



UNIVERSITÀ
DI PAVIA

DIPARTIMENTO DI SCIENZE DEL
FARMACO

Direttore Chiar.ma Prof.ssa Simona Collina

**LAUREA MAGISTRALE A CICLO UNICO IN
CHIMICA E TECNOLOGIA FARMACEUTICHE**

***Drug repurposing* nel trattamento della retinopatia diabetica:
focus su teniposide**

Relatore: Prof.ssa Alessia Angela Pascale

Tesi di Laurea Magistrale a Ciclo Unico di

Alessandra Cravero

Anno Accademico 2024/2025

INDICE

RIASSUNTO	3
1.INTRODUZIONE	5
1.1 DIABETE MELLITO	5
1.1.1 Insulina.....	6
1.1.2 Classificazione e trattamenti	9
1.2 LA RETINA	14
1.3 RETINOPATIA DIABETICA	18
1.3.1 Patogenesi e meccanismi molecolari.....	21
1.3.2 Screening e attuali terapie	25
1.4 VEGF	28
1.4.1 Cascata PKC β II/HuR/VEGF.....	32
1.5 RECETTORE P2X7	34
1.6 DRUG REPURPOSING DI TENIPOSIDE	38
2. SCOPO DEL LAVORO	42
3. MATERIALI E METODI	44
3.1 Colture cellulari e trattamenti <i>in vitro</i>	44
3.2 Saggio MTT.....	45
3.3 Preparazione ed omogenizzazione dei campioni.....	46
3.4 <i>Western blotting</i>	47
3.5 Test ELISA	50
3.6 Immunoprecipitazione	51
3.7 Analisi statistica.....	52
4. RISULTATI	53
4.1 Studi <i>in silico</i>	53
4.2 Studi <i>in vitro</i>	55
5. DISCUSSIONE	61
6. BIBLIOGRAFIA	65

RIASSUNTO

Il diabete mellito rappresenta una delle sfide sanitarie più critiche a livello globale, con una stima di almeno 529 milioni di persone affette. Tale disordine metabolico sistemico determina gravi ripercussioni sulla qualità della vita; in particolare, il 96% dei casi è riconducibile al diabete di tipo 2, sostenuto principalmente da stili di vita sedentari e regimi alimentari scorretti. Il diabete mellito è associato a complicanze macrovascolari, prevalentemente cardiovascolari, e microvascolari, fra cui nefropatia, neuropatia e, in particolare, retinopatia diabetica (RD). Quest'ultima costituisce la principale causa di disabilità visiva nella popolazione in età lavorativa. Studi recenti hanno ridefinito la RD non più esclusivamente come complicanza vascolare, ma come una complessa patologia neurodegenerativa. L'iperglicemia cronica provoca infatti danni ai neuroni retinici mediati da stress ossidativo, infiammazione, accumulo di prodotti finali di glicazione avanzata e attivazione di vie metaboliche aberranti. Tali processi convergono nell'aumento della permeabilità vascolare e nella neoangiogenesi patologica, sostenuti principalmente dalla sovraespressione del fattore di crescita vascolare VEGF. Sebbene i trattamenti attuali (iniezioni intravitreali di anti- VEGF, fotocoagulazione laser e vitrectomia) siano efficaci, risultano però invasivi e costosi nonché limitati alle fasi avanzate della patologia.

Il presente lavoro di tesi mira a individuare nuove strategie neuroprotettive per le fasi precoci (non proliferanti) della patologia, in modo da contrastare il danno neuronale che precede quello vascolare. Il bersaglio molecolare individuato è il recettore purinergico P2X7 (P2X7R), un recettore ionotropico la cui sovraespressione promuove la rottura della barriera emato-retinica, la disfunzione dei periciti e il rilascio di mediatori dell'infiammazione, incluso VEGF. Per accelerare l'iter terapeutico, è stata adottata la strategia del *drug repurposing*. Gli studi iniziali *in silico* (*virtual screening*, *docking* molecolare e calcoli di *binding free energy*) hanno permesso di selezionare teniposide, un agente antitumorale, fra le molecole che mostravano affinità per P2X7R. Tale scelta è stata poi confermata da saggi funzionali sullo ione calcio. L'obiettivo successivo è stato quello di esaminare se teniposide fosse in grado di interferire con l'attivazione della cascata PKC β II/HuR coinvolta nella produzione anomala di VEGF nella RD. A tale scopo, sono stati condotti studi *in vitro* su cellule endoteliali (HUVEC) trattate con forbolo-12-miristato-13-acetato (PMA) al fine di mimare l'attivatore fisiologico di

PKC β II, diacilglicerolo, che viene prodotto in eccesso in condizioni di iperglicemia. I risultati ottenuti dimostrano l'efficacia di teniposide nel contrastare l'incremento di VEGF, attraverso l'inibizione della cascata PKC β II/HuR, che si osserva in condizioni di iperglicemia. Inoltre, teniposide è in grado di sopprimere l'aumento dell'espressione proteica di P2X7R indotta da PMA, verosimilmente attraverso l'inibizione della stessa cascata PKC β II/HuR. Nel complesso, i dati ottenuti suggeriscono un potenziale impiego di teniposide nel prevenire, nella retina, l'attivazione di vie del segnale che contribuiscono al danno neuronale e allo sviluppo di RD.

1. INTRODUZIONE

1.1 DIABETE MELLITO

Il diabete mellito comprende un insieme eterogeneo di disturbi metabolici cronici caratterizzati da uno stato persistente di iperglicemia che può essere dovuta a una mancata secrezione di insulina, a difetti nella sua azione (la cosiddetta ‘resistenza all’insulina’) o a entrambi (Petersmann et al. 2019). La condizione di iperglicemia cronica può comportare danni e disfunzioni a livello di diversi organi e tessuti, che sono la conseguenza di alterazioni a livello macro e micro-vascolare. Nel primo caso si tratta soprattutto di disordini cardiovascolari, infarto e disturbi vascolari periferici; mentre le principali alterazioni micro-vascolari includono retinopatia, neuropatia e nefropatia (Dey n.d.). L’ iperglicemia cronica è associata a una iper-produzione di specie reattive dell’ossigeno (ROS), ossia molecole altamente reattive che possono provocare stress ossidativo a livello dei tessuti, che contribuiscono all’insorgenza e allo sviluppo delle complicanze (Darenskaya et al. 2021). Numerosi studi suggeriscono il coinvolgimento di altri fattori all’esordio della patologia e delle alterazioni ad essa associate, fra cui la pressione sanguigna, i lipidi plasmatici, la frequenza cardiaca, il peso corporeo e l’acido urico sierico. In particolare, la variabilità di ognuno di questi fattori di rischio può svolgere un ruolo importante nello sviluppo delle complicanze. Pertanto, predisposizioni genetiche e familiarità, in associazione a fattori comportamentali e ambientali, quali abitudini alimentari scorrette, mancanza di attività fisica, sovrappeso/obesità, fumo, infezioni virali e l’assunzione di specifici farmaci, concorrono allo sviluppo dello squilibrio fisiopatologico dell’organismo e quindi all’esordio della patologia (Ceriello & Prattichizzo 2021). Le manifestazioni cliniche del diabete mellito comprendono i sintomi tipici dell’iperglicemia, quali poliuria, polidipsia, polifagia, visione offuscata e disidratazione. Tuttavia, non tutti i pazienti presentano il quadro clinico caratteristico; viene riscontrata, infatti, una grande variabilità inter-individuale nell’insorgenza e manifestazione della sintomatologia (Lucier & Mathias 2026). Il diabete mellito rappresenta oggi una sfida per la salute pubblica a livello globale, in quanto interessa milioni di individui e determina un significativo carico assistenziale ed economico per il sistema sanitario (Dey n.d.). Nel 2021, infatti, il *Global Burden of Disease* ha registrato almeno 529 milioni di persone affette da diabete mellito in tutto il mondo, con una maggiore prevalenza nei Paesi del Nord Africa e del Medio Oriente. La

prevalenza totale, soprattutto tra gli adulti più anziani, riflette principalmente il diabete di tipo 2, che nel 2021 ha rappresentato il 96% dei casi. Quest'ultimo è in gran parte prevenibile e, se identificato precocemente, può essere potenzialmente reversibile. Ciononostante, le evidenze riscontrate mostrano un incremento globale del diabete, principalmente legato all'aumento dei casi di obesità. Inoltre, una quota significativa di persone affette da diabete mellito non è consapevole della propria condizione, contribuendo così all'aumento dei casi non diagnosticati (Ong et al. 2023).

1.1.1 INSULINA

Alla base del diabete mellito vi è un'alterazione della secrezione e/o azione dell'insulina, ormone chiave nella regolazione del metabolismo glucidico.

L'insulina è un ormone polipeptidico anabolico ipoglicemizzante, che collabora con il glucagone (ormone iperglicemizzante) al fine di modulare i livelli di glucosio nel sangue. Il metabolismo del glucosio è prevalentemente stimolato dall'assunzione di cibo, che determina un aumento della produzione di insulina da parte delle cellule β del pancreas associato a una riduzione della secrezione di glucagone da parte delle cellule α , in modo da riportare i livelli sierici di glucosio alla normalità. I livelli fisiologici di glucosio plasmatico si mantengono generalmente tra 65 e 110 mg/dl, con fluttuazioni durante la giornata legate al ritmo circadiano e all'assunzione dei pasti: circa 90 mg/dl in condizioni di digiuno, mentre con l'assorbimento post-prandiale può raggiungere i 200/220 mg/dl.

In base alla secrezione giornaliera, l'insulina può essere classificata in insulina prandiale (o bolo) e basale. La prima viene rilasciata in seguito ai pasti con l'obiettivo di limitare il picco iper-glicemico ed è caratterizzata da un rapido incremento e da un picco di breve durata. L'insulina basale, invece, viene prodotta in condizioni di digiuno e durante la notte, con lo scopo di inibire il rilascio del glucosio da parte del fegato; i suoi livelli si mantengono costanti durante la giornata (Rahman et al. 2021).

In seguito alla sua secrezione da parte delle cellule β pancreatiche, l'insulina circola nell'organismo e raggiunge gli epatociti, i quali vengono indotti a immagazzinare il glucosio sotto forma di glicogeno. Oltre al fegato, anche il muscolo scheletrico e gli adipociti rappresentano i principali bersagli dell'insulina circolante e captano glucosio, contribuendo così a ridurre la concentrazione ematica di quest'ultimo. L'insulina promuove l'assorbimento di glucosio, la sintesi proteica nel muscolo scheletrico, la

glicogenesi e la lipogenesi attraverso l'attivazione di un recettore specifico tirosin-chinasico (Figura 1). I recettori insulinici, presenti sulla membrana plasmatica, agiscono enzimaticamente trasferendo gruppi fosfato dall'ATP ai residui tirosinici di proteine bersaglio intracellulari. In particolare, dopo il legame dell'insulina alle subunità α , le subunità β del recettore fosforilano e attivano la funzione catalitica dello stesso. Il recettore attivato fosforila, a sua volta, diverse proteine intracellulari che regolano le attività metaboliche dell'insulina, la crescita cellulare e l'espressione genica correlata al differenziamento cellulare (Rahman et al. 2021).

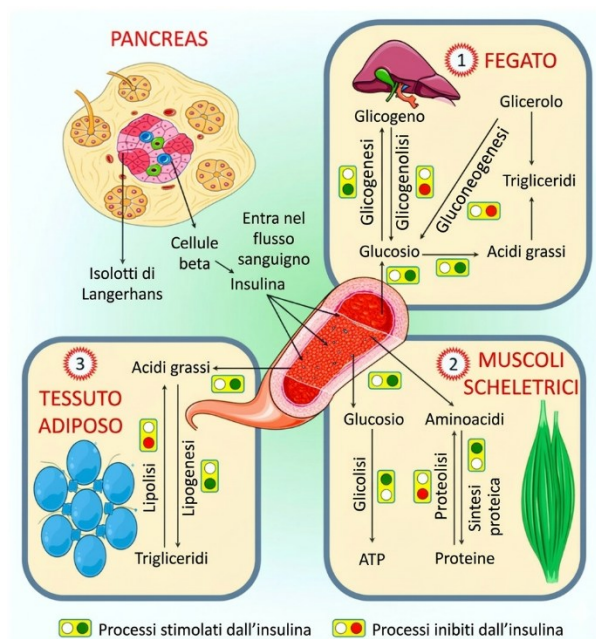


Figura 1. Principali ruoli fisiologici dell'insulina nel fegato, nel muscolo scheletrico e nel tessuto adiposo: Nel fegato l'insulina promuove il trasporto del glucosio dal circolo sanguigno agli epatociti, dove viene convertito in glicogeno, acidi grassi e trigliceridi. Nel muscolo scheletrico l'insulina permette l'utilizzo del glucosio nella glicolisi per produrre ATP, mentre nel tessuto adiposo stimola la lipogenesi attraverso la conversione degli acidi grassi in trigliceridi (Rahman et al. 2021).

Da un punto di vista strutturale, l'insulina è costituita da due catene polipeptidiche, denominate A e B, unite tra loro da ponti disolfuro, per un totale di 52 amminoacidi e un peso molecolare pari a 5802 Da. La catena A è composta da 21 amminoacidi e presenta un'elica all'estremità N-terminale collegata a un'elica C-terminale disposta in modo antiparallelo; la catena B, invece, è costituita da 30 amminoacidi ed è caratterizzata da un

segmento elicoidale centrale. Le due catene sono mantenute insieme da due ponti disolfuro, che collegano le eliche N- e C-terminali della catena A con l'elica centrale della catena B (Wilcox 2005). L'insulina viene codificata a livello del gene INS, situato sul cromosoma 11 e viene sintetizzata e secreta dalle cellule β delle isole di Langerhans del pancreas endocrino. La trascrizione di questo gene è regolata da elementi *enhancer* a monte, ai quali si legano specifici fattori di trascrizione, tra cui IDX1, MafA e NeuroD1. Tali fattori, espressi prevalentemente nelle cellule β pancreatiche, vengono attivati in risposta alle variazioni dei livelli di glucosio e alla segnalazione autocrina mediata dalla stessa insulina (Fu et al. 2013). L'insulina viene inizialmente prodotta come proinsulina ed è costituita da una sequenza segnale, denominata catena B, dal peptide di collegamento (peptide C) e dalla catena A, per un totale di circa 100 amminoacidi. La rimozione del peptide segnale determina la formazione della proinsulina, che nel lume del reticolo endoplasmatico (RER) acquisisce la propria conformazione tridimensionale. La proinsulina viene successivamente trasferita, mediante vescicole secretorie, nell'apparato di Golgi, dove viene processata da una serie di enzimi che determinano la sua conversione in insulina matura: in particolare, intervengono le convertasi proormonali PC1/3 e PC2 che determinano la rimozione del peptide C e la carbossipeptidasi E, che è responsabile della scissione dei residui amminoacidici basici terminali.

L'insulina viene immagazzinata nei granuli secretori delle cellule β pancreatiche sotto forma di esameri cristallini contenenti ioni zinco. Al momento della secrezione, che avviene in risposta a stimoli elettrici e metabolici, gli esameri si dissociano e l'insulina viene rilasciata nella circolazione nella sua forma monomerica, che è quella biologicamente attiva. La secrezione di tale ormone è principalmente regolata dalla concentrazione di glucosio nel sangue che irrorà il pancreas, attraverso un meccanismo di *feedback* negativo: l'aumento dei livelli di glucosio stimola la secrezione di insulina, che a sua volta provoca un maggiore ingresso di glucosio all'interno delle cellule, con conseguente riduzione della sua concentrazione nel plasma. Inoltre, tale riduzione della concentrazione di glucosio nel sangue inibisce l'ulteriore rilascio di insulina. Il meccanismo che sta alla base della secrezione di insulina non è ancora del tutto conosciuto, ma è stato proposto un modello generale: il glucosio entra nelle cellule β tramite i trasportatori GLUT, dove viene utilizzato per la glicolisi e la respirazione cellulare, con conseguente produzione di ATP. L'incremento della concentrazione di ATP

provoca la chiusura dei canali del potassio ATP-dipendenti e la conseguente depolarizzazione della membrana, che a sua volta favorisce l'apertura di canali del calcio voltaggio-dipendenti. Di conseguenza, si verifica un aumento della concentrazione intracellulare di calcio, che rappresenta il principale stimolo per la secrezione di insulina accumulata nelle vescicole secretorie dell'apparato di Golgi. Sebbene il glucosio costituisca il principale regolatore del rilascio di insulina, non è l'unico: l'ingestione di cibo, così come stimoli visivi e olfattivi controllati dal sistema nervoso centrale, contribuiscono ad aumentarne la secrezione (Tokarz et al. 2018).

In caso di carenza di insulina, le cellule risultano incapaci di utilizzare il glucosio come fonte di energia. Di conseguenza, l'elevata concentrazione di glucosio circolante determina la condizione di iperglicemia che, se protratta nel tempo, conduce allo sviluppo del diabete mellito e altre complicanze, tra cui danni al sistema nervoso e disfunzioni a carico degli occhi e dei reni. Analogamente, l'incapacità cellulare di sfruttare il glucosio a fini energetici, induce l'organismo a fare affidamento quasi esclusivamente sulle riserve lipidiche. La dipendenza prolungata dal metabolismo dei grassi può determinare un aumento della produzione di corpi chetonici, il cui accumulo nel circolo sanguigno può portare a una condizione cronica nota come chetoacidosi.

1.1.2 CLASSIFICAZIONE E TRATTAMENTI

L'iperglicemia associata al diabete mellito può derivare da un deficit assoluto di insulina, come nel caso del diabete di tipo 1 (TDM1), o da un'insulino-resistenza accoppiata a una secrezione inadeguata, come nel caso del diabete di tipo 2 (TDM2). Il diabete di tipo 1 è una malattia autoimmune cronica e progressiva che interessa circa l'1% della popolazione ed è caratterizzata da una mancata produzione di insulina da parte delle cellule β pancreatiche, a causa della produzione di auto-anticorpi che attaccano le stesse cellule β , distruggendole. Il danno a carico delle cellule β ha un andamento temporale che può variare in base all'età dei pazienti: negli adulti presenta generalmente una progressione più lenta rispetto a quanto accade nel caso di bambini e neonati (American Diabetes Association 2014). Le ricerche attualmente in corso nell'ambito della genetica e dell'immunologia del diabete di tipo 1, insieme allo sviluppo di nuove strategie terapeutiche, hanno contribuito in modo sostanziale ad ampliare la comprensione dei

meccanismi patogenetici di questa condizione: è noto, infatti, che i biomarcatori associati a questa patologia possono essere rilevati da mesi ad anni prima della manifestazione clinica dei sintomi (Subramanian et al. 2024). La sua insorgenza è determinata dall'interazione fra fattori genetici e ambientali, che contribuiscono a stimolare una risposta immunitaria anomala contro le cellule β del pancreas. Tra i fattori genetici responsabili di aumentare la predisposizione alla malattia sono stati identificati alcuni geni nel complesso maggiore di istocompatibilità (HLA), tra cui HLA-DR3 e DR4, i quali influenzano il riconoscimento delle cellule β pancreatiche da parte del sistema immunitario, rendendole così bersaglio di un attacco autoimmune. Nonostante ciò, la maggior parte dei pazienti non presenta la combinazione di alleli HLA a rischio più elevato e non ha familiari affetti da tale malattia, rendendo così ancora più complicata la prevenzione primaria. L'incremento più significativo dell'incidenza del diabete di tipo 1 si registra tra i bambini di età inferiore ai 15 anni, in particolare nella fascia di età al di sotto dei 5 anni. Questo aumento di incidenza può essere spiegato soprattutto da fattori ambientali e comportamentali, fra cui una scorretta alimentazione, una carenza di vitamina D, l'esposizione a virus associati a infiammazione delle isole pancreatiche (come enterovirus, disfunzioni a carico del microbiota intestinale e condizioni di sovrappeso/obesità)(DiMeglio et al. 2018). L'insorgenza del diabete mellito di tipo 1 è generalmente rapida e acuta: la marcata carenza di insulina determina un aumento significativo della concentrazione di glucosio nel sangue e, quando i livelli glicemici superano la soglia di riassorbimento renale, il glucosio non viene più trattenuto dai tubuli renali e viene eliminato con le urine (glicosuria). La conseguente incapacità delle cellule di utilizzare il glucosio come principale fonte energetica induce l'organismo ad attivare vie metaboliche alternative, in particolare l'ossidazione dei lipidi, determinando un aumento della lipolisi. La terapia cardine attualmente disponibile per il TDM1 consiste nella somministrazione esogena di insulina, necessaria a compensare la perdita della funzione secretoria delle cellule β del pancreas. Tale terapia risulta indispensabile per garantire il controllo della glicemia, prevenire lo sviluppo di chetoacidosi diabetica e ridurre il rischio di complicanze acute e croniche associate all'iperglicemia persistente. Inoltre, l'introduzione di analoghi a diversa emivita e il monitoraggio continuo della glicemia hanno profondamente trasformato la gestione di questa patologia, determinando un miglioramento dei livelli di emoglobina glicata (cioè la quota di emoglobina a cui si è

legato il glucosio) e una riduzione degli episodi di ipoglicemia, che possono essere dovuti a una eccessiva assunzione di insulina. Il trattamento del TDM1 si basa prevalentemente su due strategie cliniche: somministrazioni giornaliere multiple di insulina (MDI; *Multiple Daily Injections*) e l'infusione sottocutanea continua di insulina tramite un microinfusore. La terapia MDI si basa sulla combinazione di insulina basale a lunga durata d'azione somministrata una o due volte al giorno e di insulina (o analoghi) a breve o rapida durata d'azione assunta in concomitanza dei pasti, in modo da limitare i picchi glicemici post-prandiali. Il secondo approccio, invece, prevede l'infusione costante di insulina a rapida o breve durata d'azione per il mantenimento dei livelli basali, con l'aggiunta di boli attivati dal dispositivo per garantire un'adeguata copertura glucidica durante i pasti. Inoltre, un pilastro fondamentale nella gestione del TDM1 riguarda l'educazione alimentare del paziente, in particolare la stima e il conteggio dei carboidrati. Questo approccio risulta essenziale per definire il fabbisogno insulinico prandiale e raggiungere i *target* glicemici post-prandiali ottimali, in modo da ridurre il rischio di ipoglicemia dovuta a uno squilibrio fra apporto glucidico e dose somministrata. Parallelamente, l'integrazione dell'attività fisica regolare risulta fondamentale per i pazienti affetti da TDM1, in quanto migliora la sensibilità all'insulina e il profilo di salute generale (Lucier & Mathias 2026). Per quanto riguarda il TDM2, esso rappresenta circa il 90-95% dei casi di diabete mellito ed è caratterizzato da iperglicemia causata da una combinazione di scarsa produzione di insulina da parte del pancreas e/o inefficace utilizzo dell'ormone ipoglicemizzante da parte dei tessuti dell'organismo. Si tratta di una patologia particolarmente diffusa a livello globale, in quanto si stima che colpisca circa l'8,5% della popolazione adulta (Zaccardi et al. 2016). L'elevata prevalenza del diabete di tipo 2 può essere spiegata da una combinazione di fattori genetici, ambientali e metabolici. In particolare, il diabete di tipo 2 presenta una maggiore diffusione nei Paesi più industrializzati, come gli Stati Uniti e il Giappone, e colpisce prevalentemente adulti di età compresa tra i 45 e 64 anni. Sebbene l'età avanzata costituisca un fattore di rischio per il TDM2, l'aumento dell'obesità in età pediatrica ha portato a una crescente incidenza della patologia in bambini e adolescenti, rappresentando un problema emergente di sanità pubblica. Fra i fattori di rischio non modificabili, emergono l'etnia e la predisposizione genetica: quest'ultima è stata studiata attraverso delle analisi di associazione sull'intero genoma (GWAS) che hanno consentito di identificare circa 75 *loci* suscettibili

all'insorgenza di tale patologia. Inoltre, altri fattori attribuibili a uno stile di vita malsano, quali fumo di sigaretta, eccessivo consumo di alcol, una dieta non equilibrata e una sedentarietà prolungata, contribuiscono ulteriormente all'insorgenza e allo sviluppo della patologia. Sebbene il TDM1 e il TDM2 presentino un'eziopatogenesi diversa, nel corso della progressione della malattia emergono meccanismi fisiopatologici comuni. Nel TDM2, caratterizzato da insulino-resistenza, nel lungo termine può verificarsi il deterioramento funzionale delle cellule β pancreatiche; mentre nel TDM1, causato dalla distruzione autoimmune delle cellule β e con conseguente carenza insulinica, lo sviluppo secondario di insulino-resistenza può verificarsi con l'evoluzione della patologia. Pertanto, entrambi i fenotipi diabetici possono convergere verso una condizione caratterizzata da insulino-resistenza associata a disfunzione o perdita delle cellule β , con conseguenze sistemiche sul metabolismo e sulla funzione cellulare (Krause & De Vito 2023).

I principali organi colpiti nel diabete di tipo 2 sono il tessuto adiposo, il muscolo scheletrico e il fegato, i quali rappresentano i principali siti responsabili dell'omeostasi glucidica e lipidica. Il muscolo scheletrico è il principale sito di captazione e utilizzo del glucosio, pertanto l'insorgenza di insulino-resistenza a livello di questo tessuto determina una significativa riduzione dell'ingresso di glucosio nelle cellule muscolari. Tale alterazione è attribuibile principalmente alla compromessa traslocazione del trasportatore di glucosio GLUT4 verso la membrana plasmatica, con conseguente diminuzione della sintesi e dell'immagazzinamento di glicogeno. Inoltre, la disfunzione mitocondriale e la ridotta capacità ossidativa contribuiscono ulteriormente all'inefficiente utilizzo del glucosio, favorendo l'accumulo di metaboliti lipidici e aggravando il quadro di insulino-resistenza. A livello epatico, invece, la perdita della sensibilità all'insulina e la conseguente eccessiva produzione di glucosio determinano la soppressione della glicogenesi, contribuendo così all'aumento della glicemia a digiuno e post-prandiale. Infine, nel tessuto adiposo l'insulino-resistenza si manifesta principalmente attraverso la perdita dell'effetto anti-lipolitico dell'insulina, con conseguente attivazione persistente della lipolisi. Ciò determina l'aumento della concentrazione di acidi grassi liberi circolanti e il rilascio di citochine pro-infiammatorie. Di conseguenza, fattori quali iperglicemia cronica, dislipidemia e infiammazione svolgono un ruolo centrale nella progressione della malattia. In particolare, lo stato infiammatorio, sostenuto dal rilascio di citochine pro-

infiammatorie (TNF-alfa, IL-6), contribuisce al deterioramento delle cellule β e all'insulino-resistenza, principalmente attraverso l'aumento dello stress ossidativo e l'attivazione di vie di segnalazione infiammatorie. Nel diabete mellito di tipo 2 la terapia insulinica non è generalmente necessaria, ma può essere indicata per il controllo glicemico in specifiche condizioni cliniche, soprattutto nelle fasi più avanzate della patologia. La terapia del TDM2 consiste prevalentemente nell'impiego di ipoglicemizzanti orali, fra cui i più comuni risultano le biguanidi, le sulfaniluree, i tiazolidinedioni, gli inibitori dell' α -glucosidasi, gli agonisti del recettore GLP-1 o gli inibitori della dipeptil-peptidasi 4 (l'enzima che degrada GLP-1), e le gliflozine (che bloccano il riassorbimento renale di glucosio mediato dal trasportatore SGLT2). In particolare, la metformina, appartenente alla classe delle biguanidi, rappresenta il principio attivo più comunemente utilizzato come terapia di prima linea nel trattamento del diabete mellito. La metformina, infatti, si dimostra efficace nel ridurre la glicemia e aumentare la sensibilità insulinica, principalmente attraverso l'inibizione della produzione di glucosio a livello epatico e la promozione della captazione di glucosio e successiva glicogenesi nel muscolo scheletrico. Un'ulteriore forma di diabete mellito è rappresentata dal diabete mellito gestazionale (GDM): questo viene definito come un'intolleranza al glucosio che si manifesta durante la gravidanza e che può determinare insulino-resistenza e iperinsulinemia, fattori che aumentano il rischio di sviluppare diabete in futuro. La gravidanza è caratterizzata da una fisiologica resistenza all'insulina, mediata da adipochine e ormoni placentari, a cui si aggiunge l'aumento del rilascio di estrogeni, progesterone e cortisolo, che alterano il rapporto insulina/glucosio. La risposta fisiologica a questi cambiamenti consiste in un incremento della secrezione insulinica pancreatico: il GDM si manifesta quando la capacità del pancreas di compensare la resistenza insulinica non è sufficiente, determinando uno stato di iperglicemia (Alfadhli 2015). Si tratta di una patologia che può determinare numerose complicanze ostetriche, tra cui pre-eclampsia, induzione precoce del travaglio, rottura prematura delle membrane ed emorragia *post-partum*, oltre a esiti neonatali quali morte intrauterina o neonatale, malformazioni congenite, basso peso alla nascita, ittero e ipoglicemia neonatale. La prevenzione, fondamentale per ridurre tali rischi, si basa principalmente su interventi dietetici e attività fisica (Ye et al. 2022). Il diabete mellito di tipo 1, di tipo 2 e gestazionale rappresentano le principali forme della

patologia metabolica. Oltre a queste, sono state identificate forme meno frequenti e dovute a cause specifiche, tra cui: difetti genetici della funzione delle cellule β pancreatiche (MODY1, MODY2, MODY3, MODY4, MODY5, MODY6, DNA mitocondriale); disordini endocrini (come l'ipotiroidismo); malattie del pancreas esocrino; farmaci, droghe e agenti chimici; sindromi genetiche; infezioni (cytomegalovirus, rubella congenita) e infine l'insulino resistenza di tipo A, come il leprecaunismo o la sindrome di Rabson-Mendenhall (malattie genetiche rare causate da mutazioni nel gene del recettore insulinico). La comprensione di queste varianti è essenziale per una diagnosi accurata, per la gestione terapeutica personalizzata e per la prevenzione delle complicanze associate.

1.2 LA RETINA

L'occhio umano è un organo sensoriale altamente specializzato, la cui organizzazione anatomica consente la ricezione degli stimoli luminosi e la loro trasformazione in segnali nervosi interpretabili dal sistema nervoso centrale. Lo studio dell'organizzazione delle strutture oculari, in particolare della retina e del suo sistema vascolare, rappresenta un presupposto fondamentale per la comprensione dei meccanismi fisiologici e patologici associati alla visione. Il diabete mellito rappresenta una delle principali patologie in grado di determinare alterazioni significative a carico dell'apparato visivo: in particolare, il danno si manifesta sottoforma di retinopatia diabetica, una microangiopatia caratterizzata dalla compromissione dei vasi sanguigni della retina. Il bulbo oculare è localizzato all'interno della cavità orbitaria del cranio ed è avvolto da tre membrane, definite tonache, che presentano strutture e funzioni diverse:

- Tonaca fibrosa: è la porzione più esterna e comprende la sclera e la cornea.
- Tonaca vascolare o uvea: è suddivisa in uvea anteriore, che comprende il corpo ciliare e l'iride, e uvea posteriore, costituita dalla coroide.
- Tonaca nervosa o retina: la più interna, si trova in comunicazione con il sistema nervoso centrale (Sridhar 2018; Boote et al. 2020).

La retina svolge una funzione nervosa e sensoriale, in quanto è deputata alla conversione degli stimoli luminosi in segnali nervosi e al trasferimento di questi ultimi alle strutture

cerebrali. La retina è un tessuto sottile costituito da una complessa rete di neuroni e cellule di supporto ed è considerata parte integrante del sistema nervoso centrale. Infatti, la barriera emato-retinica (BRB) localizzata a livello della retina e la barriera emato-encefalica presentano numerose affinità sia da un punto di vista funzionale che strutturale. La retina può essere suddivisa in strati distinti in grado di ricevere e processare i segnali luminosi che arrivano dall'esterno attraverso circuiti che comprendono diverse tipologie cellulari.

In particolare, lo strato più esterno è rappresentato dall'epitelio retinico pigmentato (RPE), costituito da cellule epiteliali altamente specializzate responsabili del mantenimento della funzione visiva, del trasporto di metaboliti e dell'integrità della barriera retinica esterna. Successivamente si trovano diversi strati contenenti i fotorecettori (coni e bastoncelli), ovvero cellule neuroepiteliali specializzate con la funzione di trasformare il segnale luminoso in segnale elettrico. Questi strati si distinguono in una membrana limitante esterna (OLM), che permette di separare i corpi dei fotorecettori dai loro nuclei; uno strato nucleare esterno (ONL), contenente i nuclei dei coni e dei bastoncelli; uno strato plessiforme esterno (OPL), in cui si formano le sinapsi tra i dendriti delle cellule orizzontali e delle cellule bipolari e gli assoni dei coni e dei bastoncelli (Figura 2).

Nella retina umana, i bastoncelli costituiscono circa il 95% dei fotorecettori totali e garantiscono un'elevata sensibilità visiva in condizioni di scarsa illuminazione (visione scotopica). I coni, al contrario, rappresentano circa il 5% dei fotorecettori retinici e sono responsabili della visione cromatica a elevato potere discriminativo in condizioni di luce diurna (visione fotopica). Nel caso di livelli di illuminazione intermedia, sono attivi sia i coni che i bastoncelli e si ha la visione denominata mesopica.

Le strutture intermedie della retina comprendono lo strato nucleare interno (INL), lo strato plessiforme interno (IPL) e lo strato delle cellule ganglionari (GCL). In particolare, il primo presenta i corpi cellulari delle cellule orizzontali, che permettono di adattare la visione in funzione della luce ambientale; delle cellule bipolari, che si occupano di trasferire il segnale visivo dai fotorecettori alle cellule ganglionari, organizzandolo in canali di luce (ON) e buio (OFF); delle cellule amacrine, le quali agiscono come interneuroni inibitori e modulano le connessioni fra le cellule bipolari e ganglionari e infine delle cellule di Muller, che rappresentano le principali cellule della glia presenti

nella retina. Lo strato plessiforme interno (IPL), invece, rappresenta la sede di formazione delle sinapsi tra i dendriti delle cellule ganglionari e amacrine e gli assoni delle cellule bipolari. Infine, il GCL contiene i corpi cellulari delle cellule ganglionari, che ricevono i segnali dai neuroni bipolari e amacrine e li trasmettono al cervello tramite il nervo ottico. Internamente la retina presenta lo strato delle fibre nervose (NFL), il quale contiene gli assoni amielinici delle cellule ganglionari, che decorrono attraverso la sclera e formano il nervo ottico. Questo strato è delimitato dalla membrana limitante interna (ILM), composta da astrociti, pedicelli delle cellule di Müller e lamina basale, che costituisce il confine con il corpo vitreo (Marchesi et al. 2021; Wright et al. 2020).

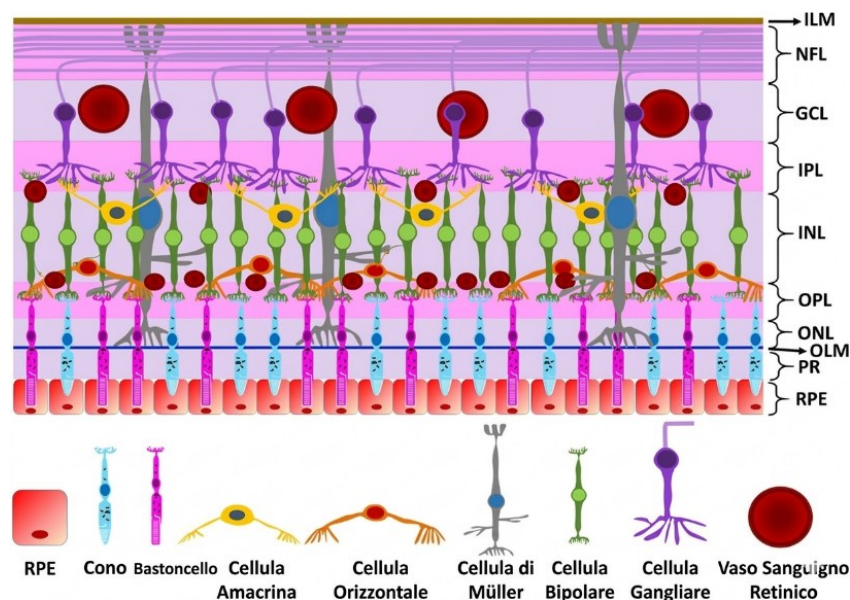


Figura 2. Gli strati costituenti la retina: dall'esterno si trova l'epitelio retinico pigmentato (RPE), la membrana limitante esterna (OLM), lo strato nucleare esterno (ONL), lo strato plessiforme esterno (OPL), lo strato nucleare interno (INL), lo strato plessiforme interno (IPL), lo strato delle cellule ganglionari (GCL), lo strato delle fibre nervose (NFL) e la membrana limitante interna (ILM) (Wright et al. 2020).

Come già menzionato, la rete vascolare della retina costituisce la BRB, che svolge la funzione di mantenere l'omeostasi del tessuto, fornendo nutrienti e ossigeno a tutti gli strati interni ed esterni della retina.

L'integrità di tale barriera risulta cruciale nel processo di percezione degli stimoli luminosi e nella regolazione del microambiente retinico. La barriera emato-retinica è costituita da una componente interna e una esterna: la BRB interna è formata da giunzioni

serrate fra le cellule endoteliali dei vasi sanguigni retinici, a loro volta circondate da periciti e dai pedicelli degli astrociti; mentre lo strato esterno è costituito da giunzioni serrate tra le cellule dell'epitelio pigmentato retinico. In particolare, i periciti e gli astrociti garantiscono l'integrità vascolare interagendo con le cellule endoteliali. Queste ultime rappresentano la componente principale a livello della BRB interna e permettono la formazione di una barriera fisica fra il lume vascolare e la retina. Tale barriera consente di regolare in modo selettivo il trasporto di metaboliti e nutrienti fra la circolazione sanguigna e la retina, al fine di garantire l'omeostasi retinica e condizioni ottimali per la funzione visiva.

Per quanto riguarda i periciti, essi svolgono un ruolo cruciale nel mantenimento dell'integrità della barriera emato-retinica: grazie alla loro morfologia stellata circondano le pareti dei capillari formati dalle cellule endoteliali, garantendo così l'integrità strutturale dei vasi sanguigni della retina. Inoltre, i periciti producono il fattore di crescita vascolare endoteliale (VEGF), il quale permette di modulare la sopravvivenza delle cellule endoteliali e quindi dei capillari retinici.

Infine, anche gli astrociti svolgono un ruolo chiave nel mantenimento della vascolarizzazione retinica: essi originano a livello del nervo ottico e migrano nella retina fornendo uno scheletro strutturale essenziale per la formazione dei capillari. Essi interagiscono strettamente con le cellule vascolari, contribuendo sia fisicamente sia tramite il rilascio di proteine solubili a mantenere l'integrità della barriera emato-retinica. In particolare, gli astrociti promuovono l'espressione delle proteine delle *tight junction* nelle cellule endoteliali e rafforzano le connessioni tra di esse (Shin et al. 2014). La disfunzione in tali interazioni può provocare la rottura della barriera emato-retinica, con conseguente insorgenza di patologie retiniche, fra cui la retinopatia diabetica.

Inoltre, la rete vascolare endoteliale risulta protetta da una rete polimerica costituita da glicoproteine, proteoglicani, proteine solubili e glicosamminoglicani, che insieme costituiscono il glicocalice endoteliale. La perdita di tale protezione rappresenta un ulteriore fattore implicato nella disfunzione endoteliale che caratterizza la retinopatia diabetica.

1.3 RETINOPATIA DIABETICA

La retinopatia diabetica (RD) rappresenta una delle più rilevanti complicanze microvascolari del diabete mellito ed è riconosciuta come una delle principali cause di cecità prevenibile a livello globale. Si tratta di una patologia multifattoriale caratterizzata da un progressivo danno della retina, conseguente alla condizione di iperglicemia cronica. In particolare, la retinopatia diabetica compromette la normale unità neurovascolare retinica, alterando l'interazione funzionale tra cellule neuronali, gliali ed endoteliali. Tali alterazioni determinano un aumento della permeabilità vascolare e l'attivazione di processi di neovascolarizzazione patologica, associati a una progressiva perdita della funzione neuronale e visiva (Shyam et al. 2025).

In base al grado di progressione, la retinopatia diabetica viene classificata in due stadi principali: non proliferante (NPDR; Figura 3) a sua volta suddivisa in blanda, moderata e severa, e proliferante (PDR; Figura 4). La forma non proliferante rappresenta lo stadio iniziale della patologia ed è accompagnata dalla perdita delle cellule perivascolari della retina (i periciti) e dalla formazione di microaneurismi ed emorragie retiniche associate alla comparsa di essudati duri. In questo stadio, si verifica un aumento della permeabilità vascolare che può comportare l'insorgenza di edema maculare.

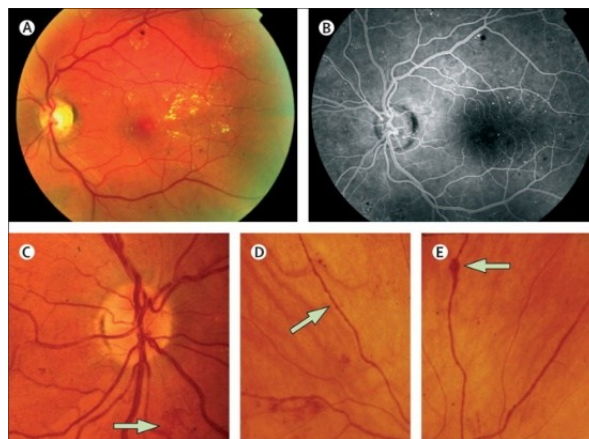


Figura 3. Retinopatia diabetica non proliferante:(A e B) microaneurismi, emorragie, essudati duri; (C) anomalie microvascolari retiniche;(D) beading venoso; (E) formazione di 'loop' venosi (Cheung et al. 2010).

La patologia può progredire nella forma proliferante, in cui si verifica la rottura della barriera emato-retinica e la riduzione della pressione di perfusione vascolare. Questo stadio è caratterizzato dalla presenza di aree ischemiche che inducono la liberazione di sostanze angiogeniche, tra cui VEGF, responsabili dei processi di neovascolarizzazione patologica. I neovasi sono tuttavia fragili e la loro rottura provoca emorragie retiniche ed endovitreali successivamente accompagnate da fibrosi e possibile distacco della retina (Cheung et al. 2010; Wilkinson et al. 2003). La perdita della funzione visiva è associata prevalentemente a due condizioni più avanzate, ovvero l'edema maculare diabetico (DME) e la PDR. Il DME può presentarsi in qualsiasi stadio della patologia, ma la sua prevalenza aumenta progressivamente in base alla gravità delle lesioni retiniche, e può interessare fino al 70% dei pazienti con PDR. In particolare, l'iperglicemia e l'attivazione del fattore nucleare NFk-B rappresentano i principali determinanti patogenici di DME, in quanto provocano l'alterazione della barriera emato-retinica mediata da VEGF e favoriscono il rilascio di citochine pro- infiammatorie, aumentando così la permeabilità vascolare e la conseguente compromissione della funzione visiva (Pushparani et al. 2025).

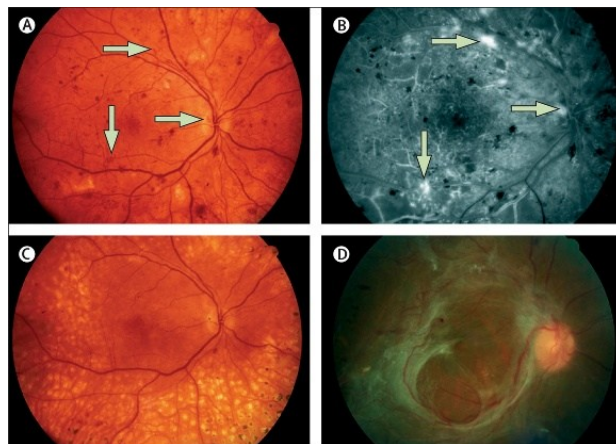


Figura 4. Retinopatia diabetica proliferante:(A) neovascolarizzazione, identificata con fluorangiografia retinica (B); (C) regressione tramite fotocoagulazione panretinica; (D) progressione senza trattamento verso la forma fibroproliferativa (formazione di tessuto cicatriziale fibroso) (Cheung et al. 2010).

La classificazione nelle diverse fasi si basa prevalentemente sull' *International Clinical Diabetic Retinopathy Disease Severity Scale* (ICDR), un sistema riconosciuto a livello internazionale che permette di suddividere la patologia in cinque stadi:

- stadio 0, caratterizzato da assenza di anomalie retiniche visibili;
- stadio 1 (o retinopatia diabetica non proliferante blanda), associato alla presenza di microaneurismi visibili;
- stadio 2 (o retinopatia diabetica non proliferante moderata), in cui emergono ulteriori segni clinici come emorragie o la presenza di essudati duri (depositi di lipidi e lipoproteine);
- stadio 3 (o retinopatia diabetica non proliferante severa), in cui si osserva *beading* venoso (variazione nel calibro dei vasi che assumono l'aspetto di "corona di rosario"), emorragie retiniche e anomalie microvascolari intraretiniche (IRMA);
- stadio 4 (o retinopatia diabetica proliferante), in cui si manifesta neovascolarizzazione o emorragia vitreale/preretinica.

La retinopatia diabetica costituisce un rilevante problema per la sanità pubblica a livello globale: si stima che interessi circa il 30-40% dei pazienti affetti da diabete.

A livello mondiale, oltre 100 milioni di individui convivono con questa patologia, che rappresenta una delle principali cause di ipovisione e cecità, in particolare nella popolazione in età lavorativa. Tuttavia, la perdita visiva associata alla retinopatia diabetica è in larga misura prevenibile attraverso programmi di *screening*, diagnosi precoce e trattamenti tempestivi.

La diffusione di questa patologia, però, è destinata ad aumentare: ciò è principalmente dovuto all'aumento dell'invecchiamento della popolazione e dell'aspettativa di vita, a fattori di rischio comportamentali e alla crescente prevalenza del diabete mellito a livello globale. In questo contesto, l'*International Diabetes Federation* prevede che il numero di persone affette da diabete mellito possa raggiungere i 700 milioni nel 2045, rispetto ai 463 milioni registrati nel 2019 (Teo et al. 2021).

L'aumento della prevalenza di RD, tuttavia, non si dimostra omogeneo a livello geografico: mentre in Nord America ed Europa i tassi di incremento risultano relativamente contenuti (10,8–18%), nelle regioni a basso e medio reddito, fra cui il Pacifico occidentale, l'America Centrale e Meridionale, l'Asia, l'Africa e il Medio

Oriente, si osservano aumenti significativamente più elevati, compresi tra il 20,6% e il 47,2%. I maggiori incrementi sono attesi nel Medio Oriente, nel Nord Africa e nelle aree del Pacifico occidentale, dove il numero di persone affette da RD si stima possa raggiungere circa 6 milioni per ciascuna regione (Tan & Wong 2023).

Tra gli altri fattori di rischio maggiormente associati allo sviluppo e alla progressione di RD, numerosi studi identificano in modo consistente la durata del diabete, l'ipertensione arteriosa, la presenza di nefropatia diabetica e un controllo glicemico inadeguato. La durata del diabete mellito rappresenta, fra tutti, il fattore di rischio più significativo: l'incidenza di RD è risultata pari al 2% nei pazienti con TDM1 con una durata di malattia inferiore ai due anni; mentre nei pazienti affetti da TDM2 (con o senza trattamento insulinico) con una durata di patologia inferiore ai 5 anni, l'incidenza è stata stimata intorno al 20%. Nei soggetti affetti da diabete mellito (sia di tipo 1 sia di tipo 2) da più di 15 anni, invece, la prevalenza di RD può raggiungere fino l'80% dei casi. Inoltre, la presenza di pazienti asintomatici, la mancanza di trattamenti economicamente accessibili, la carenza di personale sanitario adeguatamente formato e l'assenza di una diagnosi precoce contribuiscono all'aumento dell'incidenza di TDM2 (Nilay & Thool 2022).

Ulteriori variabili, quali la dislipidemia, la gravidanza, la sindrome delle apnee notturne e specifiche predisposizioni genetiche, sono state riconosciute come determinanti aggiuntivi che contribuiscono ad aumentare la suscettibilità individuale a RD (Li et al. 2023). In molti casi, un controllo glicemico tempestivo e accurato permette di ritardare o prevenire la progressione di RD: infatti, livelli elevati di emoglobina glicata sono stati associati a un maggiore rischio di sviluppare forme più gravi.

1.3.1 PATOGENESI E MECCANISMI MOLECOLARI

L'iperglicemia cronica rappresenta il principale determinante patogenetico della retinopatia diabetica. Essa attiva una serie di meccanismi metabolici interconnessi responsabili del danno vascolare retinico, stress ossidativo e infiammazione, tra cui l'accumulo dei prodotti finali di glicazione avanzata (AGE) e l'attivazione della protein chinasi C (PKC), della via dei polioli e della via dell'esosamina.

Gli AGE sono composti eterogenei dannosi, la cui formazione avviene attraverso la reazione di Maillard, ossia una reazione non enzimatica che si innesca fra zuccheri

riducenti e gruppi amminici liberi di proteine, acidi nucleici o lipidi. La loro presenza è associata a un aumento della concentrazione di specie reattive dell'ossigeno (ROS) e alcuni di questi prodotti, come la carbossimetil lisina e la pentosidina, si accumulano nei vasi sanguigni retinici, provocando danni alle proteine extracellulari e irrigidimento della struttura vascolare (Kang et al. 2022).

In condizioni di iperglicemia, inoltre, l'intermedio glicolitico diidrossiacetone fosfato viene ridotto a glicerolo-3-fosfato, favorendo la sintesi di diacilglicerolo (DAG). Quest'ultimo rappresenta un potente attivatore di diversi isoenzimi della PKC, una famiglia di serin treonin chinasi implicate nei meccanismi di segnalazione e comunicazione cellulare. Tale famiglia di chinasi comprende diverse isoforme, che si differenziano fra loro in base alla modalità con cui vengono attivate: classiche (cPKC), PKC- α , - β 1, - β 2, - γ , attivate da calcio, DAG e fosfaditilserina; nuove (nPKC), PKC- δ , - ϵ , - η , attivate solo da DAG e fosfaditilserina e atipiche (aPKC), PKC- ζ , - ι / λ , le quali non vengono attivate né da DAG né da calcio (Gerald & King 2010).

La via dei polioli, invece, è un percorso metabolico alternativo in cui il glucosio viene convertito in sorbitolo dall'enzima aldoso reductasi, con consumo di NADPH, e successivamente in fruttosio ad opera della sorbitolo deidrogenasi. In condizioni di iperglicemia, l'attivazione aberrante di questa via nelle cellule retiniche determina accumulo intracellulare di sorbitolo, con conseguente stress osmotico e ossidativo e riduzione delle difese antiossidanti. Alterazioni di tale attività enzimatica, associate anche a polimorfismi genetici (es. ALR2 per l'aldoso reductasi e SHD per la sorbitolo deidrogenasi) contribuiscono al danno cellulare e alla progressione della patologia (Li et al. 2019).

Infine, la via dell'esosamina rappresenta una via metabolica secondaria, in cui il 2-5% del glucosio viene convertito in UDP-n-acetilglucosamina (UDP-GlcNAc), attraverso l'enzima glutamina-fruttosio-6-fosfato aminotransferasi (GFAT). Il prodotto finale, UDP-GlcNAc, rappresenta il substrato essenziale per la O-GlcNAcilazione delle proteine, una modificazione post-traduzionale mediata dagli enzimi O-GlcNAc transferasi (OGT) e O-GlcNAcase (OGA) e implicata nei meccanismi di trascrizione genica, sintesi e localizzazione proteica. In condizioni di iperglicemia, l'iperattivazione di questa via induce una O-GlcNAcilazione aberrante, alterando così numerosi processi

cellulari e contribuendo al danno dell'unità neurovascolare retinica, fondamentale per la funzione visiva (Wang et al. 2023).

La condizione di iperglicemia cronica associata a tali meccanismi provoca dilatazione vascolare e alterazioni del flusso ematico a livello dei vasi sanguigni retinici, riscontrabili già nelle prime fasi di sviluppo della patologia. Inoltre, l'iperglicemia persistente favorisce l'apoptosi dei periciti e delle cellule endoteliali che, in associazione con l'ispessimento della membrana basale, contribuisce in modo significativo al deterioramento dell'integrità della barriera emato-retinica. I periciti, in particolare, svolgono un ruolo fondamentale nel fornire supporto strutturale ai capillari, per cui la loro deplezione determina la formazione di estroflessioni a livello della parete capillare, con conseguente insorgenza di microaneurismi. In questo contesto, una marcata riduzione sia dei periciti sia delle cellule endoteliali può causare occlusione capillare e ischemia. Tale condizione di ipossia/ischemia determina, a sua volta, una sovraregolazione di VEGF, principalmente mediata dall'attivazione del fattore di trascrizione HIF-1 (*Hypoxia-inducible factor 1*). VEGF, oltre che promuovere l'angiogenesi, è ritenuto responsabile dell'aumento di permeabilità vascolare, principalmente attraverso la fosforilazione di alcune proteine delle giunzioni strette, tra cui occludina e zonula occludens-1 (Wang & Lo 2018).

La leucostasi, ossia l'accumulo di globuli bianchi a livello dei capillari, è stata riconosciuta come determinante nello sviluppo delle prime fasi della retinopatia diabetica. Alcuni studi condotti da Schröder et al. nel 1991 su modelli murini evidenziano un aumento di adesione leucocitaria alla vascolatura retinica già dopo tre giorni dall'induzione della condizione diabetica. Inoltre, studi successivi hanno dimostrato come la leucostasi influenzi la perdita progressiva delle cellule endoteliali e il deterioramento della barriera emato-retinica, principalmente attivando la via di segnalazione Fas (CD95) /Fas-ligando. Nello specifico, la leucostasi è un processo dovuto all'adesione dei leucociti all'endotelio vascolare, mediato dall'espressione di specifiche molecole di adesione endoteliali, tra cui la molecola di adesione intercellulare-1 (ICAM-1), l'integrina β -2 (CD-18) e le selectine, in particolare E-selectina. In questo contesto, infatti, è stato osservato come il deficit genetico di ICAM-1 o di CD-18 determini una significativa riduzione dell'adesione leucocitaria. I leucociti vengono attivati principalmente dalle chemochine, le quali svolgono un ruolo chiave nella patogenesi della

RD. Alcune di esse, come la proteina chemiotattica per i monociti-1 (MCP-1), le proteine infiammatorie dei macrofagi-1 α e 1 β (MIP-1 α e MIP-1 β) e altre citochine infiammatorie come TNF- α , IL-6, IL-8 e IL-1 β presentano livelli di espressione molto elevati nei pazienti diabetici. L'infiammazione, quindi, gioca un ruolo essenziale nello sviluppo e progressione della RD, come è stato riscontrato in diversi studi su modelli animali e su individui affetti da diabete (Wang & Lo 2018).

Anche la disfunzione delle cellule gliali retiniche si è dimostrata coinvolta nell'amplificazione della risposta infiammatoria caratterizzante la retinopatia diabetica. Tali cellule, di cui fanno parte le microglia, gli astrociti e le cellule di Muller, forniscono supporto strutturale e permettono il mantenimento dell'omeostasi retinica; in condizioni di iperglicemia la loro iper-attivazione determina un aumento della secrezione di citochine pro-infiammatorie, come TNF- α , IL-6, MCP-1 e VEGF.

Infine, l'ultimo fattore implicato nella patogenesi della RD è rappresentato dalla neurodegenerazione retinica. In particolare, numerosi studi evidenziano che tale aspetto può rappresentare un meccanismo patogenetico indipendente nella RD. Infatti, in alcuni modelli murini la perdita delle cellule ganglionari con conseguente riduzione dello spessore retinico, è stata osservata prima della comparsa delle alterazioni microvascolari, mentre in pazienti diabetici si è riscontrato un assottigliamento degli strati interni retinici anche in assenza di RD. L'apoptosi dei neuroni retinici è un evento che viene riscontrato già nei primi stadi di sviluppo della malattia ed è prevalentemente causata da una iper-attivazione di molecole pro-apoptotiche, fra cui caspasi-3 attivata, Bax (proteina pro-apoptotica appartenente alla famiglia Bcl-2) e recettore Fas. Oltre alla disfunzione mitocondriale associata all'apoptosi delle cellule neuronali, la degenerazione retinica indotta dal diabete è caratterizzata anche da un marcato coinvolgimento dello stress ossidativo, evidenziato da un significativo aumento della produzione di ROS. Lo stress ossidativo è un fenomeno dovuto principalmente a uno squilibrio tra la formazione e la rimozione dei radicali liberi, tra cui l'anione superossido, il perossido di idrogeno (H₂O₂), il radicale perossilico (ROO \cdot) e il radicale ossidrilico (\cdot OH). La retina risulta particolarmente vulnerabile a tale stress a causa della continua esposizione alla luce visibile e ai raggi UV, che favoriscono la produzione dei ROS, e dell'elevata concentrazione di acidi grassi polinsaturi (PUFA) nelle membrane del segmento esterno dei fotorecettori. Tra questi, risultano particolarmente abbondanti l'acido

docosaesaenoico, l'acido arachidonico e l'acido oleico. Sebbene i PUFA siano essenziali per la struttura e la funzionalità retinica, la loro elevata suscettibilità all'ossidazione li rende i principali bersagli dei ROS, innescando così i processi di perossidazione lipidica. I prodotti di tali reazioni, come idroesesenale e idrossinonenale, possono interagire con il DNA e le proteine, causando danni ai fotorecettori e alterazioni dell'epitelio pigmentato retinico. Considerando questi meccanismi, la riduzione della produzione di ROS rappresenta una potenziale strategia terapeutica per il trattamento della patologia (Kang & Yang 2020).

1.3.2 SCREENING E ATTUALI TERAPIE

Come già menzionato, la RD rappresenta una delle principali cause di disabilità visiva a livello globale. In questo contesto, lo *screening* assume un ruolo fondamentale per l'identificazione precoce di forme di cecità prevenibili.

Tale patologia risulta spesso essere asintomatica fino allo sviluppo di complicanze avanzate, quali l'edema maculare o la PDR. Sebbene esistano alcune terapie efficaci nel trattamento di queste condizioni (come la terapia laser panretinica o le iniezioni intravitreali di inibitori di VEGF), esse risultano più utili nel prevenire o rallentare ulteriori perdite visive che nel recuperare un'acuità visiva già compromessa. Di conseguenza, uno *screening* periodico rappresenta un elemento fondamentale per preservare la vista nei pazienti affetti da diabete. Le linee guida sullo *screening* della RD, pubblicate dall'*International Council of Ophthalmology* e dall'*American Diabetes Association*, sottolineano l'importanza della prima valutazione oftalmologica e indicano il numero minimo di esami di *screening* necessari per garantire un adeguato rinvio allo specialista. In particolare, viene fatta una distinzione tra diabete di tipo 1 e di tipo 2: nel primo caso, la prima visita oculistica è consigliata entro 5 anni dall'esordio della patologia, mentre nei pazienti affetti da TDM2 si raccomanda un primo controllo al momento della diagnosi. Lo *screening* comprende principalmente la valutazione dell'acuità visiva e l'esame della retina, entrambi eseguiti da personale adeguatamente qualificato (Lin et al. 2021).

Infine, è importante citare uno studio in cui viene proposto un approccio personalizzato basato sul rischio individuale di sviluppare edema maculare e la PDR a partire da stadi

precoci della malattia. In particolare, tale approccio consentirebbe di ridurre l'intervallo di tempo in cui la retinopatia proliferante o l'edema maculare potrebbero rimanere non diagnosticati e richiederebbe un numero significativamente inferiore di esami rispetto allo *screening* annuale attualmente raccomandato. Tale strategia potrebbe migliorare notevolmente l'efficienza economica dello *screening* e portare a risparmi significativi nel lungo periodo; tuttavia, sono necessari ulteriori studi di validazione, in particolare nei pazienti affetti da diabete di tipo 2 (Takagi 2018).

Le attuali strategie terapeutiche per la RD comprendono due approcci principali: farmaci volti al controllo sistemico e trattamenti locali a livello oculare. Tra i farmaci utilizzati nella terapia sistemica emergono, oltre a insulina e ipoglicemizzanti orali, gli ACE-inibitori e le statine, a cui si aggiungono alcuni modulatori del metabolismo lipidico come il fenofibrato e il pemafibrato. Tali farmaci mirano soprattutto alla riduzione dell'incidenza e della progressione della patologia, attraverso il controllo dei livelli di glicemia, della pressione arteriosa e del metabolismo lipidico.

In particolare, gli ipoglicemizzanti orali (impiegati soprattutto nel trattamento del TDM2) esercitano un ottimo controllo glicemico e dimostrano effetti benefici sulla progressione della RD. Gli ACE-inibitori, invece, sono farmaci antiipertensivi che agiscono modulando la pressione arteriosa. Nella terapia della RD la loro azione sul sistema renina-angiotensina-aldosterone provoca una riduzione dei livelli intraoculari di ACE e angiotensina II, rallentando così la progressione della patologia (Rossi et al. 2005). Le statine agiscono prevalentemente sul controllo del metabolismo lipidico e delle alterazioni ad esso associate, fra cui la dislipidemia, che risulta strettamente legata al decorso della RD. Alcuni studi hanno infatti evidenziato che alti livelli di trigliceridi e colesterolo LDL aumentano il rischio di retinopatia, mentre livelli elevati di colesterolo HDL sembrano esercitare un effetto protettivo. In questo contesto, le statine mirano a ridurre i livelli sierici di LDL-C attraverso l'inibizione dell'enzima 3-idrossi-3-metilglutaril coenzima A reduttasi, ed esercitano anche un effetto anti-angiogenico, in quanto riducono l'espressione di molecole pro-infiammatorie e, indirettamente, la produzione di VEGF a livello delle cellule endoteliali retiniche.

Per quanto riguarda i fibrati, il più promettente risulta essere il fenofibrato, il quale, dopo somministrazione orale, viene convertito in acido fenofibrico che agisce come agonista del recettore attivato dai proliferatori del perossisoma di tipo alfa (PPR α). Questo

meccanismo determina soprattutto un'azione ipolipemizzante, ma numerosi studi hanno evidenziato anche effetti antiossidanti, antinfiammatori, anti-apoptotici e anti-angiogenici. In particolare, il fenofibrato riduce l'espressione di citochine pro-infiammatorie e della proteina C-reattiva, limitando l'attivazione del fattore nucleare NF- κ B. Grazie a questi effetti, il fenofibrato riveste un ruolo significativo nel rallentare la progressione della RD (Karti & Saatci 2024).

Per le forme più rilevanti da un punto di vista clinico si ricorre invece alla terapia 'gold standard', che prevede principalmente l'impiego di terapie oculari ad azione locale. In particolare, la fotocoagulazione panretinica è stato il primo approccio che ha permesso di rivoluzionare la gestione della RD. Tale approccio consiste nell'applicazione di *spot* laser sulla retina periferica per distruggere le aree ischemiche, ridurre la neovascolarizzazione e prevenire distacchi di retina o emorragie. In linea generale, la terapia laser riduce del 60% la probabilità di perdita della vista nei pazienti a maggiore rischio. Per i casi di PDR avanzata associata a complicanze, come il distacco della retina ed emorragie vitreali, si ricorre spesso alla chirurgia vitroretinica (o vitrectomia), che consente di migliorare la riduzione dello spessore maculare centrale e ridurre i livelli di citochine intraoculari. Sebbene entrambi gli approcci risultino efficaci nel trattamento della PDR, la terapia di prima scelta rimane rappresentata dalle iniezioni intravitreali di farmaci anti-VEGF, che hanno permesso un significativo miglioramento dell'acuità visiva e una riduzione della progressione dell'edema maculare diabetico. Gli antagonisti di VEGF includono prevalentemente gli anticorpi monoclonali, i quali inibiscono selettivamente il fattore di crescita vascolare endoteliale, impedendone così il legame con i suoi recettori vascolari, VEGFR-1 e VEGFR-2. Grazie a questo meccanismo consentono di prevenire la neoangiogenesi patologica e l'aumento della permeabilità capillare, alterazioni tipiche della patologia. Tra i farmaci più utilizzati in ambito clinico emergono: Bevacizumab, che agisce selettivamente impedendo il legame di VEGF-A con il suo recettore; Ranibizumab, un frammento di anticorpo monoclonale anch'esso diretto contro VEGF-A; Aflibercept, una proteina di fusione ricombinante umana che agisce come esca molecolare inibendo l'azione di VEGF-A e VEGF-B (Barillari 2020). In casi di controindicazione o inefficacia del trattamento con i farmaci anti-VEGF, è possibile ricorrere alla somministrazione intravitreale di corticosteroidi, fra cui desametasone e flucinolone acetone. Questi ultimi presentano proprietà antinfiammatorie, angiostatiche

e contrastano l'iperpermeabilità, grazie alle quali riducono la produzione di citochine pro-infiammatorie, stabilizzano la barriera emato-retinica e riducono l'espressione di VEGF (Sadikan & Abdul Nasir 2023).

In linea generale, gli approcci terapeutici attualmente più efficaci sono principalmente orientati all'inibizione di VEGF (in particolare l'interazione VEGF-A-VEGFR-2); tuttavia, numerosi studi sottolineano l'importanza di nuovi approcci mirati alla segnalazione delle cellule endoteliali vascolari e dei periciti, nonché al controllo della produzione di citochine infiammatorie.

In conclusione, le strategie terapeutiche attualmente disponibili si sono dimostrate particolarmente efficaci nella prevenzione e nel rallentamento dell'insorgenza delle complicanze della RD, pur presentando significative limitazioni. Esse, infatti, agiscono principalmente nelle fasi tardive della malattia, senza intervenire sui meccanismi patogenetici precoci. Di conseguenza, non modulano direttamente processi chiave della patologia quali l'infiammazione cronica, lo stress ossidativo e la disfunzione mitocondriale. A ciò si aggiungono alcune considerazioni pratiche: si tratta di terapie invasive, costose e gravate da potenziali effetti avversi sistemici e oculari che possono compromettere la qualità di vita dei pazienti.

1.4 VEGF

Il fattore di crescita dell'endotelio vascolare rappresenta un mediatore biochimico cruciale nel processo di angiogenesi all'interno dell'organismo umano. Dalle prime fasi dello sviluppo embrionale fino ai complessi meccanismi fisiologici e patologici dell'adulto, VEGF coordina la formazione di nuovi vasi sanguigni e gioca un ruolo chiave nello sviluppo di condizioni patologiche, quali neovascolarizzazione tumorale e alterazioni della funzione retinica. In questo contesto, il ruolo di VEGF si rivela determinante nell'evoluzione della retinopatia diabetica verso gli stadi più avanzati, caratterizzati da una proliferazione vascolare incontrollata. VEGF si configura come un fattore pleiotropico essenziale a livello fisiologico per la sopravvivenza delle cellule endoteliali e vascolari e studi recenti ne hanno evidenziato una funzione cruciale anche come fattore neurogenico e neurotrofico. Esso, infatti, promuove direttamente la proliferazione e il differenziamento dei progenitori neuronali, garantendo così la crescita

e la sopravvivenza dei neuroni stessi (Rosenstein et al. 2010). Tuttavia, questa natura multifunzionale che riguarda processi diversi come la migrazione cellulare, la proteolisi, la permeabilità vascolare e la proliferazione cellulare, rappresenta un ostacolo per le strategie cliniche. L'ampio spettro di funzioni cellulari influenzate da VEGF, infatti, rischia di compromettere la validità degli approcci anti-VEGF, in modo particolare nelle patologie croniche dove l'inibizione della molecola potrebbe interferire negativamente con i meccanismi di protezione gliare, neuronale ed endoteliale (Penn et al. 2008). Il fattore VEGF identifica una famiglia di sette glicoproteine omodimeriche caratterizzate da un peso molecolare compreso tra 34 e 46 kDa. Tali proteine presentano una sequenza amminoacidica caratterizzata da otto residui di cisteina altamente conservati che permettono la formazione di ponti disolfuro sia tra le subunità sia all'interno di ciascuna di esse.

Le principali glicoproteine costituenti la famiglia comprendono:

- VEGF-A, coinvolta nei meccanismi di angiogenesi fisiologica e patologica (come nella RD); inoltre, svolge un ruolo centrale anche nello sviluppo e nell'omeostasi delle cellule neuronali.
- VEGF-B, prevalentemente implicata nei processi di sopravvivenza delle cellule vascolari e attraverso la modulazione di VEGF-A permette la formazione di eterodimeri con esso.
- VEGF-C, coinvolta nel mantenimento dei vasi linfatici, nello sviluppo e omeostasi delle cellule neuronali e nella sopravvivenza delle cellule vascolari.
- VEGF-D, risulta principalmente implicata nei processi di angiogenesi e linfangiogenesi.
- VEGF-E, si tratta di un'isoforma codificata dal gene del virus Paradox-Orf in grado di aumentare la permeabilità vascolare. Ha affinità unicamente per il recettore VEGFR-2.
- PIGF (fattore di crescita placentale), si tratta di un co-fattore pro-angiogenico implicato prevalentemente nei processi infiammatori (Arrigo et al. 2022).

In particolare, la glicoproteina VEGF-A risulta la più importante nella patogenesi della RD ed è a sua volta costituita da diverse isoforme: la prima famiglia viene identificata come VEGF-Axxx e ha funzione pro-angiogenica, mentre la seconda VEGF-Axxx_b svolge attività anti-angiogenica (Nowak et al. 2010; Amadio et al. 2016). In quest'ultima

famiglia la proteina più studiata risulta essere VEGF-b165, la quale viene espressa in diversi organi come il colon, i reni e la retina. In numerosi studi *in vitro* e *in vivo* è stata evidenziata una sua debole attività agonista verso il recettore VEGFR-2, il cui legame determina la fosforilazione nel dominio intracellulare di residui di tirosina diversi rispetto a quelli fosforilati dalla corrispondente isoforma pro-angiogenica. Questa marcata eterogeneità delle isoforme di VEGF-A deriva dai complessi meccanismi di *splicing* alternativo a cui è soggetto il trascritto primario del gene. Tra queste, la variante VEGF-A₁₆₅ riveste un'importanza preminente: il suo ruolo fisiologico è infatti determinante nell'angiogenesi retinica, rendendola l'isoforma maggiormente implicata nei processi patologici della RD (Amadio et al. 2016).

Il meccanismo d'azione di tali fattori di crescita si esplica attraverso l'interazione con specifici recettori tirosin-chinasici extracellulari (VEGFR), il cui legame innesca una cascata di auto-fosforilazione intracellulare responsabile dell'attivazione dei segnali angiogenici. Sebbene questi recettori risultino localizzati prevalentemente sull'endotelio vascolare e linfatico, la loro espressione si estende anche a livello di altre cellule, come i macrofagi, le cellule muscolari lisce vascolari e le cellule mesangiali renali. Tra i principali recettori di VEGF, VEGFR-1 è implicato nel reclutamento delle cellule infiammatorie, VEGFR-2 promuove la migrazione endoteliale e la permeabilità vascolare, mentre VEGFR-3 svolge un ruolo chiave nella linfoangiogenesi associata a processi tumorali e infiammatori.

In particolare, il primo presenta elevata affinità di legame verso VEGF-A, VEGF-B e PlGF e agisce prevalentemente come recettore di riserva, in quanto non presenta un'elevata attività tirosin-chinasica. Da un punto di vista fisiologico risulta fondamentale nello sviluppo vascolare embrionale, mentre in condizioni di infiammazione o ischemia amplifica la risposta neovascolare o infiammatoria.

VEGFR-2, invece, presenta un'elevata affinità soprattutto nei confronti dell'isoforma VEGF-A, con la quale interagisce al fine di mantenere l'omeostasi vascolare (Penn et al. 2008). In particolare, nelle cellule endoteliali VEGFR-2 viene co-espresso con il recettore neuropilina-1 (NRP-1), una glicoproteina specifica per l'isoforma VEGF-A₁₆₅ che consente di potenziare l'interazione fra quest'ultima e il suo recettore (Peach et al. 2018). Le attuali terapie mirano proprio a bloccare il legame tra VEGF-A e questo specifico recettore, interrompendo così la cascata di eventi vaso-proliferativi e infiammatori. Per

quanto riguarda VEGFR-3, esso presenta maggiore affinità nei confronti delle isoforme C e D di VEGF.

Nel microambiente ipossico della retina diabetica, la sovraespressione di VEGF è stimolata da una complessa interazione di stimoli, tra cui l'ipossia tissutale, lo stress ossidativo e l'accumulo di prodotti finali di AGE. Il fattore di crescita endoteliale vascolare aumenta drasticamente la permeabilità vascolare della retina e stimola una proliferazione endoteliale incontrollata, portando alla rottura della barriera emato-retinica e alla neovascolarizzazione patologica. In questo contesto, l'elevata concentrazione di VEGF potenzia, inoltre, l'adesione dei leucociti all'endotelio determinando l'*upregulation* di molecole specifiche come ICAM-1 e VCAM-1. In questo modo si innesca un *feedback* pro-infiammatorio in cui la produzione di citochine, causata dai livelli elevati delle molecole di adesione, stimola ulteriormente il rilascio di VEGF, consolidando la progressione della patologia (Ahmad & Nawaz 2022).

Inoltre, risulta importante evidenziare l'apparente paradosso che esiste tra la funzione fisiologica svolta da VEGF e il suo ruolo patologico: nel primo caso, infatti, VEGF promuove la sopravvivenza delle cellule endoteliali; mentre in un contesto patologico, la sovraespressione di tale fattore determina neoangiogenesi aberrante con formazione di capillari anomali e successivamente apoptosi delle cellule endoteliali stesse. Questa contraddizione suggerisce che la via di segnalazione di VEGF nell'endotelio retinico potrebbe risultare alterata a causa dell'ambiente diabetico. Il ruolo trofico di VEGF, infatti, è mediato dall'attivazione di VEGFR-2, il quale a sua volta innesca due cascate di segnalazione: da un lato si attiva la via PI3K/Akt, implicata nei processi di sopravvivenza cellulare e omeostasi vascolare, e dall'altro la chinasi p38 MAPK, la quale è coinvolta nei processi pro-apoptotici di diversi tipi cellulari, fra cui le cellule endoteliali. Nella retina diabetica caratterizzata da iperglicemia, è stato osservato un aumento della produzione di ROS, fra cui monossido di azoto, anione superossido e il loro prodotto di combinazione, il perossinitrito.

In questo contesto, numerosi studi, condotti in condizioni di iperglicemia o in presenza di perossinitrito esogeno, hanno evidenziato uno squilibrio fra le due cascate di segnalazione, a favore del processo pro-apoptotico mediato dalla chinasi p38. In queste condizioni, infatti, si verifica l'inibizione della via PI3-Akt, mediata dalla nitratura della tirosina delle subunità p85 e p110 di PI3K. Questo si traduce in un aumento della

fosforilazione e conseguente attivazione di p38 MAPK, che a sua volta stimola il processo pro-apoptotico (Gerber et al. 1998).

1.4.1 CASCATA PKCBETA/HUR/VEGF

Nella retina diabetica, la condizione di ipossia stimola la trascrizione e la conseguente espressione di VEGF attraverso l'attivazione sinergica di vari mediatori, tra cui spicca il fattore HIF-1. Quest'ultimo è costituito da una subunità α , inducibile, e da una subunità β , costitutivamente espressa. In condizioni di ipossia aumenta l'espressione della subunità α che stimola la trascrizione di geni coinvolti nell'angiogenesi, nella proliferazione e nel metabolismo del glucosio.

La sovraespressione di VEGF è un processo a cui contribuiscono diversi fattori: oltre all'azione di molecole come il fattore di crescita IGF (*Insulin-like Growth Factor*), le specie reattive dell'ossigeno e le citochine infiammatorie, un ruolo cruciale è svolto dai meccanismi post-trascrizionali a livello del trascritto di VEGF. In particolare, numerosi studi evidenziano come in condizioni fisiologiche l'mRNA di VEGF risulti estremamente labile, mentre in scenari più critici come l'ipossia la sua emivita possa aumentare anche di 2-3 volte. Questo è dovuto alla presenza di specifiche proteine presenti nella cellula, le *RNA-binding proteins* (RBP), le quali sono in grado di legare l'mRNA in corrispondenza di sequenze specifiche e agire a livello post-trascrizionale come modulatori positivi dell'espressione genica (Pascale et al. 2005).

In particolare, nel caso di VEGF numerosi studi hanno dimostrato che in condizioni ipossiche il suo RNA messaggero viene stabilizzato da specifiche RBP denominate ELAV (*Embryonic Lethal Abnormal Vision*): si tratta di una famiglia di quattro proteine, di cui tre membri neurone-specifici (HuB, HuC e HuD) e uno ubiquitariamente espresso (HuR) (Pascale et al. 2005). Nei mammiferi, le ELAV presentano un grado di omologia di sequenza pari al 75-80% e sono costituite da tre domini di riconoscimento in grado di legare l'mRNA bersaglio, denominati *RNA recognitions motifs* (RRM1, RRM2 e RRM3). Nello specifico, RRM1 e RRM2 legano il filamento di mRNA di VEGF grazie al riconoscimento di specifiche sequenze consenso denominate ARE (*Adenine and Uracile-Rich Element*), prevalentemente localizzate a livello della regione 3' non tradotta (3' UTR). Il terzo dominio (RRM3), invece, risulta separato dai primi due da una sequenza

‘cerniera’ e, attraverso l’interazione con la coda di poli(A) dell’ mRNA, contribuisce alla stabilizzazione del complesso RNA-proteina (Darnell 2013).

In questo scenario, numerose evidenze suggeriscono che lo stato iperglicemico caratterizzante il diabete inneschi l’attivazione di PKC a livello delle cellule retiniche che, a sua volta, sarebbe responsabile dell’aumento dell’espressione di VEGF. Sebbene la famiglia delle protein chinasi sia ubiquitaria e coinvolta in una vasta gamma di processi cellulari, è l’isoforma β II (PKC β II) a risultare preferenzialmente attivata nel tessuto retinico. Tale attivazione selettiva rappresenta un passaggio critico che può contribuire in modo determinante allo sviluppo degli stadi precoci della retinopatia. Inoltre, è stato dimostrato che l’attivazione della proteina PKC β II sia in grado, attraverso la proteina ELAV/HuR, di aumentare l’espressione di VEGF.

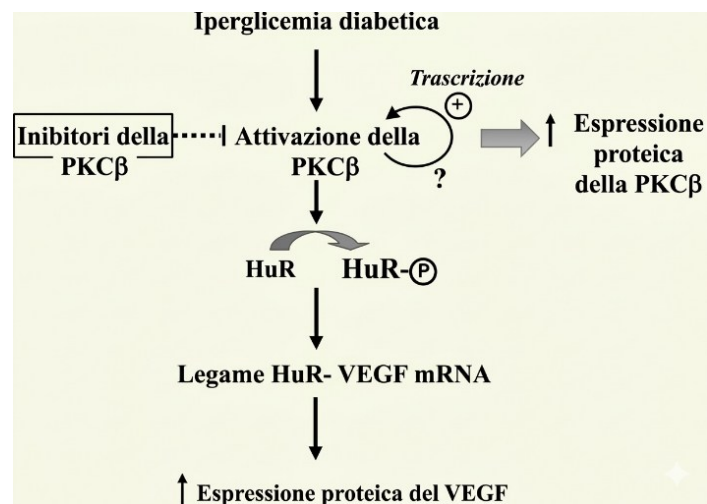


Figura 5. Cascata PKC β /HuR/VEGF (modificata da Amadio et al. 2010).

L’importanza della cascata molecolare PKC β II /HuR/VEGF è stata studiata e dimostrata attraverso diversi modelli sperimentali: *in vitro*, analizzando i periciti retinici bovini e *in vivo*, osservando le alterazioni nella retina di ratti diabetici (Amadio et al. 2010; Amadio et al. 2008).

Nel primo studio sono stati utilizzati dei periciti retinici, in quanto, come menzionato in precedenza, sono considerati importanti regolatori dello sviluppo, maturazione e rimodellamento vascolare. Essi, inoltre, interagiscono fortemente con le cellule endoteliali, permettendo così il mantenimento dell’omeostasi microvascolare attraverso un continuo *crosstalk*. Nello specifico, nei periciti retinici è stato dimostrato che

l'attivazione di PKC β II (indotta sperimentalmente da esteri del forbolo come il PMA) innesca una cascata molecolare precisa: l'enzima fosforila in serina la proteina ELAV/HuR che, in seguito alla sua attivazione, si lega all'RNA messaggero di VEGF, localizzato nell'area perinucleare e lo trasporta verso il citoscheletro. In questo compartimento, HuR forma dei complessi ribonucleoproteici (mRNP) che proteggono il trascritto dalla degradazione operata dalle nucleasi e lo indirizzano verso i polisomi, dove viene rapidamente tradotto in proteina. In questo contesto, è stato ipotizzato che una possibile alterazione di questa via molecolare possa contribuire alla perdita dei periciti e alle disfunzioni vascolari, eventi che caratterizzano gli stadi precoci della retinopatia diabetica (Amadio et al. 2008).

Al fine di confermare quanto osservato *in vitro*, sono stati successivamente condotti esperimenti *in vivo* sulla retina di ratti in cui è stato indotto il diabete tramite somministrazione di streptozocina (STZ). In particolare, in tale studio è stato dimostrato che il contenuto proteico di VEGF nella retina aumenta in seguito all'incrementata sintesi di diacilglicerolo indotta dall'iperglicemia e che tale aumento possa essere prevenuto dal trattamento con un inibitore selettivo di PKC β . Lo studio *in vivo* ha permesso di confermare il ruolo della cascata PKC β II/HuR/VEGF e di supportare, quindi, l'importanza cruciale dei meccanismi post-trascrizionali nella modulazione dell'espressione di VEGF (Amadio et al. 2010).

L'identificazione di questa cascata molecolare non solo chiarisce un nuovo livello di regolazione dell'espressione di VEGF nella retinopatia diabetica, ma suggerisce anche nuovi potenziali bersagli farmacologici utili a contrastare lo sviluppo e la progressione della patologia.

1.5 RECETTORE P2X7

P2X7 è un recettore purinergico ionotropico (P2X7R) appartenente a una famiglia di recettori fisiologicamente attivati in seguito al legame con l'adenosina trifosfato (ATP). Tale famiglia può essere classificata in due principali sottotipi: i recettori P1 e i recettori P2. I primi, costituiti da sette domini transmembrana, sono accoppiati a proteine G e si mostrano sensibili al legame con l'adenosina; i P2, invece, presentano come unico ligando

l'ATP extracellulare (eATP) e sono a loro volta distinti in recettori ionotropici (P2X), di cui fa parte P2X7R, e metabotropici (P2Y), anch'essi accoppiati a proteine G.

L'attivazione del recettore P2X7 si traduce in numerosi eventi biochimici, fra cui danno cellulare e rilascio di mediatori dell'infiammazione, motivo per cui è stato studiato come bersaglio farmacologico per numerosi disturbi infiammatori e neuro-infiammatori. In particolare, numerose evidenze pre-cliniche dimostrano come l'attivazione del recettore P2X7 sia implicata in diverse patologie retiniche correlate all'età, tra cui il glaucoma, la degenerazione maculare senile e la retinopatia diabetica (Platania et al. 2022).

Nello specifico, P2X7 è un recettore omo-trimerico e ciascuna subunità è costituita da 5 domini: un dominio extracellulare caratterizzato dal sito di legame per l'ATP, due domini transmembrana (1 e 2) e due domini intracellulari (uno N-terminale e uno C-terminale). Inoltre, agisce sia come canale ionico permeabile ai cationi (Na^{2+} , Ca^{2+} , K^{+}) sia come poro non selettivo: in presenza di eATP, infatti, è in grado di generare un ampio poro nella membrana plasmatica (definito 'macroporo') che consente il passaggio di molecole con peso molecolare fino a 900 Da (Sluyter et al. 2023; Lara et al. 2020). Questa dicotomia funzionale è associata a risposte cellulari opposte mediate da P2X7R, che spaziano dalla proliferazione alla morte cellulare, dal rilascio di citochine alla produzione di ROS. Un esempio cruciale è rappresentato dalla variante P2X7B: si tratta di una forma tronca del recettore che ha perso la capacità citotossica, ma mantiene quella di stimolare la crescita cellulare, dimostrando così come diverse porzioni del recettore gestiscano funzioni biologiche distinte (Andrejew et al. 2020; Lepre et al. 2023).

Il recettore P2X7 svolge un ruolo chiave nel sistema immunitario, in quanto viene espresso in maniera preferenziale dai macrofagi, dalle cellule dendritiche e dai linfociti B e T. In questo contesto, mediante l'efflusso di K^{+} , P2X7R determina l'attivazione dell'inflammasoma NLRP3 che, attraverso il reclutamento della caspasi-1, è responsabile del rilascio di citochine pro-infiammatorie, come IL-1 β e IL-18.

Il recettore P2X7 risulta espresso nella quasi totalità delle cellule retiniche, fra cui le cellule gliali (cellule di Muller), le cellule dell'epitelio pigmentato retinico, le cellule ganglionari, le cellule amacrine, le cellule orizzontali e i fotorecettori. Tale distribuzione diffusa spiega la sua centralità nella degenerazione retinica: il processo di morte cellulare mediato dal complesso inflammasoma NLRP2/P2X7R è infatti considerato il meccanismo chiave alla base delle principali patologie retiniche senili (Platania et al.

2022). In particolare, sono numerosi gli studi che supportano il ruolo del recettore P2X7 nello sviluppo e progressione della RD: la sua attivazione, infatti, si è dimostrata implicata nella distruzione della barriera emato-retinica, nella disfunzione e perdita dei periciti e nel danno neuronale retinico (Tassetto et al. 2021).

In condizioni diabetiche, infatti, gli elevati livelli di glucosio provocano uno stato di infiammazione cronica, danni tissutali e rilascio di citochine infiammatorie, fra cui IL-1 β e TNF α . Questi eventi sono responsabili della secrezione anomala di ATP extracellulare, che agisce come segnale di pericolo attivando P2X7R espresso dalle cellule retiniche. Una volta attivato, tale recettore promuove e amplifica lo stato infiammatorio cronico stimolando gli astrociti e le cellule di Muller a rilasciare ulteriori citochine e a sovraesprimere VEGF. Questo meccanismo rappresenta l'evento scatenante della rottura della barriera emato-retinica: l'eccesso di VEGF-A, infatti, agisce come un segnale distruttivo che promuove la degradazione delle giunzioni serrate (*tight junctions*), colpendo in modo selettivo proteine strutturali chiave come la claudina-5 e la zonula occludens-1 (ZO-1). La destabilizzazione di questo complesso proteico compromette l'integrità della barriera, determinando un incremento della permeabilità vascolare che culmina nell'insorgenza dell'edema retinico (Tassetto et al. 2021).

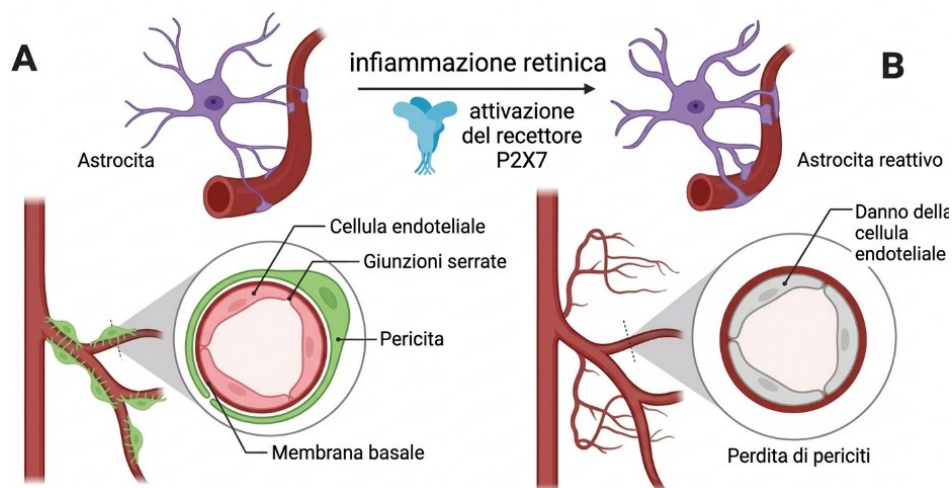


Figura 6. Infiammazione della retina dovuta all'attivazione del recettore P2X7: (A) barriera emato-encefalica sana; (B) danno cellulare e perdita del pericita (modificata da Platania et al. 2022).

L'influenza di P2X7R nella compromissione della struttura vascolare retinica è stata dimostrata in numerosi studi in cui venivano impiegati agonisti e antagonisti del recettore. È stato infatti osservato che, in condizioni diabetiche, anche minime concentrazioni di agonisti del recettore (es. BzATP) risultano sufficienti a innescare la formazione di macropori e processi apoptotici a livello retinico. A confermare il ruolo centrale di tale via patogenica, l'impiego dell'antagonista selettivo JNJ47965567 in modelli *in vitro* di cellule endoteliali retiniche esposte ad alto glucosio ha dimostrato capacità protettive cruciali. Il trattamento, infatti, ha consentito il recupero dell'integrità della barriera emato-retinica, ripristinando l'espressione delle proteine delle giunzioni serrate (claudina-5 e ZO-1) e i valori fisiologici di resistenza elettrica trans-endoteliale, un parametro che riflette l'integrità delle barriere cellulari. Inoltre, in studi più recenti, condotti utilizzando lo stesso inibitore selettivo JNJ47965567, si è evidenziata una riduzione significativa nell'espressione della proteina PLAV (*plasmalemma vesicle-associated protein*), la quale agisce come regolatore del trasporto di molecole attraverso le cellule endoteliali vascolari. I risultati hanno confermato che il blocco del recettore P2X7 impedisce la sovraespressione di PLAV indotta dall'elevata concentrazione di glucosio, che rappresenta una delle principali cause dell'edema retinico tipico della RD (Platania et al. 2025).

Infine, un approccio terapeutico emergente per il contrasto del danno vascolare retinico è rappresentato dall'impiego di relaxina H3, un composto peptidico strutturalmente simile all'insulina. In questo contesto, studi condotti *in vivo* su ratti diabetici STZ-indotti e *in vitro* su cellule HRMEC (*Human Retinal Microvascular Endothelial Cells*) hanno dimostrato come questa proteina sia in grado di contrastare i danni indotti da AGE. In particolare, relaxina H3 agisce sopprimendo l'asse P2X7R/NLRP3, riducendo così i processi di apoptosi e piroptosi, nonché la migrazione patologica a livello delle cellule endoteliali retiniche. L'efficienza di relaxina H3 nel preservare la struttura retinica e nel modulare le proteine dell'inflammasoma risulta sovrapponibile a quella ottenuta tramite l'inibizione diretta di P2X7R, confermando quest'ultimo come potenziale bersaglio farmacologico per preservare l'integrità della barriera emato-retinica in condizioni iperglicemiche (Yang et al. 2020).

1.6 DRUG REPURPOSING DI TENIPOSIDE

Rispetto ai metodi tradizionali *'de novo'* per la scoperta di nuovi farmaci, il *'drug repurposing'* (o riposizionamento farmacologico) si è affermato come una strategia estremamente efficace e vantaggiosa, grazie ai costi ridotti e i tempi di sviluppo significativamente più brevi. Il termine *'drug repurposing'* è stato coniato nel 2004 da T.T Ashburn e K. B Thor e viene definito come *'un processo di individuazione di nuovi impieghi terapeutici per farmaci esistenti, al di fuori dell'indicazione medica originale'* (Pinzi et al. 2024). In questo contesto, l'analisi sistematica di molecole già note ha dimostrato che molti farmaci ritenuti poco efficaci per le indicazioni originali possono presentare un potenziale terapeutico superiore se applicati a nuove patologie, sia come agenti singoli sia in combinazioni sinergiche.

I principali metodi che vengono impiegati nell'ambito del riposizionamento dei farmaci spaziano da metodi computazionali alle sperimentazioni biologiche, fino alla loro combinazione sinergica che consente di massimizzare l'efficienza del processo (Hua et al. 2022).

Il vantaggio principale di tale approccio è associato all'ottimizzazione dei costi di produzione, a causa dei tempi di sviluppo e di commercializzazione decisamente inferiori. Nel processo di *drug discovery* *'de novo'*, infatti, i costi medi necessari fino all'immissione in commercio di una nuova molecola sono stimati intorno a 1,24 miliardi, a causa delle molteplici fasi associate al processo di sviluppo e produzione: si parte dal *drug discovery*, a cui seguono gli studi pre-clinici, clinici e infine il monitoraggio *post-marketing*. Inoltre, a causa dei requisiti normativi severi in materia di sicurezza, efficacia e qualità, lo sviluppo di un farmaco *'de novo'* richiede mediamente fra i 12 e i 17 anni, ed è spesso associato a un elevato rischio di fallimento. Al contrario, il processo di *drug repurposing* accelera significativamente l'iter di produzione, riducendo i tempi a un intervallo compreso fra i 3 e i 12 anni. In aggiunta, il riposizionamento richiede investimenti minori rispetto all'approccio tradizionale, permettendo così anche a istituti e aziende con budget inferiori di restare competitivi attraverso l'innovazione (Hua et al. 2022).

Un significativo vantaggio di rilevanza etica del *drug repurposing* risiede nella drastica riduzione della sperimentazione animale. La maggior parte dei farmaci candidati, infatti, risulta già ampiamente caratterizzata sotto il profilo tossicologico e farmacologico per la

loro indicazione originale, è ciò consente di omettere numerosi studi *in vivo*. Questo approccio non solo accelera l'iter di approvazione e riduce il rischio di fallimento, ma si allinea perfettamente al principio delle 3R (*Replacement, Reduction, Refinement*), conformandosi con le direttive internazionali recenti che promuovono l'uso di modelli sperimentali alternativi e dati pre-clinici esistenti per limitare l'impiego di animali.

L'efficacia del riposizionamento farmacologico trova un riscontro significativo nello studio di diverse classi di molecole, fra cui numerosi agenti antitumorali. In questo contesto, l'attenzione si focalizza su teniposide (Figura 7), un derivato semisintetico della podofillotossina (sostanza naturale estratta dalla pianta *Podophyllum Peltatum*) che appartiene alla classe delle epipodofillotossine. Si tratta di un agente antineoplastico, principalmente utilizzato nel trattamento della leucemia linfoblastica acuta nei bambini, mentre in età adulta trova impiego nel trattamento del linfoma non-Hodgins. Viene inoltre utilizzato per altri tipi di tumore, inclusi il carcinoma mammario, ovarico e cerebrale (Fischer et al. 2014). Teniposide agisce come inibitore della topoisomerasi II, interferendo direttamente con la sintesi del DNA, attraverso la formazione di complessi che coinvolgono sia l'enzima sia l'acido nucleico. In condizioni normali, la topoisomerasi II taglia e ricuce il DNA al fine di modularne il superavvolgimento per le fasi di replicazione e trascrizione genica. Teniposide impedisce la fase di riassetto, provocando un accumulo di scissioni e rotture a livello del doppio filamento di DNA. Tali lesioni, che si manifestano principalmente nelle fasi S e G2, causano il blocco della progressione del ciclo cellulare. L'impossibilità di riparare il danno spinge quindi la cellula ad attivare i meccanismi di morte programmata per apoptosi.

Teniposide viene somministrato prevalentemente per via endovenosa, spesso in combinazione con altri chemioterapici e la sua disponibilità sul mercato varia a seconda dei vari Stati. Negli Stati Uniti, ad esempio, è stato approvato dalla FDA (*Food and Drug Administration*) nel 1992 e risulta tutt'ora in commercio con il nome di 'Vumon' in fiale da 10 mg/ml. In Italia, invece, teniposide è stato disponibile sul mercato fino a gennaio 2012, data in cui la sua autorizzazione all'immissione in commercio è stata revocata su rinuncia dalla ditta produttrice. Gli effetti citotossici di questo farmaco dipendono principalmente dal dosaggio utilizzato, in quanto commisurati al numero di rotture provocate dal farmaco a livello del doppio filamento del DNA. Inoltre, il dosaggio, il numero di somministrazioni e la durata del trattamento variano in base al paziente. Tra

gli effetti collaterali più comuni emergono la tossicità gastrointestinale (nausea, vomito, diarrea), affaticamento, alopecia ed eruzioni cutanee, a cui si possono aggiungere reazioni più specifiche e gravi, come mielodepressione, problemi respiratori, sepsi e reazioni anafilattiche.

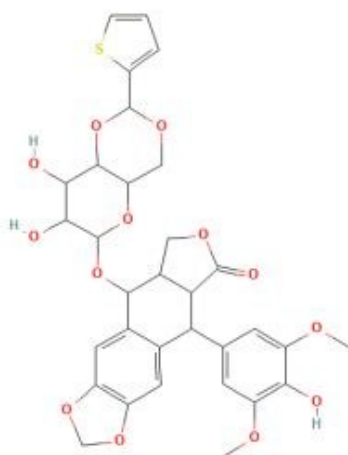


Figura 7: Struttura chimica del composto teniposide.

Negli ultimi anni, diversi studi hanno evidenziato una potenziale attività inibitoria di teniposide nei confronti del recettore P2X7. Tale proprietà lo rende un promettente candidato per strategie di *drug repurposing* nel trattamento di patologie neuroinfiammatorie, inclusa la retinopatia diabetica.

Nello specifico, sono stati condotti studi su cellule umane renali (HEK293; *Human embryonic kidney 293*), su cellule di melanoma umano (A375) e su microglia di topo (L929): i risultati mostrano come teniposide sia in grado di sopprimere la formazione di macropori indotta dall'elevata concentrazione di eATP a livello del recettore P2X7 (Fischer et al. 2014).

L'insieme delle evidenze raccolte suggerisce che teniposide non agisca solo come agente anti-neoplastico, ma possieda anche una spiccata attività anti-infiammatoria mediata dall'inibizione del recettore P2X7. Tale meccanismo sopprimerebbe l'attivazione dell'inflammasoma NLRP3, bloccando di conseguenza il rilascio di citochine pro-infiammatorie (IL-1 β e TNF α) e prevenendo la rottura della barriera emato-retinica. In questo scenario, teniposide si candida quindi come potenziale farmaco per il *drug repurposing* nel contesto della retinopatia diabetica: tale approccio permetterebbe di

colpire la cascata infiammatoria retinica nelle fasi precoci, offrendo una strategia terapeutica più efficace rispetto a quelle attualmente impiegate.

2.SCOPO DEL LAVORO

La retinopatia diabetica (RD) rappresenta una delle complicanze microvascolari più gravi e diffuse del diabete mellito, in quanto si configura come la principale causa di ipovisione nella popolazione adulta. Nonostante i progressi terapeutici degli ultimi anni, i trattamenti attuali (come farmaci anti-VEGF, fotocoagulazione laser e vitrectomia) presentano numerose criticità, in quanto invasivi e costosi per il paziente e soprattutto limitati alle fasi avanzate della patologia. A fronte di ciò, emerge la necessità di individuare nuovi approcci terapeutici in grado di intervenire precocemente sui meccanismi molecolari che innescano il danno neurovascolare nella retina. In questo scenario, il *drug repurposing* si delinea come una strategia innovativa e vantaggiosa, in quanto permette di identificare nuove indicazioni terapeutiche per molecole già approvate e sicure, riducendo drasticamente i tempi e i costi molto elevati della sperimentazione preclinica e clinica.

Il presente lavoro di tesi si inserisce proprio in questo filone di ricerca e si pone come obiettivo principale la valutazione del potenziale ruolo anti-angiogenico di teniposide, una molecola usata tradizionalmente come inibitore della topoisomerasi II e impiegata nel trattamento della leucemia linfoblastica acuta e del linfoma non-Hodgkin. Lo studio si è focalizzato sulla capacità di teniposide di agire come antagonista del recettore purinergico P2X7, la cui iperattivazione in condizioni di iperglicemia aumenta la produzione di specie reattive dell'ossigeno e di citochine infiammatorie, tra cui il fattore di crescita endoteliale vascolare VEGF. Quest'ultimo è inoltre il principale responsabile dell'aumento della permeabilità vascolare, della neo-angiogenesi e della conseguente formazione di micro-emorragie, fattori implicati nello sviluppo e nella progressione della patologia.

Nella fase iniziale del lavoro sono state analizzate e valutate numerose molecole tramite studi di *docking molecolare* e calcoli di *binding free energy* con lo scopo di identificare potenziali ligandi del recettore P2X7. I risultati dello studio hanno evidenziato teniposide come principale antagonista del recettore, di conseguenza è stato valutato il profilo di sicurezza di tale molecola tramite saggio MTT, con l'obiettivo di determinare la concentrazione idonea per gli esperimenti successivi (100 nM). Nello specifico, è stato utilizzato un modello sperimentale *in vitro* volto a simulare l'incremento di diacilglicerolo (DAG) dovuto all'iperglicemia. A tal fine, le cellule endoteliali (HUVEC)

sono state trattate con forbolo 12-miristato 13-acetato (PMA), un analogo strutturale e funzionale di DAG, alla concentrazione di 100 nM per 48 ore. Successivamente, attraverso tecniche biochimiche quali test ELISA e *Western blotting*, è stata valutata la capacità di teniposide di ridurre i livelli proteici del recettore P2X7 e di modulare la cascata PKC β II/HuR, la cui attivazione è implicata nel controllo post-trascrizionale positivo di VEGF.

In sintesi, il presente lavoro mira a fornire le basi sperimentali per proporre teniposide come potenziale candidato per il trattamento delle fasi precoci della RD, offrendo una nuova strategia terapeutica in grado di agire sui meccanismi neuroinfiammatori e pro-angiogenici che guidano la progressione della malattia.

3.MATERIALI E METODI

3.1 COLTURE CELLULARI E TRATTAMENTI *IN VITRO*

In questo lavoro di tesi sono state utilizzate colture di cellule endoteliali derivate dalla vena ombelicale umana (*Human Umbilical Vein Endothelial Cells*, HUVEC), le quali sono state fornite dalla ditta Sigma (Sigma-Aldrich, MO, USA). Le HUVEC (Figura 8) sono state piastrate all'interno di *flask* da 75 cm² e coltivate usando un terreno pronto all'uso e specifico per la crescita di tali cellule endoteliali (*Endothelial Cell Growth Medium*), anch'esso fornito dalla ditta Sigma (Sigma-Aldrich, Milano, Italia). Si tratta di un mezzo di coltura a basso contenuto di siero (5% v/v), formulato con nutrienti e fattori di crescita specifici per le cellule endoteliali, fra cui il fattore di crescita dei fibroblasti (FGF), il fattore di crescita insulino-simile (IGF-1) e VEGF. Successivamente, le cellule sono state mantenute all'interno di un incubatore a 37°C in atmosfera controllata al 5% di CO₂ e 95% di umidità.

Una volta determinata la vitalità cellulare tramite il saggio MTT (si veda paragrafo successivo), le HUVEC a confluenza sono state piastrate in *multiwell* da sei pozzetti (area pari a 9,6 cm²/pozzetto) e trattate con forbolo 12-miristato 13-acetato (PMA) alla concentrazione di 100 nM per 48 ore. Tale protocollo, ottimizzato in studi precedenti, permette di mimare l'incremento di diacilglicerolo (DAG), l'attivatore fisiologico di PKCβII, indotto dalla condizione di iperglicemia. Le cellule sono state poi trattate con il composto teniposide alla concentrazione ritenuta non citotossica (100 nm) per 48 ore.

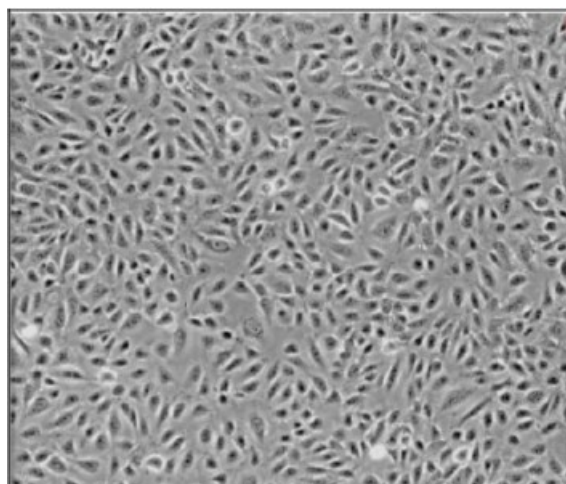


Figura 8. Cellule endoteliali della vena ombelicale umana (HUVEC) in coltura.

3.2 SAGGIO MTT

Al fine di determinare la vitalità delle cellule esposte a diverse concentrazioni del composto in esame, è stato condotto il saggio MTT (Figura 9): si tratta di un test colorimetrico *standard* per la valutazione della proliferazione cellulare basata sull'attività metabolica. In particolare, viene valutata la capacità degli enzimi succinato deidrogenasi mitocondriali di ridurre il bromuro di 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il) -2,5-difeniltetrazolio (MTT, Sigma-Aldrich), presente come sale tetrazolico giallo, a cristalli di formazano violacei. La presenza e la concentrazione di questi ultimi è stata quantificata mediante lettura spettrofotometrica, dove il grado di assorbanza risulta proporzionale all'attività mitocondriale (e quindi alla vitalità) delle cellule in esame.

Questo saggio è stato condotto usando due *multiwell* da 96 pozzetti e analizzando la vitalità delle cellule dopo 24 e 48 ore. Nello specifico, per entrambe le tempistiche è stato seminato in ogni pozzetto un volume pari a 200 µl di sospensione di cellule HUVEC in terreno, in modo da avere $3,5 \times 10^5$ cellule/pozzetto.

Dopo averle seminate, le cellule sono state trattate con teniposide alle concentrazioni di 100 nM, 1 µM, 10 µM e 100 µM e mantenute in incubatore per le tempistiche precedentemente citate. Al termine dei trattamenti, è stato aspirato il contenuto da ogni pozzetto e sono stati aggiunti 100 µl di terreno fresco. Successivamente, sono stati addizionati 50 µl/pozzetto di MTT, il quale era stato in precedenza solubilizzato in tampone fosfato salino (*phosphate-buffered saline, PBS*; Dulbecco) a una concentrazione pari a 2,5 mg/ml. Le piastre sono state mantenute in incubatore a 37°C per 3 ore, in modo da permettere la riduzione del sale da parte delle cellule vitali. I cristalli formati sono stati poi solubilizzati tramite l'aggiunta di 100 µl di dimetilsolfossido (DMSO, Sigma-Aldrich) e mantenuti in agitazione per 10 minuti per consentire la lisi delle membrane cellulari. Infine, la quantificazione del segnale colorimetrico è stata eseguita tramite lettura spettrofotometrica a un valore di lunghezza d'onda pari a 570 nm, con l'impiego di un lettore di piastre Synergy HT (*BioTek Instruments, VT, USA*) con l'utilizzo del programma "Gen5".

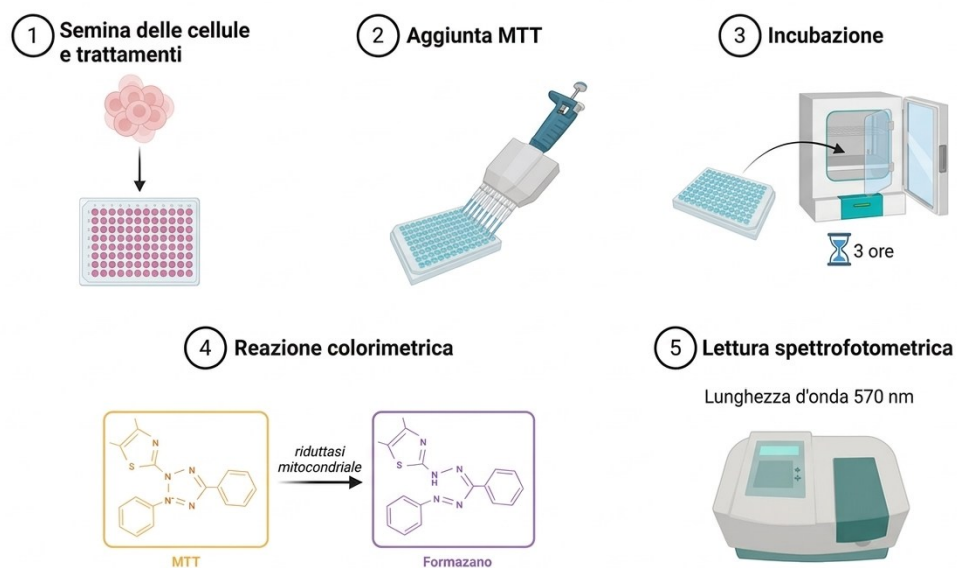


Figura 9. Passaggi chiave del saggio MTT.

3.3 PREPARAZIONE E OMOGENIZZAZIONE DEI CAMPIONI

Al termine del trattamento, il terreno di coltura è stato rimosso da ogni pozzetto ed è stato eseguito un lavaggio con PBS. In seguito, le cellule contenute in ogni pozzetto sono state trattate con 300 μ l di tampone di lisi cellulare (*Cell Lysis; Cell Signaling*) per cinque minuti in modo da consentire loro di lisarsi. Quest'ultimo è costituito da Tris HCl 20 mM a pH 7,5, NaCl 150 mM, EDTA 1mM, EGTA 1mM, Triton X-100 1%, $\text{Na}_4\text{P}_2\text{O}_7$ (pirofosfato di sodio) 2,5 mM, $\text{C}_3\text{H}_9\text{O}_6\text{P}$ (β -glicerofosfato) 1 mM, 1 μ g/ml di leupeptina, insieme a una miscela di inibitori di fosfatasi e proteasi in concentrazione 1:100 (Sigma-Aldrich). Successivamente, il contenuto di ogni pozzetto è stato raccolto all'interno di *ependorf* da 1,5 ml, sottoposto a sonicazione (3 volte per 20 secondi) alla potenza di 200 Watt, in modo da facilitare e garantire la completa rottura delle membrane cellulari. I campioni sono stati poi centrifugati a 200xg per 10 minuti ed è stato prelevato il solo surnatante. I campioni così ottenuti sono stati successivamente sottoposti a *Western blotting*, previa determinazione della concentrazione proteica di ciascuno attraverso il metodo Bradford. Quest'ultimo rappresenta il metodo colorimetrico più usato per quantificare il contenuto proteico di campioni in soluzione e prevede l'impiego del reagente Coomassie Brilliant Blue G-250. Il principio di tale metodo si basa sullo *shift* dell'assorbimento massimo del colorante da 465 nm a 595 nm, in seguito al legame con i

residui amminoacidici basici e aromatici delle proteine. La quantificazione proteica viene eseguita previa costruzione di una curva di calibrazione, ottenuta tramite diluizioni in serie di albumina sierica bovina (*Bovine Serum Albumine, BSA, Sigma-Aldrich*) a concentrazioni note. I valori di assorbanza, ottenuti con lettura spettrofotometrica a 595 nm, hanno permesso di determinare la concentrazione proteica di ciascun campione mediante interpolazione sulla curva di calibrazione.

3.4 WESTERN BLOTTING

Il *Western blotting* è una tecnica biochimica che consente di separare, identificare e quantificare proteine specifiche in un campione (Figura 10). Questo metodo impiega la SDS-PAGE, ovvero l'elettroforesi su gel di sodio-dodecil-fosfato e poliacrilammide, che consente di separare le proteine in funzione del loro peso molecolare.

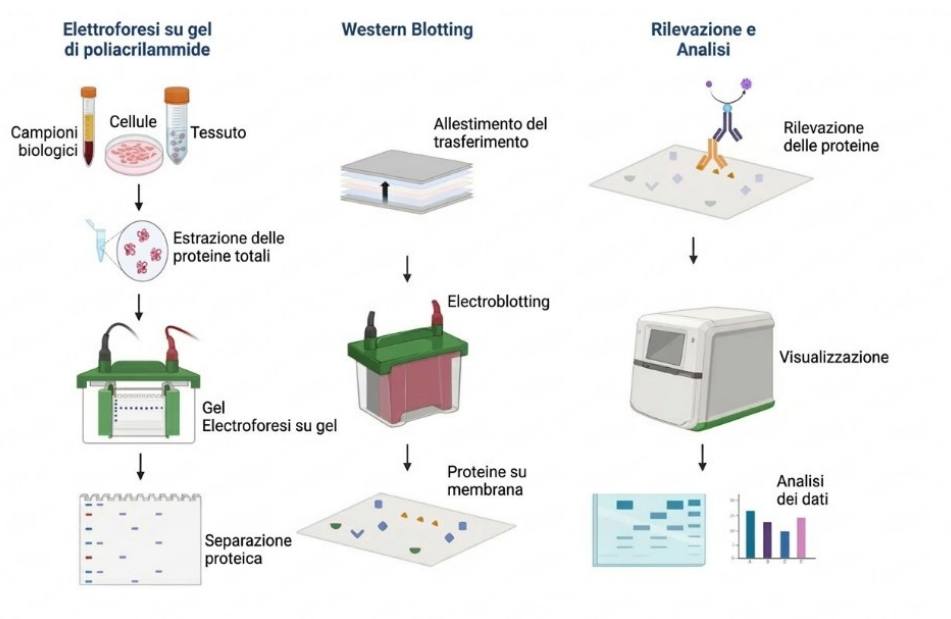


Figura 10. Protocollo sperimentale del metodo Western Blotting (modificata da Biorender.com).

I campioni in analisi sono stati preparati all'interno di *ependorf* da 1,5 ml, in cui si aggiunge un volume in rapporto 1:1 di *Sample Buffer 5X*, costituito da 40% Tris HCl 0,5 mM a pH 6,8, 10% di SDS, 20% di glicerolo, 10% di β -mercaptoetanolo e 0,05% di blu di bromofenolo. I campioni vengono poi scaldati a 95°C per 5 minuti per denaturare le

proteine e caricarle negativamente per la successiva corsa elettroforetica. I campioni vengono caricati nel gel all'interno di appositi pozzetti e, grazie all'applicazione della corrente elettrica, le proteine attraversano il gel di poliacrilamide e vengono attratte verso l'anodo, carico positivamente.

Nello specifico, è stato preparato un gel al 12% di poliacrilamide costituito da due fasi principali (Figura 11):

- *Stacking* (o gel di impaccamento), costituito da 5,1 ml di H₂O, 1,876 ml di Tris HCl 0,5 M pH 6,8, 844 µl di poliacrilamide, 75 µl di SDS 0,01%, 75 µl di persolfato di ammonio (APS) 0,01% e 15 µl di N,N,N',N'-tetrametiletildiammina (TEMED) 0,01%.
- *Running* (o gel di corsa), costituito da 8,4 ml di H₂O, 5 ml di Tris HCl 1,5 M pH 8,8, 6 ml di poliacrilamide, 200 µl di SDS 0,01%, 200 µl di APS 0,05% e 18 µl di TEMED 0,01%.

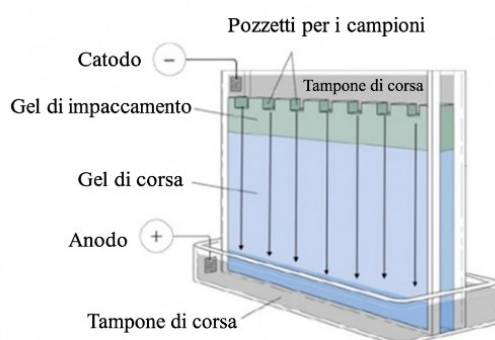


Figura 11. Rappresentazione del gel con i vari componenti.

La corsa elettroforetica avviene all'interno di un tampone di corsa (*Running buffer IX*), conservato in frigorifero, contenente Tris-HCl 0,025 M, glicina 0,2 M e SDS 3,4 mM, applicando un voltaggio di 120 V a temperatura ambiente. Per poter stimare il peso molecolare delle proteine di interesse, in uno dei pozzetti è stata caricata anche una miscela di proteine colorate di peso molecolare noto (*Amersham Biosciences*). Al termine della corsa elettroforetica, le proteine separate vengono trasferite elettroforeticamente dal gel a una membrana di nitrocellulosa di 0,2 µm di spessore, precedentemente

condizionata nel tampone di trasferimento (*Transfer buffer IX*). Quest'ultimo, anch'esso mantenuto in condizioni refrigerate, è costituito da Tris-HCl 0,025 M, glicina 0,2 M, 20% di metanolo e 0,02% di SDS al 10%. Il trasferimento avviene tramite la preparazione di una sorta di *sandwich* formato da sei strati: uno esterno costituito da una spugna, un foglio assorbente, il gel, la membrana di nitrocellulosa, un ulteriore foglio assorbente e il secondo strato esterno di spugna. A questo punto, il *sandwich* viene inserito all'interno della cella contenente il tampone di trasferimento e mantenuto per 2 ore a 250 mA. Al termine di tale procedura, la membrana viene trattata con il colorante *Red Ponceau* per 10 minuti che consente di visualizzare tutte le proteine che si sono trasferite sulla membrana di nitrocellulosa, oltre che ad accertare l'avvenuto trasferimento, e successivamente lavata con tampone TBS-T (Tris-HCl 10 mM, NaCl 100 mM e Tween-20 0,1%) per eliminare i residui del colorante. Al fine di saturare i siti aspecifici delle proteine, la membrana viene mantenuta in agitazione per 1 ora in una "soluzione di blocco" al 6% di latte in polvere in tampone TBS-T. Successivamente, la membrana viene incubata *overnight* con l'anticorpo primario, che sarà in grado di riconoscere e quindi legare in modo specifico la proteina di interesse. In particolare, per la determinazione di VEGF è stato utilizzato un anticorpo monoclonale prodotto nel coniglio (Abcam, Cambridge, MA, United States) diluito 1:1000 nella soluzione di blocco. Per normalizzare i valori relativi a VEGF, la membrana è stata successivamente incubata anche con l'anticorpo specifico per α -tubulina (Sigma Aldrich), consentendo in questo modo il confronto con una proteina *standard*.

Il giorno seguente, le membrane sono state lavate in tampone TBS-T (10 minuti per 4 volte), in modo da eliminare l'eccesso di anticorpo non legato alla proteina d'interesse e successivamente incubate per 1 ora, sotto agitazione e a temperatura ambiente, con l'anticorpo secondario specifico. Quest'ultimo è *anti-rabbit* (Jackson ImmunoResearch, MD, USA), è coniugato con l'enzima HRP (perossidasi di rafano) e diluito 1:3000 in tampone TBS-T contenente latte in polvere al 6%. Al termine dell'incubazione sono stati effettuati 3 lavaggi con tampone TBS-T per 10 minuti ciascuno, per poter rimuovere l'eccesso di anticorpo secondario che non si è legato alla membrana e che potrebbe dare dei segnali aspecifici. La rivelazione del segnale specifico delle bande immunoreattive viene effettuata tramite lo sviluppatore Amersham Imager 680 (*GE Healthcare Bio-Sciences AB*, Uppsala, Svezia). Le membrane vengono immerse in una soluzione per

chemiluminescenza a base di luminolo e perossidasi di idrogeno (ECL, *Enhanced ChemiLuminiscence*, Advansta, CA, USA), i quali permettono l'attivazione della perossidasi di rafano presente negli anticorpi secondari: questa reazione provoca l'emissione di luce direttamente proporzionale all'intensità del segnale. Infine, per l'analisi statistica è stato utilizzato il software *ImageJ* (scaricabile da <https://imagej.nih.gov/ij/download>), che ha consentito di quantificare l'intensità del segnale associato a ciascuna banda specifica della membrana.

3.5 TEST ELISA

L'espressione del recettore P2X7 nel lisato cellulare è stata valutata attraverso l'utilizzo di uno specifico kit ELISA (Enzo *LifeScience*, Farmingdale, NY, USA). Nel dettaglio, viene sfruttata la tecnica immunoenzimatica quantitativa 'a sandwich', che permette di rilevare e misurare in maniera altamente specifica la concentrazione di una proteina all'interno di un campione biologico (Figura 12). Per questo saggio è stata utilizzata una *multiwell* da 96 pozzetti, i quali sono stati preventivamente rivestiti con un anticorpo monoclonale biotinilato specifico per il recettore P2X7. Successivamente, gli *standard* e i campioni sono stati aggiunti nei relativi pozzetti in modo da permettere il legame fra la proteina P2X7 e l'anticorpo immobilizzato. Dopo aver rimosso le proteine non legate attraverso un lavaggio, è stato aggiunto un anticorpo policlonale specifico per P2X7 coniugato con un enzima (avidina-HRP) che permette la rilevazione legandosi in corrispondenza di un altro epitopo dell'antigene di interesse. Dopo un ulteriore lavaggio per rimuovere la porzione di anticorpo non legata, è stato aggiunto un substrato specifico che viene convertito in un prodotto colorato in seguito all'interazione con l'enzima. L'intensità del colore risulta direttamente proporzionale alla concentrazione del recettore P2X7 presente, ed è stata misurata attraverso lettura spettrofotometrica a 470 nm con l'impiego di un lettore di piastre Synergy HT (*BioTek Instruments*, VT, USA).

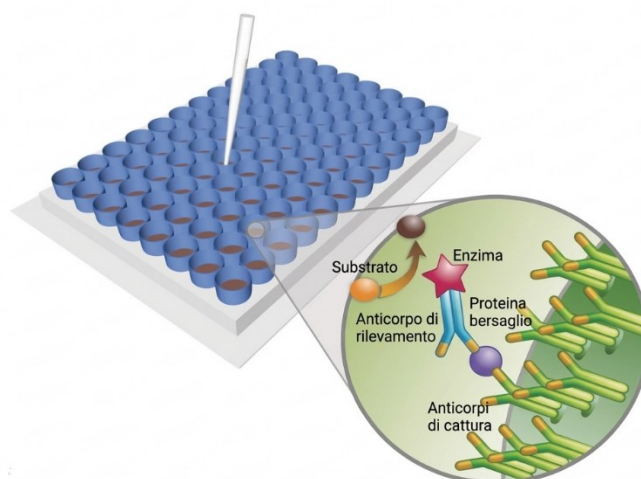


Figura 12. Schema rappresentativo del test ELISA indiretto: nei pozzetti della multiwell è stato immobilizzato un anticorpo primario specifico per l'antigene di interesse. In seguito, è stato aggiunto un ulteriore anticorpo primario (coniugato a un enzima) specifico per la proteina presente nel campione. Il segnale emesso dall'enzima viene rivelato attraverso l'aggiunta di un substrato, che permette lo sviluppo di un prodotto colorato, la cui intensità è direttamente proporzionale alla concentrazione della proteina bersaglio presente nel campione.

3.6 IMMUNOPRECIPITAZIONE

Per valutare e quantificare la fosforilazione della proteina HuR in serina, mediante l'utilizzo di un anticorpo *anti-phospho* HuR Ser221 (Merck Millipore, Merck, CA, USA), è stato condotto un esperimento di immunoprecipitazione. Per ciascun campione sono stati utilizzati 50 μ l di resina *A/G Plus Agarose* (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA), i cui siti aspecifici erano stati in precedenza saturati attraverso l'incubazione (per 1 ora a 4°C) della stessa con BSA al 5% in tampone NT2 (Tris HCl 50 mM pH 7,4, NaCl 150 mM, MgCl₂ esaidrato 1 mM, Igepal-Nonidet® P-40 0,05%). In seguito, la resina è stata centrifugata a 130xg per 5 minuti a 4°C, è stato rimosso il surnatante e il pellet ottenuto è stato incubato *overnight* con l'anticorpo specifico anti-HuR, precedentemente diluito in tampone NT2. Il quantitativo di anticorpo utilizzato è stato calcolato considerando un rapporto anticorpo/proteina 1:50, ovvero 1 μ g di anticorpo ogni 50 μ g di proteina presente nel campione. Il giorno seguente, il complesso proteina-anticorpo è stato centrifugato a 500xg per 5 minuti a 4° C e, dopo rimozione del surnatante, il pellet è stato lavato per 4 volte (4x5 minuti a 4°C) con tampone NT2 sotto

agitazione e nuovamente centrifugato a $130xg$ per 5 minuti a $4^{\circ}C$. L'immunoprecipitazione è stata condotta incubando 200 μg di lisato in tampone di immunoprecipitazione, costituito da NaCl 300 mM, Tris-HCl 20 mM, EDTA 2 mM, EGTA 2 mM, sodio vanadato 0,4 mM, Triton X-100 2%, con l'aggiunta di una miscela di inibitori di fosfatasi e proteasi per 2 ore sotto agitazione e a temperatura ambiente. Al termine delle 2 ore, i campioni sono stati centrifugati, lavati per 4 volte, addizionati di *sample buffer* (si veda paragrafo 3.4) e scaldati per 5 minuti a $95^{\circ}C$, in modo da consentire la denaturazione delle proteine per il *Western Blotting*.

3.7 ANALISI STATISTICA

I dati ottenuti sono stati analizzati mediante analisi della varianza (ANOVA), seguita da un opportuno test di comparazione *post hoc*, mediante l'uso del programma GraphPad Prism (*version 5.3 software GraphPad, San Diego, CA, USA*). Le differenze sono state considerate statisticamente significative quando $p \leq 0,05$.

4.RISULTATI

4.1 STUDI *IN SILICO*

Con l'obiettivo di individuare nuovi approcci terapeutici per il trattamento della retinopatia diabetica, è stata avviata un'attività di ricerca focalizzata sul *drug repurposing*, in collaborazione con il gruppo del Prof. Bucolo dell'Università di Catania. Lo studio si è focalizzato sul recettore umano P2X7 nella sua conformazione chiusa (PDB ID: 6U9V). Il recettore P2X7, come precedentemente menzionato, si è dimostrato un mediatore cruciale nella cascata infiammatoria e nello stress ossidativo coinvolti nella patologia. L'analisi ha previsto uno *screening* virtuale a partire da una libreria di 10.000 molecole approvate dalla *Food and Drug Administration* (FDA), le quali sono state processate attraverso una *pipeline* di *docking molecolare* a risoluzione crescente con lo scopo di predire l'interazione ligando-recettore. Inizialmente, le molecole sono state studiate attraverso i protocolli di *High-Throughput Virtual Screening* (Glide HTVS) e *Standard Precision* (Glide SP), in modo da ottenere una prima scrematura. I composti risultati più promettenti in questi primi studi sono stati successivamente analizzati mediante protocollo *Extra Precision* (Glide XP), che ha permesso di modellare con maggiore precisione le interazioni ligando-recettore. Infine, le molecole che hanno superato con successo lo stadio di docking più avanzato, sono state sottoposte all'analisi di *binding free energy* tramite calcoli di MM-GBSA (*Molecular Mechanics Generalized Born Surface Area*). Tale studio, attraverso la valutazione dell'energia libera di legame ($\Delta G_{binding}$), ha consentito di individuare i candidati con maggiore affinità teorica di legame per il recettore P2X7. Tali composti sono stati successivamente analizzati attraverso saggi funzionali mirati a valutare la loro attività biologica sui recettori P2X7 di origine umana, di topo e di ratto. Lo studio ha permesso di individuare alcuni candidati potenziali, fra cui il farmaco antitumorale teniposide è risultato essere il più promettente. Quest'ultimo, infatti, presenta un valore di $\Delta G_{binding}$ pari a -90,08 kcal/mol, indice di un'elevata affinità di legame per il recettore bersaglio (Tabella 1).

COMPOSTI	Punteggio MMGBSA sul modello hP2X7 a lunghezza intera (PDB 6U9V) (kcal/mol)
Tipranavir	-94,73
Bazedoxifene	-93,7
Teniposide	-90,08
Etoposide	-75,07
Nelfinavir	-46,61

Tabella 1. Risultati di virtual screening.

Attraverso i calcoli MM-GBSA e la successiva ottimizzazione, è stata confermata l'interazione tra teniposide e il recettore umano P2X7. Nello specifico, l'analisi ha evidenziato la predominanza di interazioni idrofobiche con residui situati sulle catene A, B e C della proteina (Figura 13).

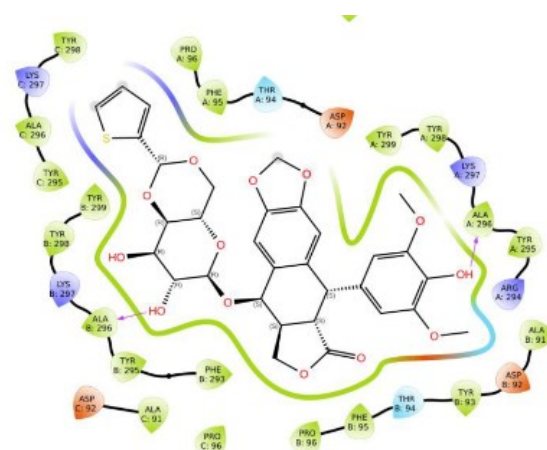


Figura 13. Rappresentazione 2D dell'interazione teniposide- proteina nel sito allosterico del recettore P2X7 umano.

Infine, sono stati condotti saggi funzionali FLIPR (*Fluorescence Imaging Plate Reader*) in modo da monitorare i livelli intracellulari di calcio (Tabella 2). Questa tecnica, infatti, impiega coloranti fluorescenti che emettono luce quando si legano a ioni come il calcio: la variazione della fluorescenza risulta proporzionale all'attività cellulare e permette così di valutare l'efficacia del composto nel modulare il recettore ionotropico in esame. I risultati ottenuti indicano che teniposide agisce come antagonista del recettore P2X7 umano, mentre non mostra alcuna attività nei confronti di quello derivato da topo e ratto.

Composti	Agonista	Agonista	Agonista	Antagonista	Antagonista	Antagonista
	umano	nel topo	nel ratto	umano	nel topo	nel ratto
Ligandi	pIC50	pIC50	pIC50	pIC50	pIC50	pIC50
zidovudina	inattivo	inattivo	inattivo	inattivo	inattivo	inattivo
teniposide	inattivo	inattivo	inattivo	5.44	inattivo	inattivo
atracurio besilato	inattivo	inattivo	inattivo	inattivo	4.83	inattivo
etoposide	inattivo	inattivo	inattivo	inattivo	inattivo	inattivo
nelfinavir mesilatio idrato	inattivo	inattivo	inattivo	inattivo	inattivo	inattivo
bazedoxifene acetato	inattivo	inattivo	inattivo	5.36	inattivo	

Tabella 2. Risultati ottenuti in seguito al saggio funzionale sul calcio (FLIPR calcium essay).
pIC50= concentrazione di inibitore enzimatico.

4.2 STUDI IN VITRO

Conclusi gli studi *in silico*, l'attività farmacologica di teniposide è stata indagata mediante saggi *in vitro* su cellule endoteliali della vena ombelicale umana (*Human Umbilical Vein Endothelial Cells*, HUVEC). Inizialmente è stato impiegato il saggio MTT al fine di determinare la vitalità delle cellule dopo l'esposizione al composto in esame. Quest'ultimo, previa solubilizzazione in dimetilsolfossido 1% (DMSO), è stato aggiunto in concentrazioni crescenti (100 nM, 1 µM, 10 µM e 100 µM) alle cellule in coltura ed è stato valutato il suo effetto sulla proliferazione cellulare dopo 24 e 48 ore. Come illustrato in figura 14, il profilo di citotossicità del composto è risultato pressoché sovrapponibile dopo 24 e 48 ore di trattamento. Nello specifico, mentre alla concentrazione 100 nM non si riscontrano variazioni della vitalità cellulare, le concentrazioni superiori (1 µM e 10 µM) inducono un progressivo decremento della stessa, che tuttavia si mantiene al di sopra della soglia del 70%, limite convenzionale per la definizione di citotossicità. Una marcata riduzione della vitalità si osserva invece in corrispondenza della concentrazione massima saggiata (100 µM).

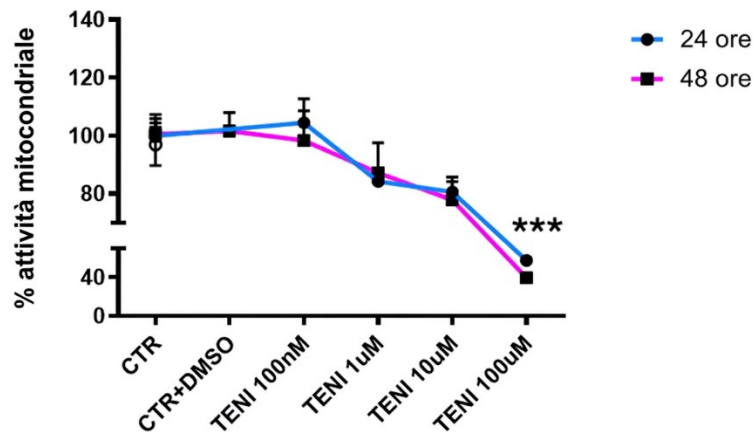


Figura 14. Effetto di teniposide sulla vitalità cellulare. Le cellule HUVEC sono state trattate per 24 e 48 ore con teniposide alla concentrazione 100 nM, 1 µM, 10 µM, 100 µM. La vitalità cellulare è stata valutata tramite saggio MTT. I valori di assorbanza sono espressi come media percentuale \pm E.S (CTR 100%); *** $p < 0,001$; $n = 16$. CTR=controllo; TENI= teniposide.

In funzione dei risultati ottenuti, è stata selezionata la concentrazione di 100 nM per gli esperimenti successivi. Le cellule sono state quindi trattate con forbolo 12-miristato 13-acetato (PMA) alla concentrazione di 100 nM per 48 ore. PMA è un analogo strutturale e funzionale del diacilglicerolo, un attivatore fisiologico di PKC β II, i cui livelli aumentano in condizioni di iperglicemia, come quella associata al diabete. Tale protocollo, precedentemente validato sulle stesse cellule HUVEC, è risultato idoneo a indurre l'incremento dell'espressione intracellulare e extracellulare di VEGF, un mediatore chiave del danno vascolare retinico (Fahmideh et al. 2022), come precedentemente sottolineato. Le cellule sono state trattate per 48 ore anche con teniposide alla concentrazione 100 nM, sia da solo sia in associazione con PMA. In seguito, si è proceduto a valutare gli effetti di tale esposizione sul recettore P2X7 e sulla cascata PKC β II/HuR/VEGF. L'effetto di teniposide sulla modulazione dei livelli del recettore bersaglio P2X7 è stato quantificato mediante il test ELISA sui lisati totali delle cellule. Come riportato in figura 15, il trattamento con il solo teniposide (TENI 100 nM) non modifica i livelli intracellulari di P2X7 rispetto a quelli del controllo, mentre in condizioni di co-trattamento con PMA (TENI 100 nM+ PMA), la molecola inibisce in maniera

significativa l'aumento dell'espressione del recettore indotto da PMA, riportando i livelli di P2X7 a valori comparabili con il controllo.

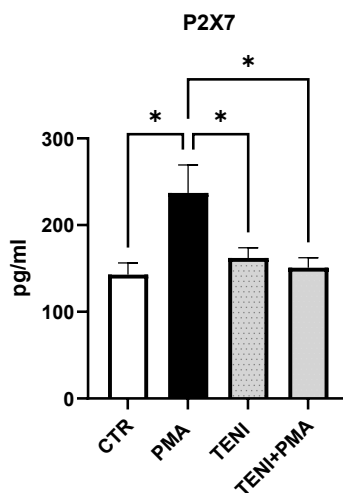


Figura 15 Effetto di teniposide sui livelli intracellulari di P2X7 in cellule HUVEC. Le cellule sono state trattate con PMA da solo (100 nM) o in combinazione con teniposide (100 nM) per 48 ore. I livelli di P2X7 sono stati valutati tramite test ELISA e i valori espressi in unità arbitrarie \pm E.S. * $p < 0.05$; *Dunnett's multiple comparisons post-hoc test*, $n = 3-6$. CTR: controllo, PMA: forbolo 12-miristato 13 acetato, TENI: teniposide.

Successivamente, è stata utilizzata la tecnica del *Western Blotting* per quantificare i livelli intracellulari delle proteine coinvolte nella cascata PKC β II/HuR/VEGF, normalizzando i valori ottenuti sul contenuto di α -tubulina. Per quanto riguarda PKC β II, anche in questo caso il trattamento con il solo teniposide non modifica i livelli intracellulari della proteina rispetto a quelli del controllo, mentre in condizioni di co-trattamento con PMA, la molecola inibisce l'aumento di PKC β II indotto da PMA, riportando la proteina ai valori ottenuti nelle cellule di controllo (Figura 16).

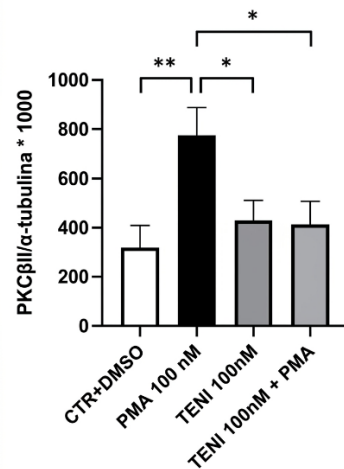


Figura 16. Effetto di teniposide sui livelli intracellulari di PKCβII in cellule HUVEC. Le cellule sono state trattate con PMA da solo (100 nM) o in combinazione con teniposide (100 nM) per 48 ore. I livelli di PKCβII sono stati normalizzati sul contenuto di α-tubulina e i valori espressi in unità arbitrarie ± E.S. *p<0.05, **p<0.01; *Dunnett's multiple comparisons post-hoc test*, n=3-6. CTR: controllo, PMA: forbolo 12-miristato 13 acetato, TENI: teniposide.

Nel caso della proteina HuR, invece, il trattamento con teniposide 100 nM non ha provocato cambiamenti significativi nei suoi livelli intracellulari rispetto alle cellule di controllo, come evidenziato in Figura 17 A. Di conseguenza, si è pensato di valutare la fosforilazione della proteina HuR attraverso esperimenti di immunoprecipitazione; la fosforilazione della proteina HuR è infatti un indice di attivazione della stessa. Dopo immunoprecipitazione, attraverso l'utilizzo dell'anticorpo specifico verso HuR, è stato possibile quantificare i livelli di fosforilazione nei residui di serina attraverso il caricamento degli immunoprecipitati in un gel di poliacrilammide sfruttando la tecnica del *Western Blotting*. Come mostrato in figura 17B, il trattamento con PMA induce un significativo aumento della fosforilazione della proteina HuR. Tale incremento viene contrastato da teniposide.

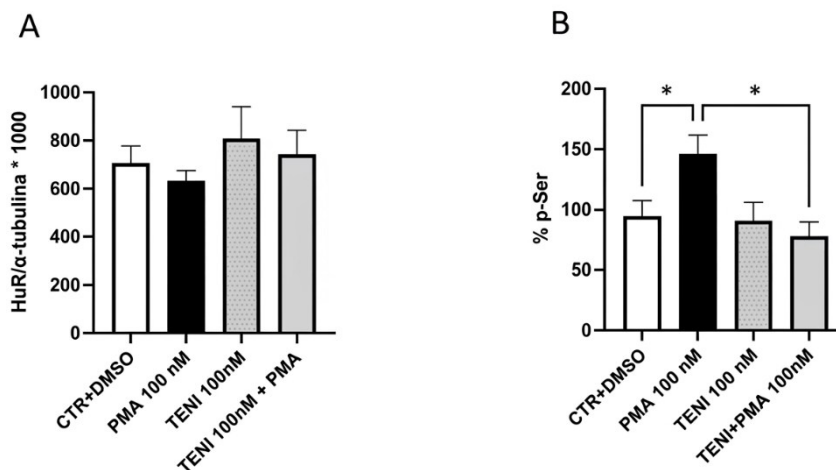


Figura 17. Effetto di teniposide sui livelli intracellulari di HuR e sulla sua fosforilazione in cellule HUVEC. Le cellule sono state trattate con PMA da solo (100 nM) o in combinazione con teniposide (100 nM) per 48 ore. Il contenuto proteico di HuR (A) e la sua fosforilazione in residui di serina (B) sono stati normalizzati sul contenuto di α -tubulina e i valori espressi in unità arbitrarie \pm E.S.; * $p < 0.05$; *Dunnett's multiple comparison post-hoc test*, $n=3-6$. CTR: controllo, PMA: forbolo 12-miristato 13 acetato, TENI: teniposide, p-Ser: fosforilazione in serina.

Infine, la proteina VEGF dimostra un andamento simile a quello riscontrato per PKC β II: anche in questo caso, il trattamento con teniposide da solo non modifica i livelli di espressione di VEGF rispetto a quelli di controllo, mentre in condizioni di co-trattamento con PMA, teniposide inibisce l'aumento di VEGF indotto dal solo PMA, riportando i valori della proteina a valori comparabili con quelli di controllo (Figura 18).

Questi risultati suggeriscono che questo farmaco, in queste condizioni sperimentali, è in grado di contrastare l'incremento di VEGF che si osserva in situazioni di iperglicemia, confermando un potenziale ruolo inibitorio sull'angiogenesi o su vie di segnalazione coinvolte nell'espressione di VEGF, fra cui la cascata PKC β II/HuR.

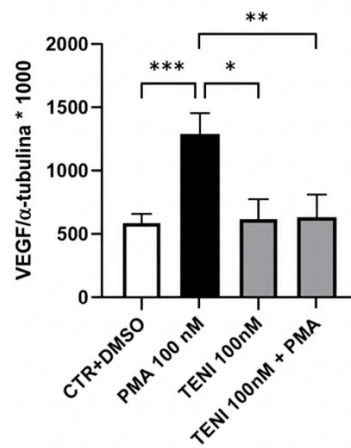


Figura 18. Effetto di teniposide sui livelli intracellulari di VEGF in cellule HUVEC. Le cellule sono state trattate con PMA da solo (100 nM) o in combinazione con teniposide (100 nM) per 48 ore. I livelli di VEGF sono stati normalizzati sul contenuto di α -tubulina e i valori espressi in unità arbitrarie \pm E.S. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$; *Dunnett's multiple comparisons post-hoc test*, $n = 3-6$. CTR: controllo, PMA: forbolo 12-miristato 13 acetato, TENI: teniposide.

5.DISCUSSIONE

La retinopatia diabetica (RD) è una delle complicanze microvascolari più gravi e invalidanti associate al diabete mellito, in quanto rappresenta una delle principali cause di cecità nella popolazione in età lavorativa. Si tratta di una patologia caratterizzata da una complessa eziologia multifattoriale, in cui la condizione di iperglicemia cronica innesca processi di stress ossidativo, infiammazione e danno all'unità neurovascolare della retina. La RD si distingue in due forme principali: la retinopatia diabetica non proliferante, che coincide con lo stadio iniziale, e la retinopatia diabetica proliferante, che è invece caratterizzata dalla formazione di neo-vasi, che sono fragili e tendono a dare origine a microemorragie. In questo contesto, il fattore di crescita endoteliale vascolare (VEGF) svolge un ruolo preminente, essendo implicato sia nell'aumento della permeabilità capillare sia nella neovascolarizzazione patologica.

Nonostante l'efficacia delle terapie attuali, come i trattamenti laser e le iniezioni intravitreali di farmaci anti-VEGF, queste presentano però limiti significativi: risultano costose e invasive per i pazienti e, soprattutto, intervengono prevalentemente nelle fasi tardive della patologia, quando il danno neurovascolare è già avanzato. In questo scenario, il presente lavoro di tesi si pone l'obiettivo di individuare nuove strategie terapeutiche capaci di modulare i meccanismi patogenetici precoci della RD, adottando l'approccio innovativo del *drug repurposing*. Questa strategia consente di identificare nuove indicazioni terapeutiche per farmaci già approvati per altri usi clinici, riducendo in maniera significativa i costi, i tempi e i rischi associati alle fasi iniziali della ricerca farmaceutica. In questo modo, si ha la possibilità di esplorare in tempi brevi e con costi minori nuovi *target* molecolari con maggiore probabilità di successo clinico.

L'obiettivo principale di questo studio è stato quello di individuare molecole che risultassero efficaci nel contrastare l'attivazione della cascata di segnalazione PKC β II/HuR. Questa cascata, infatti, svolge un ruolo centrale nella patogenesi della RD: l'iperglicemia cronica caratterizzante la patologia provoca un incremento di diacilglicerolo (DAG) che, a sua volta, attiva l'isoforma PKC β II. Questa chinasi è responsabile della fosforilazione di HuR, una proteina legante l'RNA che, una volta attivata, lega l'mRNA di VEGF determinando un aumento della sua espressione proteica. Questo evento è quindi un importante induttore dei processi che portano ad un aumento della permeabilità vascolare e a neovascolarizzazione. Inoltre, in questo studio

l'attenzione è posta sul recettore purinergico P2X7, quale principale *target* molecolare, in quanto la sua attivazione è nota per promuovere lo stress ossidativo e l'infiammazione che caratterizzano la patologia. Nello specifico, l'ipotesi di partenza è che l'attivazione del recettore ionotropico P2X7 induca un incremento dell'ingresso di calcio nella cellula che, a sua volta, contribuisca insieme a DAG, all'attivazione di PKC β II.

Nella fase iniziale del lavoro sono stati condotti studi *in silico* mediante *virtual screening* e *docking molecolare*, in collaborazione con il gruppo di ricerca del Prof. Bucolo dell'Università di Catania. Tali studi hanno consentito di individuare potenziali ligandi per il recettore P2X7, a partire da una libreria composta da 10.000 molecole approvate dalla FDA. Dai risultati ottenuti, tra i farmaci più promettenti è emerso teniposide, un agente antitumorale appartenente alla classe degli inibitori della topoisomerasi II e usato principalmente nel trattamento della leucemia linfoblastica acuta e del linfoma non-Hodgkin. Successivamente, sono stati condotti studi *in vitro* che hanno consentito di valutare la tossicità di teniposide a diverse concentrazioni (100 nM, 1 μ M, 10 μ M, 100 μ M) su cellule endoteliali vascolari (HUVEC). Si tratta di cellule primarie, in quanto isolate direttamente da un tessuto dell'organismo, e rappresentano uno dei modelli maggiormente utilizzati nello studio delle funzioni endoteliali, tra cui l'angiogenesi, l'infiammazione e i meccanismi di permeabilità vascolare. I dati ottenuti hanno permesso di selezionare la concentrazione di 100 nM come la più idonea per condurre gli esperimenti successivi, in cui le cellule sono state trattate con il farmaco per 48 ore. Inoltre, le HUVEC sono state trattate con PMA alla concentrazione di 100 nM: tale protocollo è stato precedentemente validato e ottimizzato in un modello sperimentale *in vitro* e consente di mimare l'incremento di diacilglicerolo, l'attivatore fisiologico di PKC β II, indotto dalla condizione di iperglicemia (Fahmideh et al. 2022).

A tale riguardo, i risultati del test ELISA e di *Western Blotting* evidenziano un aumento dell'espressione del recettore P2X7 e della cascata PKC β II/HuR/VEGF in seguito al trattamento con il solo PMA. Il trattamento delle cellule con teniposide alla concentrazione 100 nM è in grado di contrastare l'effetto di PMA, riportando i livelli intracellulari di P2X7 e delle proteine coinvolte nella cascata a valori comparabili a quelli delle cellule di controllo. Questo suggerisce che il farmaco, bloccando il recettore P2X7, impedisce l'ingresso di calcio all'interno della cellula e la conseguente attivazione della cascata PKC β II/ HuR, nonché, a valle, la sovraregolazione della proteina VEGF. Va

inoltre sottolineato che teniposide contrasta l'aumento di VEGF senza però sopprimere la produzione fisiologica di tale proteina, la quale svolge anche funzioni protettive per le cellule endoteliali. Infatti, come riportato in Figura 18, non viene riscontrata alcuna differenza significativa nei livelli di VEGF fra i controlli e le cellule trattate con il solo teniposide: questi risultati avvalorano l'ipotesi che l'attivazione della cascata sia responsabile esclusivamente di una produzione anomala di VEGF (Fahmideh et al. 2022). In riferimento alla capacità di teniposide di contrastare l'aumento dell'espressione del recettore P2X7, indotta da PMA, è possibile che questo avvenga attraverso la stessa cascata PKC β II/HuR. Il recettore P2X7 contiene infatti numerose sequenze ARE nel suo trascritto (dati non pubblicati), quindi potrebbe essere un nuovo bersaglio della proteina HuR. L'aumento dei livelli del recettore P2X7 dopo esposizione a PMA potrebbe quindi essere una conseguenza dell'attivazione della cascata PKC β II/HuR, che viene contrastata dal trattamento con teniposide.

Sebbene teniposide sia noto come inibitore della topoisomerasi II, l'efficacia a concentrazioni nanomolari (100 nM) dimostrata in questo studio suggerisce un meccanismo alternativo legato al recettore P2X7: questo farmaco agendo infatti come antagonista di P2X7R, permetterebbe di bloccare alla base lo stimolo infiammatorio che porta alla stabilizzazione di VEGF mediata da HuR.

In conclusione, la capacità di teniposide di "spegnere" la cascata PKC β II/HuR/VEGF attraverso l'inibizione del recettore P2X7 offre un razionale solido per un suo possibile impiego nel trattamento delle fasi precoci della retinopatia diabetica in cui VEGF gioca un ruolo fondamentale. Tuttavia, il passaggio dai modelli sperimentali *in vitro* alla pratica clinica richiederebbe ulteriori approfondimenti. In primo luogo, risulterebbe necessario indagare l'efficacia e la sicurezza di teniposide attraverso studi su modelli *in vivo*, in cui si potrebbe valutare non solo la riduzione dei *marker* biochimici implicati nella progressione della RD, ma anche il mantenimento dell'integrità della barriera emato-retinica. In secondo luogo, un aspetto cruciale da considerare riguarda la modalità di somministrazione di tale farmaco. Teniposide, infatti, viene principalmente impiegato come agente antitumorale grazie alla sua azione citotossica di inibizione della topoisomerasi II, perciò il suo riposizionamento nel trattamento della RD impone lo sviluppo di formulazioni specifiche a livello oculare. L'impiego di formulazioni topiche o sistemi a rilascio controllato intraoculare potrebbero garantire il raggiungimento di

concentrazioni efficaci a livello retinico, minimizzando l'assorbimento sistemico e i potenziali effetti collaterali legati alla sua attività come antitumorale.

6. BIBLIOGRAFIA

- Ahmad A & Nawaz MI (2022) Molecular mechanism of VEGF and its role in pathological angiogenesis. *J of Cellular Biochemistry* 123, 1938–1965.
- Alfadhli EM (2015) Gestational diabetes mellitus. *SMJ* 36, 399–406.
- Amadio M, Bucolo C, Leggio GM, Drago F, Govoni S & Pascale A (2010) The PKC β /HuR/VEGF pathway in diabetic retinopathy. *Biochemical Pharmacology* 80, 1230–1237.
- Amadio M, Pascale A, Cupri S, Pignatello R, Osera C, D'Agata V, D'Amico AG, Leggio GM, Ruozi B, Govoni S, Drago F & Bucolo C (2016) Nanosystems based on siRNA silencing HuR expression counteract diabetic retinopathy in rat. *Pharmacological Research* 111, 713–720.
- Amadio M, Scapagnini G, Lupo G, Drago F, Govoni S & Pascale A (2008) PKC β II/HuR/VEGF: A new molecular cascade in retinal pericytes for the regulation of VEGF gene expression. *Pharmacological Research* 57, 60–66.
- American Diabetes Association (2014) Diagnosis and classification of diabetes mellitus. *Diabetes Care* 37 Suppl 1, S81-90.
- Andrejew R, Oliveira-Giacomelli Á, Ribeiro DE, Glaser T, Arnaud-Sampaio VF, Lameu C & Ulrich H (2020) The P2X7 Receptor: Central Hub of Brain Diseases. *Front. Mol. Neurosci.* 13, 124.
- Arrigo A, Aragona E & Bandello F (2022) VEGF-targeting drugs for the treatment of retinal neovascularization in diabetic retinopathy. *Ann Med* 54, 1089–1111.
- Barillari G (2020) The Anti-Angiogenic Effects of Anti-Human Immunodeficiency Virus Drugs. *Front. Oncol.* 10, 806.
- Boote C, Sigal IA, Grytz R, Hua Y, Nguyen TD & Girard MJA (2020) Scleral structure and biomechanics. *Progress in Retinal and Eye Research* 74, 100773.
- Ceriello A & Prattichizzo F (2021) Variability of risk factors and diabetes complications. *Cardiovasc Diabetol* 20, 101.
- Cheung N, Mitchell P & Wong TY (2010) Diabetic retinopathy. *The Lancet* 376, 124–136.
- Darenskaya MA, Kolesnikova LI & Kolesnikov SI (2021) Oxidative Stress: Pathogenetic Role in Diabetes Mellitus and Its Complications and Therapeutic Approaches to Correction. *Bull Exp Biol Med* 171, 179–189.
- Darnell RB (2013) RNA Protein Interaction in Neurons. *Annu. Rev. Neurosci.* 36, 243–270.
- Dey R Diabetes Mellitus: A comprehensive review of pathophysiology, management, and emerging therapeutic approaches. *Journal of Diabetes medication & care* (2023) Volume 6, Issue 4.

- DiMeglio LA, Evans-Molina C & Oram RA (2018) Type 1 diabetes. *The Lancet* 391, 2449–2462.
- Fahmideh F, Marchesi N, Campagnoli LIM, Landini L, Caramella C, Barbieri A, Govoni S & Pascale A (2022) Effect of troxerutin in counteracting hyperglycemia-induced VEGF upregulation in endothelial cells: a new option to target early stages of diabetic retinopathy? *Front. Pharmacol.* 13, 951833.
- Fischer W, Urban N, Immig K, Franke H & Schaefer M (2014) Natural compounds with P2X7 receptor-modulating properties. *Purinergic Signalling* 10, 313–326.
- Fu Z, Gilbert ER & Liu D (2013) Regulation of insulin synthesis and secretion and pancreatic Beta-cell dysfunction in diabetes. *Curr Diabetes Rev* 9, 25–53.
- Geraldes P & King GL (2010) Activation of protein kinase C isoforms and its impact on diabetic complications. *Circ Res* 106, 1319–1331.
- Gerber H-P, McMurtrey A, Kowalski J, Yan M, Keyt BA, Dixit V & Ferrara N (1998) Vascular Endothelial Growth Factor Regulates Endothelial Cell Survival through the Phosphatidylinositol 3'-Kinase/Akt Signal Transduction Pathway. *Journal of Biological Chemistry* 273, 30336–30343.
- Hua Y, Dai X, Xu Y, Xing G, Liu H, Lu T, Chen Y & Zhang Y (2022) Drug repositioning: Progress and challenges in drug discovery for various diseases. *Eur J Med Chem* 234, 114239.
- Kang Q, Dai H, Jiang S & Yu L (2022) Advanced glycation end products in diabetic retinopathy and phytochemical therapy. *Front Nutr* 9, 1037186.
- Kang Q & Yang C (2020) Oxidative stress and diabetic retinopathy: Molecular mechanisms, pathogenetic role and therapeutic implications. *Redox Biol* 37, 101799.
- Karti O & Saatci AO (2024) Fenofibrate and diabetic retinopathy. *Med Hypothesis Discov Innov Ophthalmol* 13, 35–43.
- Krause M & De Vito G (2023) Type 1 and Type 2 Diabetes Mellitus: Commonalities, Differences and the Importance of Exercise and Nutrition. *Nutrients* 15, 4279.
- Lara R, Adinolfi E, Harwood CA, Philpott M, Barden JA, Di Virgilio F & McNulty S (2020) P2X7 in Cancer: From Molecular Mechanisms to Therapeutics. *Front. Pharmacol.* 11, 793.
- Lepre CC, Russo M, Trotta MC, Petrillo F, D'Agostino FA, Gaudino G, D'Amico G, Campitiello MR, Crisci E, Nicoletti M, Gesualdo C, Simonelli F, D'Amico M, Hermenean A & Rossi S (2023) Inhibition of Galectins and the P2X7 Purinergic Receptor as a Therapeutic Approach in the Neurovascular Inflammation of Diabetic Retinopathy. *IJMS* 24, 9721.
- Li H, Liu X, Zhong H, Fang J, Li X, Shi R & Yu Q (2023) Research progress on the pathogenesis of diabetic retinopathy. *BMC Ophthalmol* 23, 372.

- Li W, Chen S, Mei Z, Zhao F & Xiang Y (2019) Polymorphisms in Sorbitol-Aldose Reductase (Polyol) Pathway Genes and Their Influence on Risk of Diabetic Retinopathy Among Han Chinese. *Med Sci Monit* 25, 7073–7078.
- Lin K, Hsih W, Lin Y, Wen C & Chang T (2021) Update in the epidemiology, risk factors, screening, and treatment of diabetic retinopathy. *J of Diabetes Invest* 12, 1322–1325.
- Lucier J & Mathias PM (2026) Type 1 Diabetes. In *StatPearls*. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing.
- Marchesi N, Fahmideh F, Boschi F, Pascale A & Barbieri A (2021) Ocular Neurodegenerative Diseases: Interconnection between Retina and Cortical Areas. *Cells* 10, 2394.
- Nilay A & Thool AR (2022) A Review of Pathogenesis and Risk Factors of Diabetic Retinopathy With Emphasis on Screening Techniques. *Cureus*.
- Nowak DG, Amin EM, Rennel ES, Hoareau-Aveilla C, Gammons M, Damodoran G, Hagiwara M, Harper SJ, Woolard J, Lodomery MR & Bates DO (2010) Regulation of Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF) Splicing from Pro-angiogenic to Anti-angiogenic Isoforms. *Journal of Biological Chemistry* 285, 5532–5540.
- Ong KL, Stafford LK, McLaughlin SA, Simon I, Vos, Theo (2023) Global, regional, and national burden of diabetes from 1990 to 2021, with projections of prevalence to 2050: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2021. *The Lancet* 402, 203–234.
- Pascale A, Amadio M, Scapagnini G, Lanni C, Racchi M, Provenzani A, Govoni S, Alkon DL & Quattrone A (2005) Neuronal ELAV proteins enhance mRNA stability by a PKC α -dependent pathway. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 102, 12065–12070.
- Peach CJ, Mignone VW, Arruda MA, Alcobia DC, Hill SJ, Kilpatrick LE & Woolard J (2018) Molecular Pharmacology of VEGF-A Isoforms: Binding and Signalling at VEGFR2. *Int J Mol Sci* 19, 1264.
- Penn JS, Madan A, Caldwell RB, Bartoli M, Caldwell RW & Hartnett ME (2008) Vascular endothelial growth factor in eye disease. *Progress in Retinal and Eye Research* 27, 331–371.
- Petersmann A, Müller-Wieland D, Müller UA, Landgraf R, Nauck M, Freckmann G, Heinemann L & Schleicher E (2019) Definition, Classification and Diagnosis of Diabetes Mellitus. *Exp Clin Endocrinol Diabetes* 127, S1–S7.
- Pinzi L, Bisi N & Rastelli G (2024) How drug repurposing can advance drug discovery: challenges and opportunities. *Front. Drug Discov.* 4, 1460100.
- Platania CBM, Drago F & Bucolo C (2022) The P2X7 receptor as a new pharmacological target for retinal diseases. *Biochemical Pharmacology* 198, 114942.
- Platania CBM, Lazzara F, Mitton K, Haque N, Dailey W, Conti F, Giuffrida E, Drago F, Hermenean A, Balta C, Herman H, Ciceu A, Trotta MC, D’Amico M, Nicosia G, Rossi S & Bucolo C (2025) Blockade of P2X7 receptors preserves blood retinal barrier integrity by modulating the plasmalemma vesicle-associated protein: Implications for diabetic retinopathy. *British J Pharmacology* 182, 2603–2620.

- Pushparani DS, Varalakshmi J, Roobini K, Hamshapriya P & Livitha A (2025) Diabetic Retinopathy-A Review. *CDR* 21, e310524230559.
- Rahman MS, Hossain KS, Das S, Kundu S, Adegoke EO, Rahman MdA, Hannan MdA, Uddin MJ & Pang M-G (2021) Role of Insulin in Health and Disease: An Update. *IJMS* 22, 6403.
- Rosenstein JM, Krum JM & Ruhrberg C (2010) VEGF in the nervous system. *Organogenesis* 6, 107–114.
- Sadikan MZ & Abdul Nasir NA (2023) Diabetic retinopathy: emerging concepts of current and potential therapy. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch Pharmacol* 396, 3395–3406.
- Shin ES, Sorenson CM & Sheibani N (2014) Diabetes and retinal vascular dysfunction. *J Ophthalmic Vis Res* 9, 362–373.
- Shyam M, Sidharth S, Veronica A, Jagannathan L, Srirangan P, Radhakrishnan V & Sabina EP (2025) Diabetic retinopathy: a comprehensive review of pathophysiology and emerging treatments. *Mol Biol Rep* 52, 380.
- Sluyter R, Adriouch S, Fuller SJ, Nicke A, Sophocleous RA & Watson D (2023) Animal Models for the Investigation of P2X7 Receptors. *IJMS* 24, 8225.
- Sridhar M (2018) Anatomy of cornea and ocular surface. *Indian J Ophthalmol* 66, 190.
- Subramanian S, Khan F & Hirsch IB (2024) New advances in type 1 diabetes. *BMJ* 384, e075681.
- Takagi H (2018) Novel strategy for screening of diabetic retinopathy. *J of Diabetes Invest* 9, 726–727.
- Tan T-E & Wong TY (2023) Diabetic retinopathy: Looking forward to 2030. *Front. Endocrinol.* 13, 1077669.
- Tassetto M, Scialdone A, Solini A & Di Virgilio F (2021) The P2X7 Receptor: A Promising Pharmacological Target in Diabetic Retinopathy. *IJMS* 22, 7110.
- Teo ZL, Tham Y-C, Yu M, Chee ML, Rim TH, Cheung N, Bikbov MM, Wang YX, Tang Y, Lu Y, Wong IY, Ting DSW, Tan GSW, Jonas JB, Sabanayagam C, Wong TY & Cheng C-Y (2021) Global Prevalence of Diabetic Retinopathy and Projection of Burden through 2045. *Ophthalmology* 128, 1580–1591.
- Tokarz VL, MacDonald PE & Klip A (2018) The cell biology of systemic insulin function. *Journal of Cell Biology* 217, 2273–2289.
- Wang W & Lo ACY (2018) Diabetic Retinopathy: Pathophysiology and Treatments. *IJMS* 19, 1816.
- Wang Y, Eshwaran R, Beck SC, Hammes H-P, Wieland T & Feng Y (2023) Contribution of the hexosamine biosynthetic pathway in the hyperglycemia-dependent and -independent breakdown of the retinal neurovascular unit. *Mol Metab* 73, 101736.
- Wilcox G (2005) Insulin and insulin resistance. *Clin Biochem Rev* 26, 19–39.

- Wilkinson CP, Ferris FL, Klein RE, Lee PP, Agardh CD, Davis M, Dills D, Kampik A, Pararajasegaram R, Verdaguer JT, & Global Diabetic Retinopathy Project Group (2003) Proposed international clinical diabetic retinopathy and diabetic macular edema disease severity scales. *Ophthalmology* 110, 1677–1682.
- Wright WS, Eshaq RS, Lee M, Kaur G & Harris NR (2020) Retinal Physiology and Circulation: Effect of Diabetes. In R. Terjung, ed. *Comprehensive Physiology*. Wiley, pp.933–974.
- Wu Y, Ding Y, Tanaka Y & Zhang W (2014) Risk factors contributing to type 2 diabetes and recent advances in the treatment and prevention. *Int J Med Sci* 11, 1185–1200.
- Yang K, Liu J, Zhang X, Ren Z, Gao L, Wang Y, Lin W, Ma X, Hao M & Kuang H (2020) H3 Relaxin Alleviates Migration, Apoptosis and Pyroptosis Through P2X7R-Mediated Nucleotide Binding Oligomerization Domain-Like Receptor Protein 3 Inflammasome Activation in Retinopathy Induced by Hyperglycemia. *Front. Pharmacol.* 11, 603689.
- Ye W, Luo C, Huang J, Li C, Liu Z & Liu F (2022) Gestational diabetes mellitus and adverse pregnancy outcomes: systematic review and meta-analysis. *BMJ* 377, e067946.
- Zaccardi F, Webb DR, Yates T & Davies MJ (2016) Pathophysiology of type 1 and type 2 diabetes mellitus: a 90-year perspective. *Postgraduate Medical Journal* 92, 63–69.