suo aumento *in vitro* può essere considerato come un segno di attivazione di queste cellule. Inoltre abbiamo potuto dimostrare che quando le CASMC venivano pretrattate con citochine infiammatorie (i.e. TNF- $\alpha$  e IFN- $\gamma$ ), mimando un ambiente infiammatorio a livello vascolare, la loro capacità di migrare verso il terreno condizionato sia delle mDC che delle ccDC aumentava significativamente. Le citochine infiammatorie possono modulare gli effetti delle interazioni fra DC e CASMC su entrambi i tipi cellulari perpetuando o peggiorando l'infiammazione vascolare locale. Ciò è in linea con dati della letteratura internazionale che dimostrano come la condizione clinica del diabete stimoli il legame dei monociti alle VSMC e la loro differenziazione in macrofagi [138] e che le DC ottenute da pazienti obesi e diabetici, come abbiamo dimostrato nella prima parte dei risultati che abbiamo pubblicato, aumentino significativamente la loro adesione alle CASMC. I dati riportati in questa tesi sono la prima dimostrazione che DC e cellule muscolari lisce coronariche possono stimolarsi reciprocamente e da qui cooperare nell'esacerbare l'infiammazione della parete vascolare. Il pretrattamento delle CASMC con atorvastatina (10 nM-1  $\mu$ M) e rosigitazione (1-20  $\mu$ M) inibisce significativamente l'incremento di adesione delle mDC alle CASMC in risposta alle citochine infiammatorie. La selettività si atorvastatina

su HMGCoA-reduttasi era confermata dall'aggiunta di mevalonato, che revertiva l'effetto della statina.

Le statine, inibitori dell' HMG-CoA reduttasi, sono i principali farmaci utilizzati nel trattamento delle dislipidemie, caratterizzate da alti livelli di LDL-colesterolo. Molti studi hanno dimostrato che questi farmaci posseggono effetti pleiotropici che possono avere un ruolo protettivo nel contesto dell'aterosclerosi, ma che sono indipendenti dal loro principale meccanismo di azione, che consiste nella inibizione della sintesi del colesterolo, bloccando la tappa fondamentale che trasforma la idrossi-metil-glutaril-CoA in mevalonato. Gli effetti pleiotropici delle statine sono probabilmente imputabili alla inibizione della farnesilazione delle proteine Ras/Rac/Rho, come pure all'attivazione dei fattori trascrizionali PPAR [155]. Uno degli effetti protettivi delle statine è senza dubbio il ripristino dell'attività endoteliale della sintasi del nitrossido (eNOS) [156]. Inoltre, effetti antiossidanti (come la diminuita produzione della NADPH ossidasi) portano ad una diminuzione delle specie reattive dell'ossigeno nel torrente circolatorio [157]. E' stato dimostrato che marcatori di infiammazione come la proteina C reattiva e NF-kB sono ridotti dalle statine, portando quindi all'ipotesi che queste ultime posseggano effetti anti-infiammatori [158]. Altri meccanismi proposti includono l'immunomodulazione, la normalizzazione del segnale simpatico, la stabilizzazione della placca aterosclerotica, una diminuita attivazione della cascata della coagulazione e l'inibizione dell'aggregazione piastrinica. La pre-incubazione con statine di DC stimulate con

lipopolisaccaride sopprime significativamente la produzione di citochine pro-infiammatorie, la capacità endocitotica e la capacità di indurre la proliferazione e l'attivazione dei linfociti T [113]. Un ulteriore studio fornisce evidenze cliniche che 20 mg al giorno di atorvastatina per 4 settimane riducono significativamente l'espressione di DC e metalloproteasi nella parete aortica di pazienti sottoposti a replacement dell'aorta addominale [159]. Tutti questi risultati, insieme alla nostra osservazione che le statine inducono una significativa diminuzione dell'adesione di DC mature a CASMC stimulate con citochine infiammatorie, suggeriscono effetti pleiotropici che possono essere indipendenti dalla inibizione delle LDL, ma che possono essere utili per la prevenzione o il trattamento della patologia aterosclerotica [160]. Questi risultati sperimentali precedentemente pubblicati e i risultati presentati in questa tesi di dottorato supportano le evidenze cliniche relative alla diminuzione delle DC nelle lesioni aterosclerotiche in seguito a trattamento dei pazienti con statine [109].

PPAR $\gamma$  è un recettore nucleare che è stato suggerito poter giocare un ruolo protettivo nella patogenesi dell'aterosclerosi. E' stato dimostrato che i ligandi di PPAR $\gamma$  hanno proprietà anti-infiammatorie in molti sistemi *in vitro* e modelli animali *in vivo*. Benché i meccanismi riguardo la regolazione negativa PPAR $\gamma$  mediata della produzione di citochine infiammatorie da parte delle cellule immunitarie non è ancora ben chiara, molte evidenze supportano l'ipotesi di meccanismi trans-repressivi mediante i quali fattori di

trascrizione come NF-kB, NF-AT, Sp1 e AP-1 sono inibiti dal legame con PPAR attivato [161-163]. Infatti, una conseguenza addizionale di questi meccanismi trans-repressivi è che la proliferazione cellulare è rallentata e la produzione autocrina di fattori di crescita come ad esempio IL-2 per i linfociti T è inibita [162]. E' ragionevole supporre che nei nostri modelli sperimentali in vitro, l'inibizione dell'adesione di DC a CASMC osservata in presenza sia di atorvastatina che rosigitazione, sia mediata dall' inibizione dell'espressione di molecole di adesione, notoriamente indotte da NF-kB.

Possiamo concludere che l'ambiente infiammatorio possa stimolare le interazioni fra DC e VSMC in tal modo portando al rimodellamento vascolare. Tali interazioni possono rappresentare un punto di collegamento critico fra l'aterosclerosi e i processi immunologici a livello cellulare. La conoscenza dei ligandi e recettori coinvolti in tali interazioni potrebbero essere proposti come bersagli rilevanti sia per la ricerca di base che per lo sviluppo di nuove strategie terapeutiche al fine di prevenire patologie vascolari e le loro complicazioni.

## BIBLIOGRAFIA

- [1] Mendis S, Puska P, Norrving B. **Global Atlas on Cardiovascular Diseases Prevention and Control**. 2011.
- [2] Dawber TR, Meadors GF, More FE jr. **Epidemiological approaches to heart disease: the Framingham Study**. Am J Public Health Nations Health. 1951;41(3):279-81.
- [3] Wilson PW, D' Agostino RB, Levy D, Belanger AM, Silbershatz H, Kannel WB. **Prediction of coronary heart disease using risk factor categories**. Circulation. 1998;97(18):1837-47.
- [4] Assmann G, Cullen P, Schulte H. **Simple scoring scheme for calculating the risk of acute coronary events based on the 10-year follow-up of the prospective cardiovascular Münster (PROCAM) study**. Circulation. 2002;105(3):310-5.
- [5] Conroy RM, Pyörälä K, Fitzgerald AP, Sans S, Menotti A, De Backer G, De Bacquer D, Ducimetière P, Jousilahti P, Keil U, Njølstad I, Oganov RG, Thomsen T, Tunstall-Pedoe H, Tverdal A, Wedel H, Whincup P, Wilhelmsen L, Graham IM; SCORE project group. **Estimation of ten-year risk of fatal cardiovascular disease in Europe: the SCORE project**. Eur Heart J. 2003;24(11):987-1003.
- [6] Donfrancesco C, Palmieri L, Cooney MT, Vanuzzo D, Panico S, Cesana G, Ferrario M, Pilotto L, Graham IM, Giampaoli S. **Italian cardiovascular mortality charts of the CUORE project: are they comparable with the SCORE charts?** Eur J Cardiovasc Prev Rehabil. 2010;17(4):403-9.
- [7] Jackson R. **Updated New Zealand cardiovascular disease risk-benefit prediction guide**. BMJ. 2000;320:709–10.
- [8] Centers for Disease Control and Prevention (CDC). **Public health focus: physical activity and the prevention of coronary heart disease**. MMWR Morb Mortal Wkly Rep. 1993;42(35):669-72.
- [9] Iliadou A, Snieder H. **Genetic epidemiological approaches in the study of risk factors for cardiovascular disease**. Eur J Epidemiol. 2004;19(3):209-17.
- [10] Grundy SM, Pasternak R, Greenland P, Smith S Jr, Fuster V. **AHA/ACC scientific statement: Assessment of cardiovascular risk by use of multiple-risk-factor assessment equations: a statement**

**for healthcare professionals from the American Heart Association and the American College of Cardiology.** J Am Coll Cardiol. 1999;34(4):1348-59.

[11] Chilton R, Wyatt J, Nandish S, Oliveros R, Lujan M. **Cardiovascular comorbidities of type 2 diabetes mellitus: defining the potential of glucagonlike peptide-1-based therapies.** Am J Med. 2011;124(1):S35-53.

[12] Hotamisiligi GS. **Inflammatory pathways and insulin action.** Int J Obes Relat Metab Disord. 2003;27:S53-5.

[13] **Standard italiani (2009-2010) per la cura del diabete mellito tipo 2.**

[14] Stern MP. **Diabetes and cardiovascular disease. The “common soil” hypothesis.** Diabetes. 1995;44:369-74.

[15] Pi-Sunyer FX. **The obesity epidemic: pathophysiology and consequences of obesity.** Obes Res. 2002;10(2):97S-104S.

[16] Kahn BB, Flier JS. **Obesity and insulin resistance.** J Clin Invest. 2000;106:473-81.

[17] Taddei S, Ghiadoni L, Salvetti G, Virdis A, Salvetti A. **Obesity and endothelial dysfunction.** G Ital Cardiol (Rome). 2006;7(11):715-23.

[18] Gustafson B. **Adipose tissue, inflammation and atherosclerosis.** J Atheroscler Thromb. 2010;17(4):332-41.

[19] Hsueh WA, Quinones MJ. **Role of endothelial dysfunction in insulin resistance.** Am J Cardiol. 2003;92:10J-7J.

[20] Libby P. **Inflammation in atherosclerosis.** Nature. 2002;420:868-74.

[21] Patti G, Melfi R, Di Sciascio G. **The role of endothelial dysfunction in the pathogenesis and in clinical practice of atherosclerosis. Current evidences.** Recent Prog Med. 2005;96(10):499-507.

[22] Luscher TF, Vanhoutte PM. **The endothelium: modulator of cardiovascular function.** Boca Raton, FL: CRC Press. 1990.

[23] Loscalzo J. **Nitric oxide insufficiency, platelet activation, and arterial thrombosis.** Circ Res. 2001;88:756-62.

- [24] Freedman JE, Sauter R, Battinelli EM, Ault K, Knowles C, Huang PL, Loscalzo J. **Deficient platelet-derived nitric oxide and enhanced hemostasis in mice lacking the NOSIII gene.** *Circ Res.* 1999;84:1416-21.
- [25] Hansson GK, Robertson AKL, Soderberg-Naucler C. **Inflammation and Atherosclerosis.** *Annu Rev Pathol Mech Dis.* 2006;1:297-329.
- [26] Zeng G, Nystrom FH, Ravichandran LV, Cong LN, Kirby M, Mostowski H, Quon MJ. **Roles for insulin receptor, PI3-kinase, and Akt in insulin-signaling pathways related to production of nitric oxide in human vascular endothelial cells.** *Circulation.* 2000;101:1539-1545.
- [27] Shankar R, Zhu JS, Ladd B, Henry D, Shen HQ, Baron AD. **Central nervous system nitric oxide synthase activity regulates insulin secretion and insulin action.** *J Clin Invest.* 1998;102:1403-1412.
- [28] Duplain H, Burcelin R, Sartori C, Cook S, Egli M, Lepori M, Vollenweider P, Pedrazzini T, Nicod P, Thorens B, Scherrer U. **Insulin resistance, hyperlipidemia, and hypertension in mice lacking endothelial nitric oxide synthase.** *Circulation.* 2001;104:342-345.
- [29] Balletshofer BM, Rittig K, Enderle MD, Volk A, Maerker E, Jacob S, Matthaei S, Rett K, Häring HU. **Endothelial dysfunction is detectable in young normotensive first-degree relatives of subjects with type 2 diabetes in association with insulin resistance.** *Circulation.* 2000;101:1780-1784.
- [30] Kawano H, Motoyama T, Hirashima O, Hirai N, Miyao Y, Sakamoto T, Kugiyama K, Ogawa H, Yasue H. **Hyperglycemia rapidly suppress flow-mediated endothelium-dependent vasodilatation of brachial artery.** *J Am Coll Cardiol.* 1999;34:146-154.
- [31] Miller AW, Hoenig ME, Ujhelyi MR. **Mechanisms of impaired endothelial function associated with insulin resistance.** *J Cardiovasc Pharmacol Ther.* 1998;3:125-134.
- [32] Hirashima O, Kawano H, Motoyama T, Hirai N, Ohgushi M, Kugiyama K, Ogawa H, Yasue H. **Improvement of endothelial function and insulin sensitivity with vitamin C in patients with coronary spastic angina: possible role of reactive oxygen species.** *J Am Coll Cardiol.* 2000;35:1860-1866.

- [33] Osei K. **Insulin resistance and systemic hypertension.** Am J Cardiol. 1999;84:33J-36J.
- [34] McLaughlin T, Reaven G. **Insulin resistance and hypertension. Patients in double jeopardy for cardiovascular disease.** Geriatrics. 2000;55:28-32,35.
- [35] Arcaro G, Cretti A, Balzano S, Lechi A, Muggeo M, Bonora E, Bonadonna RC. **Insulin causes endothelial dysfunction in humans: sites and mechanisms.** Circulation. 2002;105:576-582.
- [36] Curfs JHAJ, Meis JFGH, Hoogkamp-Korstanje JAA. **A primer on cytokines: sources, receptors, effects and inducers.** Clin. Microbiol. Rev. 1997;10(4):742-780.
- [37] Aggarwal B.B., Puri R.K. **Common and uncommon features of cytokine and cytokine receptors: an overview.** In : **Human Cytokines: Their Role in Disease and Therapy.** Cambridge, MA: Blackwell Science. 1995;pp 3-24.
- [38] Brook RD. **Obesity, weight loss, and vascular function.** Endocrine. 2006;29:21-5.
- [39] Kershaw EE, Flier JS. **Adipose tissue as an endocrine organ.** J Clin Endocrinol Metab. 2004; 89:2548-56.
- [40] Bouloumie A, Marumo T, Lafontan M, Busse R. **Leptin induce oxidative stress in human endothelial cells.** FASEB J. 1999;13:1231-8.
- [41] Bullo M, Garcia-Lorda P, Megias I, Salas-Salvado J. **Systemic inflammation, adipose tissue tumor necrosis factor, and leptin expression.** Obes Res. 2003;11:525-31.
- [42] Lembo G, Vecchione C, Fratta L, Marino G, Trimarco V, d'Amati G, Trimarco B. **Leptin induces direct vasodilation through distinct endothelial mechanisms.** Diabetes. 2000;49:293-7.
- [43] Vecchione C, Maffei A, Colella S, Aretini A, Poulet R, Frati G, Gentile MT, Fratta L, Trimarco V, Trimarco B, Lembo G. **Leptin effect on endothelial nitric oxide is mediated through Akt-endothelial nitric oxide synthase phosphorylation pathway.** Diabetes. 2002;51:168-73.
- [44]. Steppan CM, Brown EJ, Wright CM, Bhat S, Banerjee RR, Dai CY, Enders GH, Silberg DG, Wen X, Wu GD, Lazar MA. **A family of tissue-specific resistin-like molecules.** Proc Natl Acad Sci USA. 2001;98:502-6.

- [45]. Verma S, Li SH, Wang CH, Fedak PW, Li RK, Weisel RD, Mickle DA. **Resistin promotes endothelial cell activation: further evidence of adipokine-endothelial interaction.** *Circulation.* 2003;108:736-40.
- [46] Matsuzawa Y, Funahashi T, Kihara S, Shimomura I. **Adiponectin and metabolic syndrome.** *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2004;24:29-33.
- [47] Chen H, Montagnani M, Funahashi T, Shimomura I, Quon MJ. **Adiponectin stimulates production of nitric oxide in vascular endothelial cells.** *J Biol Chem.* 2003;278:45021-6.
- [48] Ouchi N, Ohishi M, Kihara S, Funahashi T, Nakamura T, Nagaretani H, Kumada M, Ohashi K, Okamoto Y, Nishida K, Maeda N, Nagasawa A, Kobayashi H, Hiraoka H, Komai N, Kaibe M, Rakugi H, Ogihara T, Matsuzawa Y. **Association of hypoadiponectinemia with impaired vasoreactivity.** *Hypertension.* 2003;42:231-4.
- [49] Heeneman S, Sluimer JC, Daemen MJAP. **Angiotensin-Converting Enzyme and Vascular Remodeling.** *Circ Res.* 2007;101:441-454
- [50] Niessner A, Weyand CM. **Dendritic cells in atherosclerotic disease.** *Clin Immunol.* 2010;134:25-32.
- [51] Esteban V, Méndez-Barbero N, Jiménez-Borreguero LJ, Roqué M, Novensá L, García-Redondo AB, Salaices M, Vila L, Arbonés ML, Campanero MR, Redondo JM. **Regulator of calcineurin 1 mediates pathological vascular wall remodeling.** *J Exp Med.* 2011;208(10):2125-39.
- [52] Baumbach GL, Heistad DD. **Remodeling of cerebral arterioles in chronic hypertension.** *Hypertension.* 1989;13:968–972.
- [53] Libby P. **Inflammation and cardiovascular disease mechanisms.** *Am J Clin Nutr.* 2006;83:456S-460S.
- [54] Folkow B. **Physiological aspects of primary hypertension.** *Physiol Rev.* 1982;62:347–504.
- [55] Mulvany MJ, Baumbach GL, Aalkjaer C, Heagerty AM, Korsgaard N, Schiffrin EL, Heistad DD. **Vascular remodeling.** *Hypertension.* 1996; 28:505–506.
- [56] Korner PI, Angus JA. **Vascular remodeling.** *Hypertension.* 1997;29:1065–1066.

- [57] Wick G, Romen M, Amberger A, Metzler B, Mayr M, Falkensammer G, Xu Q. **Atherosclerosis, autoimmunity, and vascular-associated lymphoid tissue.** FASEB J. 1997;11:1199-1207.
- [58] Bobryshev YV, Lord RS. **Ultrastructural recognition of cells with dendritic cell morphology in human aortic intima. Contacting interactions of Vascular Dendritic Cells in atherosclerotic and atherosclerotic-prone areas of the normal aorta.** Arch Histol Cytol. 1995;58:307-322.
- [59] Bobryshev YV, Lord RS. **Mapping of vascular dendritic cells in atherosclerotic arteries suggests their involvement in local immune-inflammatory reactions.** Cardiovasc Res. 1998;37:799-810.
- [60] Bacci S, Pieri L, Buccoliero AM, Bonelli A, Taddei G, Romagnoli P. **Smooth muscle cells, dendritic cells and mast cells are sources of TNF- $\alpha$  and nitric oxide in human carotid artery atherosclerosis.** Thromb Res. 2008;122:657-667.
- [61] Rinaldi B, Romagnoli P, Bacci S, Carnuccio R, Maiuri MC, Donniacuo M, Capuano A, Rossi F, Filippelli A. **Inflammatory events in a vascular remodeling model induced by surgical injury to the rat carotid artery.** Br J Pharmacol. 2006;147:175-182.
- [62] Pieri L, Rinaldi B, Domenici L, Bacci S, Filippelli A, Capuano A, Rossi F, Romagnoli P. **Blood-borne cells involved in arterial repair upon experimental incision injury.** Histol Histopathol. 2008;23:19-32.
- [63] Schwartz SM, Majesky MW, Murry CE. **The intima: development and monoclonal responses to injury.** Atherosclerosis. 1995;118:S125-S140.
- [64] Hirase T, Node K. **Endothelial dysfunction as a cellular mechanism for vascular failure.** Am J Physiol Heart Circ Physiol. 2012;302:H499-505.
- [65] Weis M, Schlichting CL, Engleman EG, Cooke JP. **Endothelial determinants of dendritic cell adhesion and migration: new implications for vascular diseases.** Arterioscler Thromb Vasc Biol. 2002;22:1817-1823.
- [66] Tedgui A, Mallat Z. **Cytokines in atherosclerosis: pathogenic and regulatory pathways.** Physiol Rev. 2006;86:515-581.
- [67] Weber C, Zernecke A, Libby P. **The multifaceted contributions of leukocyte subsets to atherosclerosis: lessons from mouse models.** Nat Rev Immunol. 2008;8:802-815.

- [68] Mantovani A, Bussolino F, Dejana E. **Cytokine regulation of endothelial cell function.** *FASEB J.* 1992;6:2591-2599.
- [69] Kleinbongard P, Heusch G, Schulz R. **TNF- $\alpha$  in atherosclerosis, myocardial ischemia/reperfusion and heart failure.** *Pharmacol Ther.* 2010;127:295-314.
- [70] Komarova Y, Malik AB. **Regulation of endothelial permeability via paracellular and transcellular transport pathways.** *Annu Rev Physiol.* 2010;72:463-493.
- [71] Drechsler M, Megens RTA, van Zandvoort M, Weber C, Soehnlein O. **Hyperlipidemia-triggered neutrophilia promotes early atherosclerosis.** *Circulation.* 2010;122:1837-1845.
- [72] Sun C, Wu MH, Yuan SY. **Nonmuscle myosin light-chain kinase deficiency attenuates atherosclerosis in apolipoprotein E-deficient mice via reduced endothelial barrier dysfunction and monocyte migration.** *Circulation.* 2011;124:48-57.
- [73] Wuttge DM, Zhou X, Sheikine Y, Wagsater D, Stemme V, Hedin U, Stemme S, Hansson GK, Sirsjo A. **CXCL16/SR-PSOX is an interferon- $\gamma$ -regulated chemokine and scavenger receptor expressed in atherosclerotic lesions.** *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2004;24:750-755.
- [74] Shashkin P, Dragulev B, Ley K. **Macrophage differentiation to foam cells.** *Curr Pharm Des.* 2005;11:3061-3072.
- [75] Van Brussel I, Van Vré EA, De Meyer GRY, Vrints CJ, Bosmans JM, Bult H. **Expression of dendritic cell markers CD11c/BDCA-1 and CD123/BDCA-2 in coronary artery disease upon activation in whole blood.** *J of Imm Methods.* 2010;362:168-175.
- [76] Yin K, Liao DF, Tang CK. **ATP-binding membrane cassette transporter A1 (ABCA1): a possible link between inflammation and reverse cholesterol transport.** *Mol Med.* 2010;16:438-449.
- [77] Mallat Z, Tedgui A. **Current perspective on the role of apoptosis in atherothrombotic disease.** *Circ Res.* 2001;88:998-1003.
- [78] Tabas I. **Consequences and therapeutic implications of macrophage apoptosis in atherosclerosis: the importance of lesion stage and phagocytic efficiency.** *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2005;25:2255-2264.
- [79] Clarke MC, Figg N, Maguire JJ, Davenport AP, Goddard M, Littlewood TD, Bennett MR. **Apoptosis of vascular smooth muscle**

**cells induces features of plaque vulnerability in atherosclerosis.** Nat Med. 2006;12:1075-1080.

[80] Stoneman VE, Bennett MR. **Role of Fas/Fas-L in vascular cell apoptosis.** J Cardiovasc Pharmacol. 2009;53:100-108.

[81] Newby AC. **Dual role of matrix metalloproteinases (matrixins) in intimal thickening and atherosclerotic plaque rupture.** Physiol Rev. 2005;85:1-31.

[82] Amento EP, Ehsani N, Palmer H, Libby P. **Cytokines and growth factors positively and negatively regulate interstitial collagen gene expression in human vascular smooth muscle cells.** Arterioscler Thromb. 1991;11:1223-1230.

[83] Newby AC. **Metalloproteinase expression in monocytes and macrophages and its relationship to atherosclerotic plaque instability.** Arterioscler Thromb Vasc Biol. 2008;28:2108-2114.

[84] Shimizu K, Shichiri M, Libby P, Lee RT, Mitchell RN. **Th2-predominant inflammation and blockade of IFN- $\gamma$  signaling induce aneurysms in allografted aortas.** J Clin Invest. 2004;114:300-308.

[85] Esmon CT. **The impact of the inflammatory response on coagulation.** Thromb Res. 2004;114:321-327.

[86] Kruithof EK. **Regulation of plasminogen activator inhibitor type 1 gene expression by inflammatory mediators and statins.** Thromb Haemost. 2008;100:969-975.

[87] Keaney JF Jr. **Immune Modulation of Atherosclerosis.** Circulation. 2011;124:e559-e560.

[88] Oufella HA, Taleb S, Mallat Z, Tedgui A. **Recent Advances on the Role of Cytokines in Atherosclerosis.** Arterioscler Thromb Vasc Biol. 2011;31:969-979

[89] Zhou X, Nicoletti A, Elhage R, Hansson GK. **Transfer of CD4(+) T cells aggravates atherosclerosis in immunodeficient apolipoprotein E knockout mice.** Circulation. 2000;102:2919-2922.

[90] Gotsman I, Grabie N, Gupta R, Dacosta R, MacConmara M, Lederer J, Sukhova G, Witztum JL, Sharpe AH, Lichtman AH. **Impaired regulatory T-cell response and enhanced atherosclerosis in the absence of inducible costimulatory molecule.** Circulation. 2006;114:2047-2055.

- [91] Heller EA, Liu E, Tager AM, Yuan Q, Lin AY, Ahluwalia N, Jones K, Koehn SL, Lok VM, Aikawa E, Moore KJ, Luster AD, Gerszten RE. **Chemokine CXCL10 promotes atherogenesis by modulating the local balance of effector and regulatory T cells.** *Circulation*. 2006;113:2301-2312.
- [92] Maganto-García E, Tarrío ML, Grabie N, Bu D-X, Lichtman AH. **Dynamic changes in regulatory T cells are linked to levels of diet-induced hypercholesterolemia.** *Circulation*. 2011;124:185-195.
- [93] Luchtefeld M, Grothusen C, Gagalick A, Jagavelu K, Schuett H, Tietge UJF, Pabst O, Grote K, Drexler H, Förster R, Schieffer B. **Chemokine receptor 7 knockout attenuates atherosclerotic plaque development.** *Circulation*. 2010;122:1621-1628.
- [94] Lipsocomb M, Masten BJ. **Dendritic cells: immune regulators in the health and disease.** *Physical Rev*. 2002;82:97-130,
- [95] Granucci F, Zanoni I, Ricciardi-Castagnoli F. **Central role of dendritic cells in the regulation and deregulation of immune responses.** *Cell Mol Life Sci*. 2008;65:1683-1697.
- [96] Lotze MT, Thomson AW. **Dendritic cells: Biology and Clinical Applications.** 2<sup>nd</sup> ed. San Diego, CA: Academic Press. 2001;547-557.
- [97] Merad M, Ginhoux F., Colin M. **Origin homeostasis and functions of Langerhans cells and other langerin-expressing dendritic cells.** *Nat Rev Immunol*. 2008;8:935-947.
- [98] Bobryshev YV, Ikezawa T, Watanabe T. **Formation of Birbeck granule-like structures in vascular dendritic cells in human atherosclerotic aorta.** *Atherosclerosis*. 1997;133:193-202.
- [99] Chen BY, Tie R., Qu P, Yu J. **Vasonatin peptide, a new regulator of adiponectin and interleukin-6 production in adipocytes.** *JEL*. 2011;34(10):742-746.
- [100] Dongiovanni P, Ruscica M, La Spina S, Steffani L, Borroni V. **Iron overload induces visceral adipose tissue insulin resistance.** 15<sup>th</sup> International & 14<sup>th</sup> European Congress of Endocrinology. *Endocrine Abstract*. 2012;Vol. 29.
- [101] Banchereau J, Steiman RM. **Dendritic cells and control of immunity.** *Nature*. 1998;392:245-252.

- [102] De Jong EC, Smits HH, Kapsenberg ML. **Dendritic cell-mediated T cell polarization.** Springer Semin. Immunopathol. 2005;26:289-307.
- [103] Manirarora JN, Parnell SA, Hu YH, Kosiewicz MM. **TRAL-expressing T-cells induce apoptosis of vascular smooth muscle cells in the atherosclerotic plaque.** J Exp Med. 2006;203:239-250.
- [104] Erbel C, Sato K, Meyer FB, Kopecky SL, Frye RL, Goronzy JJ, Weyand CM. **Functional profile of activated dendritic cells in unstable atherosclerotic plaque.** Basic Res Cardiol. 2007;102(2):123-32.
- [105] Yilmaz A, Weber J, Cicha I, Stumpf C, Klein M, Raithel D, Daniel WG, Garlachs CD. **Decrease in circulating myeloid dendritic cells precursors in coronary artery disease.** J Am Coll Cardiol. 2006;48:70-80.
- [106] Seavey MM, Dobzanski P. **The many faces of Janus kinase.** Biochem Pharmacol. 2012;83(9):1136-45.
- [107] Bobryshev YV. **Dendritic cells in atherosclerosis: current status of the problem and clinical relevance.** Eur Heart J. 2005;26:1700-1704.
- [108] Bobryshev YV, Lord RSA. **Expression of heat shock protein-70 by dendritic cells in the arterial intima and its potential significance in atherogenesis.** J Vas Surg. 2002;35:368-375.
- [109] Yilmaz A, Lochno M, Traeg F, Cicha I, Reiss C, Stumpf C, Raaz D, Anger T, Amann K, Probst T, Ludwig J, Daniel WG, Garlachs CD. **Emergence of dendritic cells in rupture-prone regions of vulnerable carotid plaques.** Atherosclerosis 2004;176:101-110.
- [110] Manirarora JN, Parnell SA, Hu YH, Kosiewicz MM. **TRAL-expressing T-cells induce apoptosis of vascular smooth muscle cells in the Atherosclerotic plaque.** J Exp Med. 2006;203:239-250, 2006.
- [111] Shi H, Ge J, Fang W, Yao K, Sun A, Huang R, Jia Q, Wang K, Zou Y, Cao X. **Peripheral-blood dendritic cells in men with coronary heart disease.** Am J Cardiol. 2007;100(4):593-7.
- [112] Van Vre EA, Van Brussel I, Op de Beeck K, Hoymans VY, Vrints CJ, Bult H, Bosmans JM. **Changes in blood dendritic cell counts in relation to type of coronary artery disease and brachial endothelial cell function.** Coronar Art Disease. 2010;21:87-96.

[113] Yilmaz A, Reiss C, Weng A, Cicha I, Stumpf C, Steinkasserer A, Daniel WG, Garlich CD. **Differential effects of statins on relevant functions of human monocyte-derived Dendritic cells.** J Leukoc Biol. 2006;79:529-538.

[114] Manirarora JN, Parnell SA, Hu YH, Kosiewicz MM **NOD dendritic cells stimulated with lactobacilli preferentially produce IL-10 vs. IL-12 and decrease diabetes incidence.** Clin Dev Immunol. 2011;2011:630187.

[115] Saxena V, Ondr JK, Magnusen AF, Munn DH, Katz JD **The countervailing action of myeloid and plasmacytoid dendritic cells control autoimmune diabetes in the non-obese diabetic mouse.** The Journal of immunology. 2007;179:5041-5053.

[116] Surendar J, Mohan V, Pavankumar N, Babu S, Aravindhan V. **Increased levels of serum granulocyte-macrophage colony-stimulating factor is associated with activated peripheral dendritic cells in type 2 diabetes subjects (CURES-99).** Diabetes Technol Ther. 2012;14(4):344-9.

[117] Sharma MD, Baban B, Chandler P, How DY, Singh N, Yagita H, Azuma M, Blazar BR, Mello AL, Munn DH. **Plasmacytoid dendritic cells from mouse tumor-draining lymph nodes directly activate mature Tregs via indoleamine 2,3-dioxygenase.** J Clin Invest. 2007;117:2570-2582.

[118] Allen JS, Pang K, Skowera A, Ellis R, Rackham C, Lozanoska-Ochser B, Tree T, Leslie RDG, Tremble JM, Dayan CM, Peakman M. **Plasmacytoid dendritic cells are proportionally expanded at diagnosis of Type 1 Diabetes and enhance islet autoantigen presentation to T-cells through immune complex capture.** Diabetes. 2009;58(1):138-145.

[119] Summers KL, Behme MT, Mahon JL, Singh B. **Characterization of Dendritic Cells in Humans with Type 1 Diabetes.** Ann N Y Acad Sci. 2003;1005:226-9.

[120].Chen X, Makala LH, Jin Y, Hopkins D, Muir A, Garge N, Podolsky RH, She JX. **Type 1 diabetes patients have significantly lower frequency of plasmacytoid dendritic cells in the peripheral blood** Clin Immunol. 2008;129(3):413-418.

[121] Rubak E, Smolewski P, Wozniacka A, Sysa-Jedrzejowska A, Stepień H, Robak T. **Relationship between peripheral blood dendritic cells and cytokines involved in the pathogenesis of**

**systemic lupus erythematosus.** Eur Cytokine Netw. 2004;15:222-230.

[122] Ruffner MA, Robbins PD. **Dendritic cells transduced to express interleukin 4 reduce diabetes onset in both normoglycemic and prediabetic nonobese diabetic mice.** PLoS One. 2010;5(7):e11848.

[123] Corrales JJ., Almeida M., Brugo RM., Hernandez P, Miralles JM, Orfao A. **Decreased production of inflammatory cytokines by circulating monocytes and dendritic cells in type 2 diabetic men with atherosclerotic complication.** J Diabetes Complications. 2007;21(1):41-49.

[124] Blank EE, Johnson EC, Weeks DK, Wysham CH. **Circulating dendritic cells number and intracellular TNF- $\alpha$  production in women with type 2 diabetes.** Acta Diabetol. 2012;49(1):25-32.

[125] Blanco P, Paluska A, Pascual V, Banchereau J. **Dendritic cells and cytokine in human inflammatory and autoimmune disease.** Cytokine Growth Factor Rev. 2008;19:41-52.

[126] Thompson PW, Bayliffe AI, Warren AP, Lamb JR. **Interleukin-10 is upregulated by nanomolar rosiglitazone treatment of mature dendritic cells and human CD4<sup>+</sup> Tcells.** Cytokine. 2007;39(3):184-91.

[127] Angeli V, Hammad H, Staels B, Capron M, Lambrecht BN, Trottein F. **Peroxisome proliferator-activated receptor gamma inhibits the migration of dendritic cells: consequences for the immune response.** J Immunol. 2003;170(10):5295-301.

[128] Carreño LJ, Riedel CA, Kalergis AM. **Induction of tolerogenic dendritic cells by NF- $\kappa$ B blockade and Fc $\gamma$  receptor modulation.** Methods Mol Biol. 2011;677:339-53.

[129] Luo Y, Liang C, Xu C, Jia Q, Huang D, Chen L, Wang K, Wu Z, Ge J. **Ciglitazone inhibits oxidized-low density lipoprotein induced immune maturation of dendritic cells.** J CardiovascPharmacol. 2004;44:381-385.

[130] Faveeuw C, Fougeray S, Angeli V, Fontaine J, Chinetti G, Gosset P, Delerive P, Maliszewski C, Capron M, Staels B, Moser M, Trottein F. **Peroxisome proliferator-activated receptor gamma activators inhibit interleukin-12 production in murine dendritic cells.** FEBS Lett. 2000;486(3):261-6.

[131] Giampaoli S, Palmieri L, Chiodini P, Cesana G, Ferrario M, Panico S, Pilotto L, Sega R, Vanuzzo D; Gruppo di Ricerca del

Progetto CUORE. **The global cardiovascular risk chart.** Ital Heart J Suppl. 2004;5(3):177-85.

[132] Musilli C, Paccosi S, Pala L, Gerlini G, Ledda F, Mugelli A, Rotella CM, Parenti A. **Characterization of circulating and monocyte-derived dendritic cells in obese and diabetic patients.** Mol Immunol. 2011;49(1-2):234-8.

[133] Bellik L, Gerlini G, Parenti A, Ledda F, Pimpinelli N, Neri B, Pantalone D. **Role of conventional treatments on circulating and monocyte-derived dendritic cells in colorectal cancer.** Clin Immunol. 2006;121:74-80.

[134] Miltenyi, S., Muller, W., Weichel, W., Radbruch, A. **High gradient magnetic cell separation with MACS.** Cytometry. 1990; 11: 231-238.

[135] Parenti A, Bellik L, Brogelli L, Filippi S, Ledda F. **Endogenous VEGF-A is responsible for the mitogenic effect of monocyte chemotactic protein-1 on vascular smooth muscle cells.** Am J Physiol Heart Circ Physiol. 2004;286:H1978-H1984.

[136] Gerlini G, Mariotti G, Chiarugi A, Di Gennaro P, Caporale R, Parenti A, Cavone L, Tun-Kyi A, Prignano F, Saccardi R, Borgognoni L, Pimpinelli N. **Induction of CD83<sup>+</sup>CD14<sup>+</sup> nondendritic antigen-presenting cells by exposure of monocytes to IFN- $\alpha$ .** J Immunol. 2008;181:2999-3008.

[137] Seifarth CC, Hinkmann C, Hahn EG, Lohmann T, Harsch IA. **Reduced frequency of peripheral dendritic cells in type 2 diabetes.** Exp Clin Endocrinol Diabetes. 2008;116:162-166.

[138] Meng L, Park J, Cai Q, Lanting L, Reddy MA, Natarajan R. **Diabetic conditions promote binding of monocytes to vascular smooth muscle cells and their subsequent differentiation.** Am J Physiol Heart Circ Physiol. 2010;298:H736-745.

[139] Andersson CX, Gustafson B, Hammarstedt A, Hedjazifar S, Smith U. **Inflamed adipose tissue, insulin resistance and vascular injury.** Diabetes Metab Res Rev. 2008; 24:595-603.

[140] Ford ES, Williamson DF, Liu S. **Weight change and diabetes incidence: findings from a national cohort of US adults.** Am J Epidemiol. 1997;146:214-222.

[141] Ishizaka N, Ishizaka Y, Takahashi E, Unuma T, Tooda E, Nagai R, Togo M, Tsukamoto K, Hashimoto H, Yamakado M. **Association**

**between insulin resistance and carotid arteriosclerosis in subjects with normal fasting glucose and normal glucose tolerance.** Arterioscler Thromb Vasc Biol. 2003;23:295-301.

[142] Ausk HJ, Boyko EJ, Ioannou GN. **Insulin resistance predicts mortality in nondiabetic persons in the U.S.** Diabetes Care. 2010;33:1179-1185.

[143] Dzionek A, Fuchs A, Schmidt P, Cremer S, Zysk M, Miltenyi S, Buck DW, Schmitz J. **BDCA-2, BDCA-3, and BDCA-4: Three Markers for Distinct Subsets of Dendritic Cells in Human Peripheral blood.** J Immunol. 2000;165:6037-6046.

[144] Scimone ML, Lutzky VP, Zittermann SI, Maffia P, Jancic C, Buzzola F, Issekutz AC, Chuluyan HE. **Migration of polymorphonuclear leucocytes is influenced by dendritic cells.** Immunology 2005;114:375-385.

[145] Moretta L, Ferlazzo G, Mingari MC, Melioli G, Moretta A. **Human natural killer cell function and their interactions with dendritic cells.** Vaccine. 2003;21:S38-S42.

[146] Kaway T, Akira S. **Innate immune recognition of viral infection.** Nat Immunol. 2006;7:131-137.

[147] Singer CA, Salinthon S, Baker KJ, Gerthoffer WT. **Synthesis of immune modulators by smooth muscles.** Bioessays. 2004;26:646-655.

[148] Dorweiler B, Torzewski M, Dahm M, Ochsenhirt V, Lehr HA, Lackner KJ, Vahl CF. **A novel in vitro model for the study of plaque development in atherosclerosis.** Thromb Haemost. 2006;95:182-189.

[149] Manna PP, Duffy B, Olack B, Lowell J, Mohanakumar T. **Activation of human dendritic cells by porcine aortic endothelial cells: transactivation of naïve T cells through costimulation and cytokine generation.** Transplantation. 2001;72:1563-1571.

[150] Methe H, Hess S, Edelman ER. **Endothelial cell-matrix interactions determine maturation of dendritic cells.** Eur J Immunol. 2007;37:1773-1784.

[151] Langer HF, Daub K, Braun G, Schönberger T, May AE, Schaller M, Stein GM, Stellos K, Buelmann A, Siegel-Axel D, Wendel HP, Aebert H, Roecken M, Seizer P, Santoso S, Wesselborg S, Brossart P, Gawaz M. **Platelets recruit human dendritic cells via Mac-1/JAM-C interaction and modulate dendritic cell function in vitro.** Arterioscler Thromb Vasc Biol. 2007;27:1463-1470.

- [152] Wang X, Feuerstein GZ, Gu JL, Lysko PG, Yue TL. **Interleukin-1 beta induces expression of adhesion molecules in human vascular smooth muscle cells and enhances adhesion of leukocytes to smooth muscle cells.** *Atherosclerosis*. 1995;115:89-98.
- [153] Davies MJ, Gordon JL, Gearing AJ, Pigott R, Woolf N, Katz D, Kyriakopoulos A. **The expression of the adhesion molecules ICAM-1, VCAM-1, PECAM, and E-selectin in human atherosclerosis.** *J Pathol*. 1993;171:223-229.
- [154] Fotis L, Agrogiannis G, Vlachos IS, Pantopoulou A, Margoni A, Kostaki M, Verikokos C, Tzivras D, Mikhailidis DP, Perrea D. **Intercellular adhesion molecule (ICAM)-1 and vascular cell adhesion molecule (VCAM)-1 at the early stages of atherosclerosis in a rat model.** *In Vivo*. 2012;26:243-250.
- [155] Arnaud C, Braunersreuther V, Mach F. **Toward immunomodulatory and anti-inflammatory properties of statins.** *Trends Cardiovasc Med*. 2005;15:202-206.
- [156] Liao JK. **Beyond lipid lowering: the role of statins in vascular protection.** *Int J Cardiol*. 2002;86:5-18.
- [157] Endres M. **Statins and stroke.** *J Cereb Blood Flow Metab*. 2005;25:1093-1110.
- [158] Li J, Li JJ, He JG, Nan JL, Guo YL, Xiong CM. **Atorvastatin decreases C-reactive protein-induced inflammatory response in pulmonary artery smooth muscle cells by inhibiting nuclear factor-kappa B pathway.** *Cardiovasc Ther*. 2010;28,8-14.
- [159] Kajimoto K, Miyauchi K, Kasai T, Shimada K, Kojima Y, Shimada A, Niinami H, Amano A, Daida H. **Short-term 20mg atorvastatin therapy reduces key inflammatory factors including c-Jun N-terminal kinase and dendritic cells and matrix metalloproteinase expression in human abdominal aortic aneurysmal wall.** *Atherosclerosis*. 2009;206:505-511.
- [160] Feig JE, Feig JL. **Macrophages, dendritic cells, and regression of atherosclerosis.** *Front Physiol*. 2012;3:286.
- [161] Wang P, Anderson PO, Chen S, Paulsson KM, Sjogren HO, Li S. **Inhibition of the transcription factors AP-1 and NF-kappaB in CD4 T cells by peroxisome proliferator-activated receptor gamma ligands.** *Int Immunopharmacol*. 2001;1:803-12.
- [162] Yang XY, Wang LH, Chen T, Hodge DR, Resau JH, DaSilva L, Farrar WL. **Activation of human T lymphocytes is inhibited by**

**peroxisomeproliferator-activated receptor gamma (PPARgamma) agonists. PPARgamma co-association with transcription factor NFAT.** J Biol Chem. 2000;275:4541-4.

[163] Sugawara A, Uruno A, Kudo M, Ikeda Y, Sato K, Taniyama Y, Ito S, Takeuchi K. **Transcription suppression of thromboxane receptor gene by peroxisome proliferator-activated receptor-gamma via an interaction with Sp1 in vascular smooth muscle cells.** J Biol Chem. 2002;277:9676-83.