

INDICE

Summary	1
Riassunto	3
<u>1. INTRODUZIONE</u>	5
1.1 Estrogeni	5
1.1.1 I recettori degli estrogeni	5
1.1.2 Gli elementi responsivi agli estrogeni	9
1.1.3 Meccanismo d'azione dei recettori degli estrogeni	9
1.1.4 Ligandi selettivi per le due isoforme recettoriali	12
1.1.5 Effetti anti-infiammatori degli estrogeni	14
1.1.6 Ruolo degli estrogeni nel sistema cardiovascolare	14
1.2 Monossido di azoto nel sistema vascolare	16
1.2.1 Ruolo fisiologico di NO	18
1.2.2 Danno vascolare e NO	18
1.3 Diabete	19
1.3.1 Diabete insulino-dipendente	20
1.3.2 Diabete non insulino-dipendente	20
1.3.3 Complicazioni del diabete mellito	21
1.3.4 Disfunzione endoteliali nel diabete	22
1.3.5 Diabete e cellule muscolari	23
1.4 Estrogeni, NO e diabete	25
<u>2. SCOPO DEL LAVORO</u>	27
<u>3. MATERIALI E METODI</u>	29
3.1 Animali	30
3.2 Induzione del diabete	30
3.3 Colture cellulari	30
3.4 Protocollo di stimolazione delle SMC	31
3.5 Colture d'organo	32
3.6 Dosaggio proteico	32

3.7 Determinazione dell'espressione proteica mediante western blotting	33
3.8 Dosaggio dei nitriti	34
3.9 Immunocitochimica	34
3.10 Trasfezione transiente	35
3.11 Materiali	35
3.12 Analisi statistica	36
<u>4. RISULTATI</u>	37
4.1 Immunocitochimica per α-actina nelle cellule muscolari lisce controllo e diabetiche	38
4.2 Effetto degli agonisti selettivi per ERα ed ERβ sull'espressione di iNOS in SMC controllo e diabetiche stimulate con citochine	40
4.3 Effetto degli agonisti selettivi sulla liberazione di NO nel medium	42
4.4 Effetto degli agonisti selettivi sull'espressione di P-ERK1-2	44
4.5 Il diabete non influenza l'attività trascrizionale dei recettori degli estrogeni nelle SMC	46
4.6 Gli agonisti selettivi per le due isoforme recettoriali degli estrogeni prevengono la traslocazione di p65	47
4.7 Effetto dei composti estrogenici sull'espressione della NO sintetasi inducibile nella parete vascolare di topo	49
4.8 Livelli di glicemia negli animali wild-type e negli animali knock-out per i recettori degli estrogeni	51
4.9 Effetto del 17β-estradiolo sull'espressione di iNOS nella parete vascolare di animali knockout per ERα o ERβ	53
4.10 Gli animali knockout per il recettore ERβ sono predisposti alla tossicità da streptozotocina	55
<u>5. DISCUSSIONE</u>	57
<u>6. BIBLIOGRAFIA</u>	63

Recent large-scale clinical trials found a significantly lower incidence of diabetes in postmenopausal women on hormone replacement therapy despite no improvement in vascular outcomes. The mechanisms accounting for this outcome, however, are largely unknown although estrogen is increasingly recognized as an important regulator of glucose homeostasis. Because the endogenous hormone binds to its receptors with identical affinity, the metabolic effects of individual estrogen receptor (ER) isoforms, ER α and ER β , are hard to entangle and appear to be tissue- and species-specific. Accordingly, there is little information as to how ER α and ER β affect the course and timeline of diabetic vascular dysfunction, which ultimately results in macrovascular complications of clinical relevance.

We previously demonstrated that estrogen's anti-inflammatory activity is attenuated in vascular smooth muscle cells (SMCs) from streptozotocin (STZ)-diabetic rats, which display ER β overexpression with respect to normoglycemic controls. The biological significance of ER β overexpression in vascular cells from diabetic rats is as yet unclear. Data from our group indicate that moderately selective ER β agonists induce the expression of inflammatory enzymes in rat vascular SMCs. There is also evidence that ER α mediates protective anti-inflammatory effects in vascular and nonvascular tissues including pancreatic β -cells. ER α -selective, but not ER β -selective agonists improve vascular function by mediating vessel relaxation at concentrations where receptor selectivity is maintained.

Based on this knowledge, we set out to assess the relative contribution of ER isoforms to the progression of experimental insulin-deficient diabetes and the accompanying vascular dysfunction in rodents through a comprehensive physiological and pharmacological approach using ER-deficient mice, cultured vascular SMCs and ER-selective agonists.

Primary cultures of vascular smooth muscle cells prepared from control and streptozotocin-injected rats were stimulated with a cytokine mixture comprising TNF- α , interleukin-1 β and interferon- γ for 24 h in the presence or absence of test compounds, the ER-selective agonists PPT and DPN. The increased expression of inducible NO synthase (iNOS), a classical indicator of vascular inflammation, was significantly reduced in a concentration-dependent manner by the ER α selective agonist PPT, while the ER β selective ligand DPN further enhanced iNOS expression.

To explore potential mechanisms of the distinct iNOS regulation mediated by ER α and ER β and the observed loss of regulation through ER α in SMCs from diabetic rats, we transfected both ER isoforms at increasing plasmide:reporter ratios into SMCs and measured ERE-TATA-luc activity after E₂ treatment. ER α and ER β transcriptional activity in response to 1 nmol/L E₂ treatment for 24 h consistently increased in both SMC groups. This suggests that the transcriptional machinery of ER isoforms is maintained in SMCs from diabetic rats.

The opposite regulation of iNOS function by ER-selective agonist in control SMCs could be secondary to differential modulation of nuclear p65 translocation, an important component of E2 anti-inflammatory action. Whereas LPS enhanced the nuclear staining of p65, PPT and DPN blocked this pathway, suggesting that ER-mediated iNOS control in vascular SMCs was independent from the NF- κ B system.

Fasting serum glucose levels were higher in ER α -/- compared with ER β -/- or wild-type (wt) mice. Diabetes was induced in 8-week-old mice by a single i.p. injection of STZ (150 mg/Kg). Despite similar worsening of glycaemic control, exposure to STZ caused significantly greater mortality in ER β -/- (41%) than in ER α -/- (12%) or wt (14%) mice. Vascular biology studies were performed in cultured aortic rings isolated from wt and ER-knockout mice. Aortic rings were stimulated with inflammatory agents in the presence and absence of test compounds. Treatment of isolated mouse aortic rings with 1 nM 17 β -estradiol for 24 h attenuated cytokine-driven formation of inducible NO synthase (iNOS) as detected by Western blotting. This effect was shared by the ER α -selective agonist PPT but not by the ER β -selective agonist DPN. Accordingly, 17 β -estradiol reduced iNOS formation in aortic rings from ER β -/- but not ER α -/- mice.

To sum up, combined use of ER-knockout mice and ER-selective agents provided evidence for an anti-inflammatory role for ER α as well as a potential pro-inflammatory role for ER β in the arterial wall. Cellular and animal experiments indicated that ER α and ER β play a relevant role in the control of glucose metabolism, vascular inflammatory responses and diabetes progression in rodents. Based on the present findings, ER α -selective activation may represent a promising pharmacologic approach to the therapeutic modulation of diabetic vascular dysfunction.

L'incidenza delle malattie cardiovascolari è significativamente diversa tra uomini e donne, in parte a causa di differenze nel profilo degli ormoni sessuali e di alcuni fattori di rischio; infatti, prima della menopausa, le donne sono meno a rischio per patologie cardiovascolari, aterosclerosi, ipertensione e ictus. Il diabete è una malattia caratterizzata da un quadro di infiammazione vascolare e disfunzione endoteliale. Nelle donne in premenopausa, questa patologia abolisce la protezione verso le malattie cardiovascolari.

Gli estrogeni agiscono principalmente legandosi a due distinte isoforme di recettori intracellulari, ER α ed ER β . I due recettori sono espressi in maniera tessuto-specifica e mediano azioni biologiche distinte, tra cui effetti anti-infiammatori nella parete vascolare e il controllo della sintesi di NO; nei vasi di soggetti diabetici, tuttavia, l'estrogeno sembra perdere il suo effetto protettivo.

Una prima parte del lavoro di tesi è stato focalizzato su una proteina chiave della disfunzione vascolare diabetica, la NO sintetasi inducibile (iNOS). Per azione di diverse citochine, i cui livelli sono alti nel diabete, e per l'aumentata attivazione della protein-chinasi C, nelle cellule muscolari lisce (SMC) vascolari viene indotta l'espressione della iNOS. Questa isoforma produce elevate quantità di NO che reagisce con i radicali liberi dell'ossigeno generati durante l'infiammazione, causando la formazione di perossinitriti, i principali mediatori degli effetti citotossici di NO. Nello studio sono state utilizzate SMC ottenute da ratti normoglicemici e diabetici. L'espressione della iNOS è stata indotta stimolando le SMC vascolari per 24 ore con una miscela di citochine costituita da LPS, IL1 β , TNF α ed IFN γ . L'estrogeno ha inibito la sintesi di iNOS nelle cellule di ratto normoglicemico ma non nelle cellule di ratto diabetico.

Per valutare meglio il contributo relativo di ciascuna isoforma nella modulazione della iNOS, sono stati utilizzati due agonisti recettoriali selettivi. Analogamente all'estradiolo, nelle SMC il trattamento con l'agonista α -selettivo PPT riduce i livelli della proteina iNOS solo nelle SMC controllo, risultando inefficace nelle SMC diabetiche, mentre il trattamento con DPN aumenta in maniera concentrazione-dipendente l'espressione e l'attività di iNOS nei due gruppi.

Per valutare se nelle SMC diabetiche il diverso profilo di azione degli agonisti estrogenici fosse dovuto ad una modificazione delle vie di trasduzione del segnale, è stato valutato uno dei principali enzimi che regolano gli effetti genomici indiretti degli estrogeni, p-ERK1-2. Successivamente è stato valutato

anche il coinvolgimento della via di NF- κ B, valutando la traslocazione di p65 nelle cellule in seguito al trattamento con gli agonisti selettivi dei recettori degli estrogeni.

Una parte delle cellule sono state trasfettate con le due isoforme recettoriali per verificare se l'attività trascrizionale fosse diversa nei due gruppi cellulari.

Poiché l'estrogeno è coinvolto nel metabolismo del glucosio e sembra esercitare un'azione protettiva sulle cellule β del pancreas, la seconda parte del lavoro si è incentrato sul ruolo delle due isoforme recettoriali nello sviluppo dell'iperglicemia e dell'infiammazione vascolare nel diabete utilizzando agonisti selettivi e topi knockout per ER α e ER β . I livelli di glucosio a digiuno nei topi ER α -/- sono più alti rispetto ai topi ER β -/- e wild-type (wt). Tre settimane dopo l'induzione del diabete mediante un'iniezione di streptozotocina (STZ, 150 mg/Kg), si è osservata un'elevata mortalità nei topi ER β -/- (41%) rispetto ai topi ER α -/- (12%) o wt (14%) malgrado valori simili di glicemia. Anelli isolati dell'aorta di questi animali sono stati stimolati con una miscela di citochine (TNF- α , IL-1 β , IFN- γ) per 24 h in presenza o assenza dei composti testati. Dopo la stimolazione, i livelli di espressione di iNOS sono misurabili mediante Western blotting. In presenza di estradiolo, tuttavia, i livelli di iNOS diminuiscono negli animali wt normoglicemici e diabetici. Tale effetto permane in presenza del PPT, agonista selettivo ER α , ma non in presenza di DPN, agonista selettivo ER β . In accordo, l'estradiolo riduce la formazione di iNOS negli anelli di aorta isolati dai topi ER β -/- ma non ER α -/-.

Questo studio dimostra il ruolo preponderante di ER α , che agisce con meccanismi diversi da ER β , nel controllo della risposta infiammatoria, suggerendo che agonisti selettivi per ER α potrebbero rivelarsi agenti terapeutici utili nella cura delle complicazioni macrovascolari nel diabete.

1. Introduzione

1.1 ESTROGENI

Gli estrogeni appartengono alla famiglia degli ormoni steroidei e ne rappresentano il prodotto terminale della complessa via biosintetica. La famiglia degli ormoni steroidei infatti deriva da un precursore comune, il colesterolo, del quale attraverso reazioni enzimatiche successive si generano progesterone, mineralcorticoidi, glucorticoidi, testosterone ed estradiolo.

Gli estrogeni sono ormoni coinvolti principalmente nella regolazione delle funzioni riproduttive nell'organismo. Tuttavia ormai da tempo sono stati riconosciuti per gli estrogeni effetti che esulano dalla modulazione dell'asse riproduttiva ipotalamo-ipofisi-ovaie e che coinvolgono una vasta varietà di cellule e tessuti diversi. Sono infatti ormai noti molteplici effetti dell'estradiolo a livello del sistema scheletrico, del sistema cardiovascolare e delle aree non-riproduttive del sistema nervoso centrale.

1.1.1 I RECETTORI DEGLI ESTROGENI

Gli estrogeni umani naturali, cioè il 17β -estradiolo e i suoi metaboliti principali (estrone, estriolo e idrossiestradiolo), svolgono le proprie funzioni legandosi al recettore degli estrogeni (ER). Ad oggi sono state clonate due isoforme recettoriali: ER α [Greene et al, 1986] ed ER β [Mosselman et al; 1996]. Entrambi i recettori appartengono alla superfamiglia dei recettori nucleari, ma sono sintetizzati da geni diversi e possiedono struttura e funzioni peculiari. Le due isoforme sono costituite da sei domini [Edwards 2005] e presentano elevata omologia di sequenza (96%) nella zona che lega il DNA, mentre hanno strutture distinte nel sito di interazione con i ligandi (53% di omologia); nella regione ammino-terminale i due recettori presentano maggiori differenze di sequenza [Mendelsohn e Karas, 1999]. Sono note varianti dovute a *splicing* alternativo sia dell'isoforma α sia dell'isoforma β ; in particolare è nota una variante di ER β con l'estremità N-terminale più lunga.

La regione N-terminale (dominio A/B) è altamente variabile e conferisce un'attività di promotore e cellulo-specifica al recettore, contribuendo alla sua specificità d'azione. Questa regione contiene almeno un dominio di transattivazione indipendente dal ligando chiamato *activation function* (AF-1). Tale dominio, tramite un'interazione di tipo proteina-proteina con i componenti della macchina trascrizionale, è responsabile dell'attivazione costitutiva della trascrizione genica.

La regione più conservata fra i vari domini dei recettori intracellulari è il dominio di legame al DNA (*DNA-binding-domain*, DBD) che contiene i domini

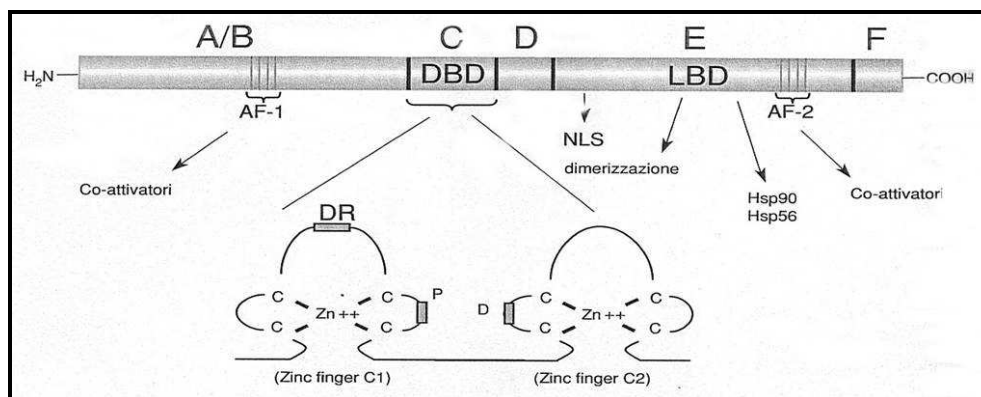
proteici responsabili del legame specifico al DNA a livello di siti caratterizzati dalla presenza di AGGTCA. Per il recettore degli estrogeni questo dominio è costituito da una sequenza di circa 60 amminoacidi di cui la maggior parte sono basici; in questo modo, la carica positiva che si viene a creare favorisce l'interazione con i residui fosforici, carichi negativamente, del DNA. E' stata individuata la presenza di due strutture digitiformi altamente conservate, gli *zinc-fingers*. I gruppi tiolici delle quattro cisteine di ciascun "dito" chelano uno ione Zn^{2+} . Dei due *zinc-fingers*, soltanto il primo è responsabile dell'interazione specifica con il DNA; la discriminazione degli specifici elementi responsivi a cui il recettore degli estrogeni si lega è definita dalla presenza di tre amminoacidi, posti alla base dello *zinc-finger* stesso. Il secondo *zinc-finger* interviene invece nella stabilizzazione di tale interazione ed è maggiormente coinvolto nella dimerizzazione.

Il dominio successivo, dominio D (*hinge region*), rappresenta una regione meno conservata e particolarmente flessibile, contiene le sequenze per la traslocazione nucleare.

Il dominio più vasto, moderatamente conservato, è il dominio E o LBD (*Ligand Binding Domain*), responsabile del legame col ligando. Il dominio E è associato a tre funzioni, principalmente indotte dal legame con agonisti: 1) il dominio AF-2 di transattivazione responsabile dell'attivazione trascrizionale ligando-dipendente; 2) una regione di dimerizzazione ricca di residui di leucina che favoriscono l'interazione con un altro monomero recettoriale attraverso la formazione di una sorta di "cerniera" di residui di leucina; 3) l'interazione con le proteine dello shock termico (*heat shock proteins*, HSP) che vengono liberate dal recettore in seguito al riarrangiamento conformazionale indotto dal riconoscimento del ligando. Il LBD è costituito da 12 α -eliche e due brevi foglietti β che si organizzano spazialmente a formare una struttura 3D detta *α -helical sandwich*. Il LBD è caratterizzato dalla presenza della funzione AF-2 che contiene, in posizione C-terminale, una α -elica anfipatica altamente conservata: l'elica H12, essenziale per la funzione di questo dominio. Gli amminoacidi compresi fra il 521-528 di questa elica sono fondamentali per il riconoscimento ed il legame dell'ormone mentre altri residui compresi fra il 515 ed il 535 variano a seconda della struttura del ligando in grado di attivare il recettore. Il legame di ligandi diversi dal punto di vista stereochimico altera la struttura terziaria del recettore degli estrogeni e determina un riposizionamento dell'intera regione AF-2 che a sua volta influenza il legame di proteine associate al recettore, ad esempio i coattivatori [Brzozowski et al, 1997]. In presenza di un agonista, l'elica H12 si ripiega sul LBD e

costituisce una sorta di coperchio che blocca l'entrata della cavità idrofobica. Questo spostamento porta all'esposizione di una particolare superficie della proteina costituita da porzioni dell'elica 3,4,5 e 12 e consente ai coattivatori di legarsi e di attivare la trascrizione. Quando, al contrario, nella cavità idrofobica del LBD si vanno a posizionare molecole come il raloxifene o il 4-OH-tamoxifene, l'elica H12 si sposta nella cavità stessa contenente il ligando e si va a posizionare nella fessura formata dalle eliche 3,4 e 5 impedendo in questo modo l'esposizione della superficie necessaria per il legame dei coattivatori e l'attivazione della trascrizione. Un simile cambiamento conformazionale del recettore, che influenza l'interazione con coattivatori e corepressori, determina il ruolo agonista o antagonista dei diversi ligandi. A seconda del promotore, del tipo di cellula e di ligando, il dominio AF-2 può agire indipendentemente dal dominio AF-1 o può interagire con questo per attivare la trascrizione.

I recettori contengono un ulteriore dominio nella porzione C-terminale, il dominio F, la cui struttura e funzione sono da chiarire. Sembra che questo dominio intervenga nel mantenere il recettore nella conformazione ottimale per l'instaurarsi delle interazioni proteina-proteina per avere una trascrizione efficiente.



Le due isoforme recettoriali sono ampiamente distribuite in tutti i tessuti. In riferimento al sistema cardiovascolare, esse sono state identificate nei cardiomiociti [Mendelsohn and Karas, 1999], nei macrofagi [Vegeto et al, 1999], nelle cellule endoteliali [Simoncini et al 2000; Bolego et al. 2005] e nelle cellule muscolari lisce di ratto [Zancan et al, 1999; Maggi et al, 2003] e umane [Mendelsohn, 2002].

1.1.2 GLI ELEMENTI RESPONSIVI AGLI ESTROGENI

I recettori degli estrogeni, come tutti i recettori nucleari, regolano la trascrizione interagendo con specifiche sequenze di DNA localizzate a livello dei geni bersaglio, denominate "elementi responsivi agli estrogeni" (ERE, *estrogen responsive elements*). Generalmente si trovano in stretta vicinanza del promotore, tuttavia le si può ritrovare anche all'interno di regioni *enhancer*, diverse chilobasi a monte del sito d'inizio di trascrizione.

1.1.3 MECCANISMO D'AZIONE DEI RECETTORI DEGLI ESTROGENI

A) Via classica ligando-dipendente

In assenza del ligando, il recettore degli estrogeni è sequestrato nel nucleo delle cellule bersaglio ed è complessato con proteine dello shock termico (*heat shock proteins*, Hsp) che lo mantengono nella conformazione inattiva. In seguito al legame con l'estrogeno, il recettore va incontro ad un cambiamento conformazionale che determina il distacco delle Hsp e facilita la dimerizzazione ed il legame del recettore agli elementi responsivi sul DNA situati sui geni bersaglio [Mc Donnell et al, 2002]. Le regioni del recettore coinvolte nella dimerizzazione sono localizzate su domini che contengono una regione ricca di amminoacidi idrofilici, in modo tale da organizzare spazialmente un' α -elica. Da questa struttura secondaria sporgono numerosi residui di leucina allineati che possono andare ad interagire con un'analogica struttura su un altro monomero recettoriale formando una sorta di cerniera di residui di leucina, detta *leucine zipper* che consente la dimerizzazione. L'ER può legarsi al DNA sia sottoforma di omodimero sia di eterodimero.

Il recettore utilizza entrambe le sue regioni di attivazioni AF-1 ed AF-2 per reclutare i cofattori.

Il legame del complesso ormone-recettore al DNA stabilizza il complesso d'inizio della trascrizione e favorisce il reclutamento dell'RNA polimerasi II per dare l'avvio alla trascrizione del mRNA specifico.

L'attività trascrizionale del recettore degli estrogeni può essere modulata attraverso un meccanismo di fosforilazione. Si è infatti osservato che l'ER è altamente fosforilato già in condizioni basali e che il legame dell'ormone comporta un incremento del grado di fosforilazione. L'introduzione dei gruppi fosforici è mediata da diversi enzimi dotati di attività protein chinasi: fra questi, i più importanti sono le MAPK che fosforilano i residui di serina posti all'interno di sequenze amminoacidiche consenso. La fosforilazione del recettore

può avvenire sia in risposta a dosi fisiologiche di 17β -estradiolo sia in assenza dell'ormone. Gli eventi di fosforilazione che riguardano il recettore degli estrogeni sono specifici per il tipo cellulare in cui sono stati osservati. Nelle cellule COS-1, ad esempio, la serina in posizione 118 è il sito della fosforilazione ligando-dipendente di $hER\alpha$, mentre nelle MCF-7 in presenza di estrogeni la casein chinasi II fosforila la Ser 167 di $hER\alpha$. La Ser 118 è uno degli amminoacidi più conservati per il recettore degli estrogeni lungo la scala evolutiva e riveste un ruolo importante nella modulazione della trascrizione a livello della regione AF-1, potenziando l'interazione con i coattivatori [Endoh et al. 1999]. La fosforilazione di Ser 167 aumenta invece la capacità del recettore di legare il DNA [Castano et al, 1997]

B) Via ligando-indipendente

Oltre al meccanismo classico di attivazione del recettore mediata dal legame del ligando, numerosi recettori nucleari possono essere attivati da proteine che fanno parte di varie vie di segnale. Alcune molecole, ad esempio, in seguito all'interazione coi corrispondenti recettori di membrana sono in grado di innescare cascate trasduzionali all'interno della cellula che possono determinare l'attivazione trascrizionale degli stessi. Il meccanismo molecolare alla base di questo fenomeno, detto *cross-talk*, resta ancora da chiarire nella sua completezza ma sembra, in molti casi, essere mediato da un processo di fosforilazione del recettore. I fattori di crescita, gli attivatori della protein chinasi A (PKA), i neurotrasmettitori e le cicline sono in grado di indurre l'attività trascrizionale del recettore anche in assenza di estrogeno [Cenni et al, 1999]. La fosforilazione della Ser 118 di $hER\alpha$ è indotta da EGF (*epidermal growth factor*) e dipende dall'attivazione delle MAPK [Kato et al, 1995]. Altri fattori di crescita coinvolti nell'attivazione di $ER\alpha$ sono l'insulina [Patrone et al, 1996], i fattori di crescita insulino simili I e II (IGF I ed IGF II) [Ma et al, 1994], e il $TGF\beta$ (*transforming growth factor*) [Ignar-Trowbridge et al, 1996]. Anche le cicline e le chinasi ciclino-dipendenti (CDK) sono coinvolte nell'attivazione ligando-indipendente di $ER\alpha$. Sono state identificate due diverse cicline, A e D1, in grado di attivare ER in modo ligando-indipendente. La sovraespressione di ciascuna di queste due proteine determina un aumento dell'attività di ER in assenza di estrogeni. L'attivazione di ER da parte della ciclina D1 non coinvolge la fosforilazione e quindi la presenza della corrispettiva CDK [Zwijssen et al, 1997]. La ciclina A invece attiva gli ER mediante fosforilazione, tramite CDK2 nel dominio AF-1 [Rogatsky et al, 1999].

L'attivazione di ER α in modo ligando-indipendente non avviene solo tramite la fosforilazione di residui di serina nel dominio AF-1, ma anche nel dominio AF-2. In questo processo è coinvolto il cAMP, che attiva la PKA [El Tanani et al, 1997]. Anche ER β può essere attivato in modo ligando-indipendente. Infatti l'EGF induce la fosforilazione delle Ser 106 e Ser 124 di ER β tramite l'attivazione delle MAP chinasi [Kato et al, 1995].

C) Via ERE-indipendente

I recettori degli estrogeni modulano l'espressione genica agendo anche su geni che non presentano ERE nei propri promotori. Ad esempio, IL-6 e TNF- α non possiedono elementi responsivi agli estrogeni nei loro promotori, ma è stato dimostrato come la loro trascrizione sia inibita dagli estrogeni. In questo caso gli ER non hanno un effetto trascrizionale diretto ma interagiscono con altri fattori di trascrizione.

Sia ER α che ER β possono interagire con il fattore di trascrizione AP1 (*activating-protein-1*): in seguito all'attivazione della via delle MAPK le due proteine jun e fos eterodimerizzano per formare il complesso AP1 [Edwards 2005]. A seconda del contesto cellulare e del gene trascritto l'estrogeno può attivare o sopprimere la trascrizione genica mediata da AP1. Infatti l'ER stimola la trascrizione del gene dell'ovalbumina per interazione con i dimeri jun/fos [Gaub et al, 1990] e potenzia l'attivazione di AP1 da parte dei fattori di crescita in cellule MCF-7 [Philips et al, 1993]. In altri contesti, l'estrogeno antagonizza l'azione di AP1, reprimendo l'espressione di TNF α [Srivastava et al, 1999] e di molecole di adesione come ICAM (*Intercellular Adhesion Molecole*) e VCAM-1 [Galea et al, 2002]. L'interazione di ER con AP1 può essere AF-dipendente o AF-indipendente. Nel primo caso si ipotizza che il recettore legato all'ormone prenda contatto attraverso l'AF-2 con i coattivatori già legati al complesso jun/fos, attivandoli così in modo ulteriore [Kushner et al, 2000]. Alternativamente, sembra che nel caso di promotori complessi, che contengono cioè diversi elementi responsivi in successione, anche AF-1 possa iperattivare il dimero jun/fos interagendo con i cofattori ad esso legati mentre ER si trova già posizionato in corrispondenza del suo specifico ERE.

Un altro esempio di azione indiretta sul DNA è l'interazione di ER con il fattore di trascrizione NF-kB: è stato dimostrato come l'estrogeno non altera né inibisce la degradazione di I κ -B β e l'attivazione di IKK. La regolazione dell'attivazione di NF-kB avviene attraverso l'attivazione di segnali a livello citoplasmatico; il

trattamento con estrogeno impedisce la traslocazione nucleare di p65 [Ghisletti et al, 2005].

D) Via non genomica

Gli estrogeni sono in grado di svolgere attività biologiche che non prevedono la modulazione genica, definite azioni non genomiche. Tali azioni sono troppo rapide per essere compatibili con la sintesi di RNA e di proteine, dal momento che si verificano entro pochi minuti dalla somministrazione dell'ormone e sono riprodotte in assenza di inibitori della trascrizione o della sintesi proteica. [Simoncini et al, 2002].

Gli effetti non genomici prevedono il coinvolgimento di secondi messaggeri come lo ione Ca^{2+} [Revankar et al, 2005], NO, il cAMP [Kelly et al, 2001], IP3 [Le Mellay et al, 1997], recettori a tirosina-chinasi quali EGFR, IGFR-1 e recettori accoppiati a proteine G. Inoltre l'estrogeno può attivare direttamente diverse chinasi come la PKA [Watters et al, 1998], la chinasi Ca^{2+} calmodulina-dipendente [Hayashi et al, 1994], la PI3K e le MAPK [Wade et al 2001].

Evidenze sperimentali suggeriscono che alcuni degli effetti non trascrizionali degli estrogeni siano mediati dalla presenza di recettori degli estrogeni di membrana, ancora non identificati. Le prime prove dell'esistenza di una sottopopolazione di recettori degli estrogeni di membrana risale alla fine degli anni 70 quando Pietras e Szego descrissero la presenza di siti di legame per l'estradiolo a livello della membrana citoplasmatica di cellule endometriali. [Pietras et al, 1977]. Si ritiene che i recettori degli estrogeni di membrana siano coinvolti in diverse vie di traduzione del segnale: alcuni gruppi hanno proposto che i recettori di membrana siano gli stessi $\text{ER}\alpha$ e $\text{ER}\beta$ che traslocano in membrana [Razandi et al, 2004], altri gruppi hanno indicato come i recettori di membrana siano nuovi membri della famiglia degli ER [Nadal et al, 2000], altri ancora hanno descritto i recettori di membrana come accoppiati alle proteine G [Kelly et al. 2003].

1.1.4 LIGANDI SELETTIVI PER LE DUE ISOFORME RECETTORIALI

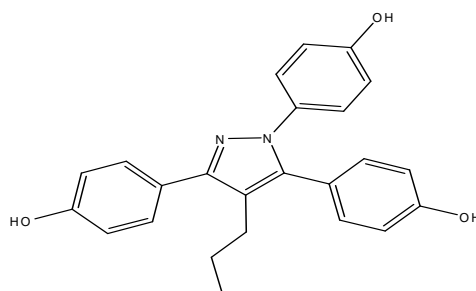
Il principale agonista fisiologico del recettore degli estrogeni è rappresentato dal 17β -estradiolo. L'estradiolo è il prodotto steroideo più abbondante della sintesi ovarica e viene sintetizzato principalmente durante la prima fase del ciclo ovarico delle cellule della teca. Altri estrogeni femminili, come l'estrone, l'estriolo ed il 2-OH-estradiolo, sono invece prodotti prevalentemente a livello epatico a partire dall'estradiolo o, in misura minore, nei tessuti periferici a partire

dall'androstenedione e altri androgeni. Anche alcune molecole naturali di origine vegetale, come la genisteina o il cumestrol, note con il nome di fitoestrogeni, mostrano attività estrogenica.

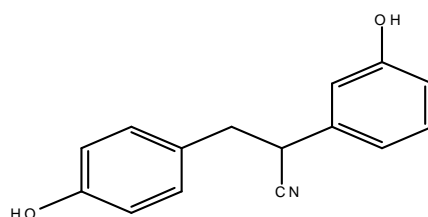
La scoperta delle due isoforme recettoriali ha portato recentemente allo sviluppo di agonisti e antagonisti selettivi per ER α ed ER β [Sun et al 2002; Harris et al, 2002].

I ligandi sviluppati finora sono:

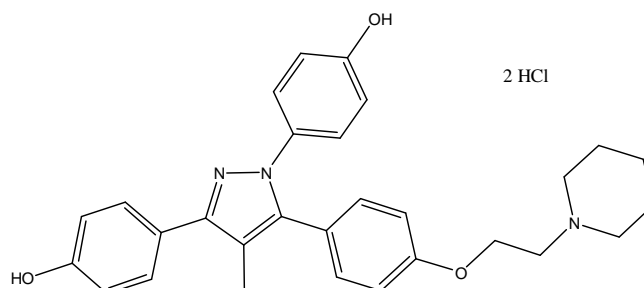
- 1,3,5-(4-idrossifenil)-4-propil-1H-pirazolo (PPT): agonista 410 volte più selettivo per ER α [Stauffer et al, 2000].



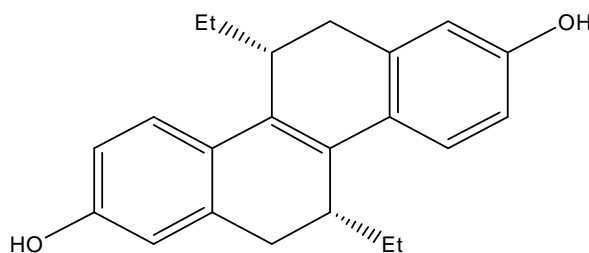
- 2,3-bis(4-idrossifenil)propionitrile (DPN): agonista per entrambe le isoforme recettoriali, ma con affinità di legame 70 volte maggiore verso ER β [Harrington et al, 2003]



- 1,3-bis(4-idrossifenil)-4-metil-5-[4-(2-piperidiniletossi)fenol]-1H-pirazolo (MPP): antagonista silente 200 volte più selettivo verso ER α [Sun et al, 2002].



- R,R 5,11-cis-dietil-5,6,11,12-tetra-idrocrisene-2,8-diolo (THC): antagonista pieno 4 volte più affine verso ER β [Sun et al, 1999].



1.1.5 EFFETTI ANTI-Infiammatori degli Estrogeni

Numerose evidenze mostrano come gli estrogeni possano avere effetti benefici in diversi processi patologici come l'osteoporosi, l'aterosclerosi, l'ictus nell'artrite reumatoide, la sclerosi multipla e l'Alzheimer. A seconda della patologia infatti, la mancanza di estrogeni, come avviene in menopausa, è stata associata all'insorgenza e alla progressione della malattia; diversamente un elevato livello di estrogeni, come in gravidanza, migliora i sintomi della malattia. Considerando che la maggior parte di queste patologie sono caratterizzate, almeno in parte, da una risposta infiammatoria, uno dei meccanismi d'azione dell'estrogeno potrebbe proprio essere quello di esercitare un effetto anti-infiammatorio. Quindi si potrebbero spiegare gli effetti benefici degli estrogeni in molte patologie diverse fra loro con l'esistenza di un'azione comune dell'ormone sull'inibizione della risposta infiammatoria.

1.1.6 RUOLO DEGLI ESTROGENI NEL SISTEMA CARDIOVASCOLARE

Studi in modelli cellulari, animali e umani suggeriscono un potenziale ruolo degli estrogeni nella protezione cardiovascolare che si esplica attraverso effetti non genomici rapidi ed effetti genomici a lungo termine [Mendelsohn and Karas, 1999].

L'incidenza di patologie vascolari è diversa nell'uomo rispetto alla donna per la presenza di diversi fattori di rischio e diversi livelli di estrogeni circolanti [Barrett-Connor, 1997]. Studi epidemiologici hanno mostrato che le donne in premenopausa hanno un rischio inferiore di andare incontro ad eventi cardiovascolari rispetto ad uomini della stessa età; in condizioni patologiche, come il diabete mellito, questo vantaggio viene a mancare. Si ritiene che la protezione fornita dagli estrogeni dipenda in parte dalla diminuzione dei livelli ematici di lipidi mediante la riduzione delle LDL e della lipoproteina Lp(a) e l'aumento delle HDL [Mendelsohn et al, 1999]. Nonostante questi eventi protettivi, sia la terapia ormonale sostitutiva che l'utilizzo di anticoncezionali aumentano l'incidenza di trombosi venosa.

Gli estrogeni possono esercitare effetti sia a livello sistemico che direttamente sui vasi. Gli effetti sistemici comprendono, oltre alla riduzione dei livelli di lipidi, la modulazione dell'espressione di geni che codificano per fattori della coagulazione: gli estrogeni, infatti, diminuiscono i livelli di fibrinogeno, di antitrombina III e di proteina S e provocano un aumento della fibrinolisi. Essi, inoltre, inducono vasodilatazione mediante la riduzione dei livelli di renina, di enzima di conversione dell'angiotensina (ACE), di endotelina-1 e del recettore dell'angiotensina AT1. Nel cuore i recettori degli estrogeni regolano la contrattilità e attenuano l'ipertrofia cardiaca [Pelzer et al, 2005]. Questi effetti sono confermati dal fatto che la pressione arteriosa è inferiore nelle donne rispetto agli uomini; inoltre, dopo la menopausa l'ipertensione ha una maggiore prevalenza tra le donne che tra gli uomini di pari età [Dubey et al, 2002]. Gli estrogeni, infine, inibiscono l'ossidazione delle LDL [Sack et al, 1994], in particolare inibiscono l'ossidazione lipidica delle LDL *in vitro*, ma è stato anche evidenziato un simile meccanismo in modelli animali [Wilcox et al, 1997]. Diversi studi sono stati effettuati utilizzando come modello una linea di topi in cui era stato inattivato il gene per l'apoproteina E (Apo E^{-/-}): tali sviluppano placche aterosclerotiche con caratteristiche simili a quelle umane. Il trattamento con E₂ di femmine Apo E^{-/-} inibisce, in modo dose dipendente, la formazione e la progressione delle placche aterosclerotiche. L'incrocio di questi animali con topi KO per il recettore degli estrogeni ha permesso di stabilire che l'effetto anti-aterosclerotico è mediato dall'isoforma α del recettore degli estrogeni [Hodgin et al, 2001]. Questi risultati sono stati confermati da un modello di ischemia, in cui l'effetto protettivo degli estrogeni era mediato dall'isoforma α [Dubal et al, 2001]. Gli effetti non genomici provocano vasodilatazione sia per il rilascio di ossido nitrico (NO) nelle cellule endoteliali da parte della NO sintetasi endoteliale (eNOS) [Chambliss and Shaul, 2002] sia per l'apertura dei canali del potassio regolati dal calcio nelle cellule muscolari lisce (SMC) [Wellman et al, 1996].

Attraverso la modulazione genica, gli estrogeni provocano vasodilatazione aumentando l'espressione di prostaciclina sintasi e NO sintasi sia endoteliale sia inducibile [Cignarella et al, 2001] e proteggono la parete vascolare stimolando la crescita delle cellule endoteliali [Krasinski et al, 1997] e inibendo la proliferazione delle SMC [Bhalla et al, 1997] e l'ispessimento dell'intima.

Vari effetti, tra cui variazioni cicliche dei livelli degli estrogeni durante la vita, la nutrizione e malattie possono influenzare l'espressione dei recettori per gli estrogeni e l'azione farmacologica dei ligandi per questi recettori nel sistema

cardiovascolare [Mendelsohn and Karas, 2005; Rubanyi et al, 1997]. Nel lavoro di Rubanyi viene riportata l'associazione tra il numero di recettori e la funzione delle cellule endoteliali, suggerendo che un calo del numero di recettori rappresenti un fattore di rischio cardiovascolare. Byers [2005] ha dimostrato il diverso controllo dell'espressione di ER α ed ER β nell'endotelio e nelle cellule muscolari in base allo stato endocrino. Inoltre, l'espressione dei recettori è influenzato da condizioni patologiche come il diabete [Maggi et al, 2003] e la stenosi aortica [Nordmeyer et al, 2004].

In cellule muscolari ottenute da lesioni aterosclerotiche umane, l'estradiolo mostra un effetto antiproliferativo mediato da ER α e non ER β [Nakamura et al, 2004]; in cellule muscolari umane l'estrogeno regola negativamente l'espressione dei recettori ER α e non di ER β [Barchiesi et al, 2004].

Il recente sviluppo di animali knockout (KO) per le isoforme recettoriali ER α ed ER β ha permesso una maggiore comprensione del ruolo specifico delle due isoforme nel sistema cardiovascolare. Darblade [2002] ha dimostrato che il trattamento con estrogeno modula la produzione di ossido nitrico nell'aorta di topi attraverso interazioni con ER α . In un recente studio, la vasodilatazione mediata dal 17 β -estradiolo *in vivo* non si è osservata nei topi KO per entrambi i recettori [Guo et al, 2005].

Per confermare il *cross-talk* tra ER α e la via dell'ossido nitrico, Simoncini [2000, 2002] ha dimostrato un'interazione tra ER α e la fosfatidilinositolo 3 chinasi (PI3K); inoltre, anche la via delle MAPK è implicata nella trasduzione del segnale di ER α [Edwards, 2005]. Evidenze sperimentali dimostrano che ER β regola la pressione sanguigna in quanto topi KO per ER β sviluppano ipertensione [Zhu et al, 2002]. ER α media l'attività anti-infiammatoria dell'estrogeno a livello cerebrale [Vegeto et al, 2003]; in un modello murino il danno vascolare provoca l'aumento dell'espressione di ER β , ma non di ER α [Mendelsohn et al, 1999].

1.2 MONOSSIDO DI AZOTO NEL SISTEMA VASCOLARE

Il monossido d'azoto (NO) è la più piccola molecola bioattiva nota e controlla varie funzioni vitali quali il tono vascolare, la contrazione di organi dell'apparato gastrointestinale e la neurotrasmissione. A concentrazioni elevate NO è in grado di distruggere batteri, parassiti e alcune cellule tumorali [Natan et al, 1991]. L'emivita di NO è nell'ordine dei secondi e ciò delimita la sua azione all'ambiente circostante la sua generazione; inoltre, NO si lega con alta affinità all'emoglobina

che lo trasforma in prodotti inattivi, cioè nitriti e nitrati. La breve emivita e la rapida ossidazione prevengono gli effetti tossici di questo radicale.

Tale fattore è stato identificato per la prima volta da Furchgott e Zawadski nel 1980, i quali osservarono che l'azione vasodilatante dell'acetilcolina (Ach) nell'aorta di coniglio isolata è dipendente dalla presenza nel preparato di un endotelio intatto, in mancanza del quale l'Ach non produce nessun effetto pressorio; dunque, la vasodilatazione indotta da Ach è dovuta al rilascio di un mediatore di sintesi endoteliale che in origine è stato genericamente denominato *endothelium-derived relaxing factor* (EDRF). Solo nel 1987 venne confermata l'identità strutturale tra EDRF ed NO [Palmer et al, 1987].

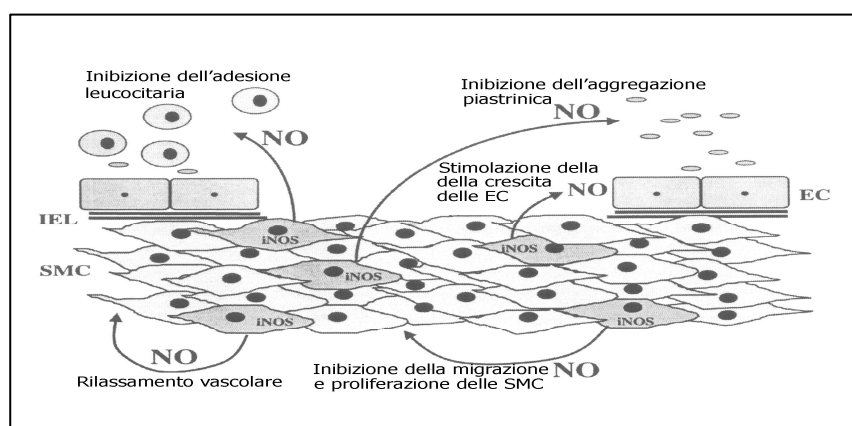
NO è prodotto dalla NO sintetasi (NOS), di cui si conoscono tre isoforme: nNOS (o NOS I), iNOS (o NOS II) ed eNOS (o NOS III). Tutte catalizzano l'ossidazione dell'azoto guanidinico dell'amminoacido L-arginina producendo NO e L-citrullina [Moncada et al, 1993]; cosubstrati della reazione sono l'ossigeno molecolare e la nicotinamide-adenina-dinucleotide-fosfato (NADPH); cofattori dell'enzima sono la flavina-adenina-dinucleotide (FAD), la flavina-mononucleotide (FMN), la tetraidrobiopterina (BH₄) e il gruppo eme [Marletta, 1994]. La nNOS è espressa principalmente nel citosol di cellule del sistema nervoso centrale e periferico, mentre la eNOS è associata alle membrane delle cellule endoteliali. Tali isoforme sono generalmente costitutive nelle cellule che le esprimono, ma la loro espressione può essere modulata. Entrambe sono attivate dall'aumento della concentrazione di calcio all'interno della cellula che consente alla calmodulina di legare l'enzima; tale legame è necessario per l'attivazione della NOS [Forstermann et al, 1994]. Queste isoforme producono basse quantità di NO e il loro ruolo fisiologico è la trasduzione del segnale. In cellule a riposo, invece, la iNOS è molto bassa o assente ma la sua espressione, regolata principalmente a livello trascrizionale [Kunz et al, 1994], può essere indotta in molti tipi cellulari da sostanze quali lipopolisaccaride (LPS), citochine quali interleuchina 1 β (IL-1 β), interferone γ (IFN- γ) o *tumor necrosis factor* α (TNF- α), da altri mediatori dell'infiammazione e da stress cellulare. In alcuni tipi cellulari l'espressione della iNOS è indotta anche da agenti che innalzano i livelli di AMP ciclico e da fattori di crescita quali il *platelet derived growth factor* (PDGF) e il *fibroblast growth factor* (FGF) [Förstermann et al, 1995]. Diverse sostanze sono in grado di ridurre o prevenire l'induzione della iNOS da parte delle citochine, in particolare gli inibitori delle tirosina chinasi [Dong et al, 1993] e gli inibitori dell'attivazione del fattore di trascrizione NF-kB [Kleinert et al, 1995], suggerendo così il loro

coinvolgimento nel processo di induzione. La iNOS produce elevati livelli di NO e la sua attività è indipendente dalla presenza di calcio in quanto lega con maggiore affinità la calmodulina che, anche in assenza di calcio, risulta una subunità costitutiva dell'enzima.

1.2.1 RUOLO FISILOGICO DI NO

In condizioni basali l'NO vascolare è prodotto dalla eNOS e la sua produzione è stimolata da agonisti recettoriali e da stress di parete. NO dilata i vasi stimolando la guanilato ciclasi, la quale aumenta i livelli di GMP ciclico (cGMP) nelle SMC [Moncada et al, 1993]. In aggiunta alle proprietà vasodilatatorie, NO è in grado di proteggere i vasi e contrasta il processo aterosclerotico essendo un potente inibitore dell'aggregazione delle piastrine e della loro adesione alla parete vascolare [Radomski et al, 1987]. NO, inoltre, regola l'espressione di geni che codificano per molecole di adesione, per esempio la *vascular cell adhesion molecole-1* (VCAM-1) [De Caterina et al, 1995], e per chemoattrattori, per esempio la *monocyte chemotactic protein-1* (MCP-1) [Tsao et al, 1997], prevenendo l'adesione dei leucociti alla parete vascolare e il reclutamento dei monociti.

NO inibisce la proliferazione delle SMC sia mediante il già citato effetto sulla produzione di fattori di crescita derivati dalle piastrine sia mediante la via del cGMP [Garg et al, 1989; Nakaki et al, 1990]. NO inibisce anche la migrazione delle SMC dalla media all'intima [Dubey et al, 1995], esercitando un'azione protettiva anche nelle fasi più avanzate della patologia aterosclerotica.



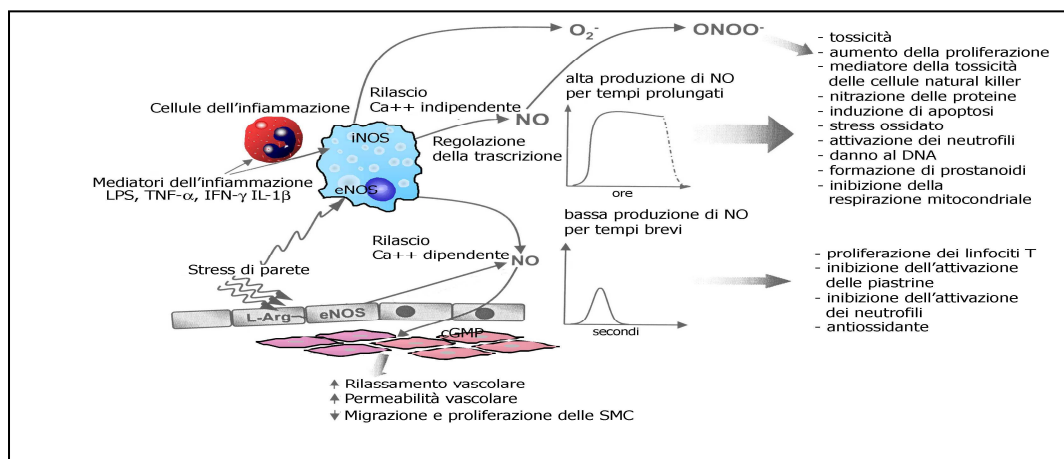
Ruolo fisiologico di NO

Modificata da Kibbe et al, 1999

1.2.2 DANNO VASCOLARE E NO

L'infiammazione è la risposta dell'organismo a stimoli nocivi fisici, chimici o di origine microbica; NO partecipa a tutte le fasi della risposta dell'organismo, ma

in particolare interviene nella regolazione delle proprietà pro-infiammatorie dell'endotelio.



Differenze tra la produzione fisiologica e patologica di NO

Modificata da Guzik et al, 2003

Durante la risposta infiammatoria la iNOS produce quantità di NO superiori a quelle fisiologiche uccidendo i microrganismi e provocando la nitrosilazione di macromolecole. Nella risposta infiammatoria si generano specie reattive dell'ossigeno (ROS), quali l'anione superossido (O_2^-), il perossido di idrogeno e il radicale idrossile. Il rilascio di superossido prodotto dalla catena respiratoria dei leucociti è coinvolto nell'uccisione dei patogeni, ma provoca anche un danno all'endotelio, in quanto ne aumenta la permeabilità [Tiidus et al, 1998]. Quando quantità elevate di NO sono prodotte in concomitanza con elevati livelli di anione superossido le due molecole si combinano e generano il perossinitrito ($ONOO^-$) [Guzik et al, 2002] che media gli effetti tossici di NO quali il danno al DNA, l'ossidazione delle LDL e la nitrazione delle tirosine [Ischiropoulos et al, 1995]. Elevati livelli di NO e di perossinitrito possono alterare numerose proteine ed enzimi critici per la sopravvivenza cellulare e la trasduzione del segnale: ad esempio attivano JAK, STAT, NF-kB e le *mitogen activated protein kinase* (MAPK) [Guzik et al, 2003]. Nella patogenesi dell'aterosclerosi, inoltre, le ROS inducono l'espressione dei geni che codificano per VCAM-1, E-selectina e MCP-1 [Tamir et al, 2002].

1.3 DIABETE

Il diabete mellito è una malattia metabolica causata da insufficiente secrezione di insulina dalle cellule β delle isole di Langerhans del pancreas o da alterata responsività dei tessuti all'ormone [National Diabetes Data Group, 1979]. Questo provoca la comparsa di elevati livelli di glucosio nel sangue e altre anomalie

biochimiche. I soggetti diabetici sono particolarmente sensibili a sviluppare danni a livello macrovascolare, come aterosclerosi, insufficienza cardiaca ed ipertensione, e microvascolare (retinopatie e nefropatie). Nello stato non trattato la patologia provoca elevati livelli di glucosio nel sangue, spesso accompagnati da sete, poliuria, polifagia, perdita di peso e torpore. Nell'etiologia e patogenesi del diabete mellito sono coinvolti fattori genetici, come la mutazione del gene dell'insulina [Tager, 1984] e fattori ambientali, come le infezioni virali [Barrett-Connor, 1985]. L'alterato metabolismo delle prostaglandine può essere una causa dell'alterata secrezione di insulina e della diminuita sensibilità delle cellule *target* [Borissova et al, 1991]. La diminuita sensibilità delle cellule all'insulina è attribuita, inoltre, sia alla riduzione del numero di recettori dell'insulina sulla membrana plasmatica, sia alla diminuita attività tirosina-chinasica degli stessi [Block et al, 1991]. Esistono molte patologie associate all'iperglicemia, tuttavia le forme di diabete si classificano di solito in insulino-dipendente (IDDM) e non insulino-dipendente (NIDDM). In entrambe le classi le anomalie metaboliche sembrano causate dalla parziale o totale assenza di insulina accoppiata ad un'eccessiva produzione di glucagone da parte delle cellule β del pancreas [National Diabetes Data Group, 1979].

1.3.1 DIABETE INSULINO-DIPENDENTE

Questa forma esordisce generalmente prima dei 40 anni di età, spesso nei bambini e negli adolescenti. L'insorgenza dei sintomi è rapida, con sete, poliuria, aumento dell'appetito e perdita di peso. I livelli di insulina sono molto bassi o del tutto assenti a causa dell'assenza di cellule β pancreatiche. Questo tipo di diabete non è trattabile con gli ipoglicemizzanti orali e i soggetti colpiti richiedono la terapia con insulina. Molte evidenze attribuiscono la causa della patologia ad un attacco virale: in soggetti geneticamente suscettibili la distruzione delle cellule β pancreatiche avviene a seguito di una reazione autoimmunitaria. Si ritiene che il danno alle cellule β -pancreatiche sia causato dai linfociti T e dai macrofagi; inoltre sono coinvolte citochine quali IL-1 β e TNF- α [Mandrup-Poulsen, 1990]. La progressione verso il diabete è causata dalla comparsa di linfociti T più aggressivi e dalla prevalenza dei linfociti T *helper* 2 che provocano un quadro a forte componente infiammatoria.

1.3.2 DIABETE NON INSULINO-DIPENDENTE

Questa forma di diabete si manifesta nell'età adulta, i sintomi compaiono gradualmente e la diagnosi spesso è fatta in pazienti asintomatici a seguito dei valori elevati di glucosio trovati nel sangue. I livelli di insulina sono normali o

addirittura alti. L'obesità è un fattore di rischio per l'insorgenza di questa forma di diabete che è preceduta da insulino-resistenza. Questa può essere causata da una riduzione del numero di recettori dell'insulina e dell'attività tirosina-chinasica dei recettori [Block et al, 1991]. Questa forma di diabete è curata con gli ipoglicemizzanti orali, ma molti pazienti possono controllare i livelli di glucosio solo con una corretta alimentazione ed esercizio fisico. Tuttavia spesso si deve ricorrere alla terapia con insulina anche in questa forma di diabete che a lungo termine può sviluppare complicazioni anche gravi.

1.3.3 COMPLICAZIONI DEL DIABETE MELLITO

La principale complicazione acuta è la chetoacidosi che può comparire in assenza di un'adeguata terapia. Nei soggetti diabetici la mortalità dovuta all'insorgenza di complicazioni acute è stata ridotta grazie ad appropriate terapie e all'introduzione di nuovi farmaci ipoglicemizzanti molto potenti e di preparazioni insuliniche ultrapure. A lungo termine si manifestano patologie a carico del sistema nervoso, cardiovascolare, gastrointestinale, urinario, respiratorio e riproduttivo. Vi sono anche alterazioni a livello dell'occhio, delle cellule del sangue e modificazioni biochimiche. Alcune di queste patologie non sono letali, ma peggiorano la qualità di vita dei soggetti colpiti, come la gastroenteropatia, le disfunzioni della vescica e l'impotenza sessuale. Le complicazioni vascolari associate al diabete sono, invece, la principale causa di morte dei soggetti diabetici [Krolewski et al, 1991]. Il diabete è associato ad occlusione di arterie alle estremità, infarto del miocardio ed ictus. La patologia, inoltre, è correlata ad accelerata aterosclerosi e ad un aumentato livello di *marker* dell'infiammazione [Pradhan et al, 2001]. Nel diabete sperimentale, ad esempio, sono presenti in circolo elevati livelli di IL-1 β e TNF- β , citochine che sembrano implicate nel danno alle cellule β -pancreatiche [Mandup-Poulsen, 1990]. L'aumento dell'espressione delle citochine proinfiammatorie nel diabete può essere dovuto ai prodotti finali della glicazione [Bardell et al, 2001].

Le cause dell'insorgenza delle patologie correlate al diabete non sono ancora note, ma si ipotizza il coinvolgimento di numerosi fattori. Ad esempio, per la neuropatia si ipotizza l'accumulo di sorbitolo e la riduzione del numero di Na⁺/K⁺-ATPasi [Ward, 1989]. La retinopatia sembra dovuta all'effetto angiogenetico dell'IL-1 β e del TNF- α . La cardiomiopatia, invece, può essere dovuta a una diminuzione dei recettori β -adrenergici [Heyliger et al, 1982]. Molte complicazioni possono essere prevenute controllando i livelli di glicemia con un'adeguata

terapia con insulina, ma questa non basta, ad esempio, ad impedire la comparsa delle retinopatie e il progredire dell'aterosclerosi.

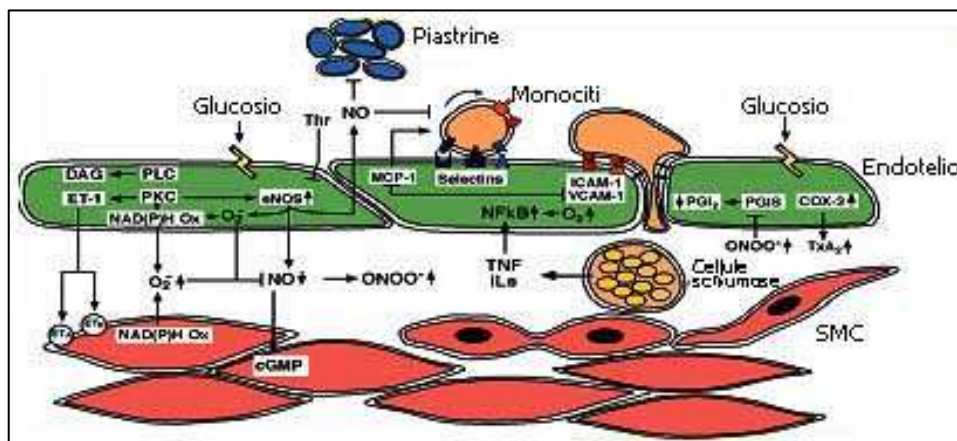
1.3.4 DISFUNZIONE ENDOTELIALI NEL DIABETE

Diverse patologie quali il diabete mellito, l'ipercolesterolemia, l'ipertensione e fattori di rischio quali il fumo sono associate alla ridotta vasodilatazione mediata dall'endotelio a causa della ridotta biodisponibilità di NO. Questa può dipendere dalla diminuita produzione o dalla aumentata degradazione della molecola, specialmente ad opera dei radicali liberi dell'ossigeno [Cosentino et al, 1997].

Nel diabete, la disfunzione endoteliale causata dall'iperglicemia è associata alla ridotta produzione di NO dovuta ad alterazioni nella trasduzione del segnale che porta all'attivazione della eNOS, ridotta disponibilità del substrato L-arginina o dei cofattori della NOS [Li et al, 2000] e aumentata degradazione ad opera dei radicali liberi dell'ossigeno a formare perossinitrito [Beckman et al, 2001]. La prima osservazione è confermata da esperimenti che dimostrano che la vasodilatazione mediata da NO indotta da stimoli quali l'acetilcolina è alterata in aorte di soggetti diabetici, mentre la risposta al calcio ionoforo A23187 è invariata [Pieper et al, 1995]. La seconda ipotesi nasce dall'osservazione che nel diabete i livelli di aminoacidi essenziali, tra cui la L-arginina, sono ridotti e in anelli di aorta diabetici il pretrattamento con L-arginina potenzia la vasodilatazione indotta da acetilcolina [Pieper et al, 1995]. Anche la somministrazione del cofattore tetraidropterina migliora la vasodilatazione mediata dall'endotelio in animali diabetici [Pieper et al, 1997]. La condizione di iperglicemia provoca la glicazione non enzimatica di macromolecole e ciò porta alla formazione di macrocomplessi noti come prodotti finali della glicazione (AGE) [Brownlee et al, 1988], Gli AGE sono coinvolti nella glicazione delle LDL e di altre lipoproteine: ciò rende queste molecole più suscettibili all'ossidazione e ne aumenta le proprietà pro-infiammatorie. L'iperglicemia, inoltre, attiva la via dei polioli e la proteina chinasi C (PKC) con conseguente aumento dello stress ossidativo, cioè l'esposizione delle cellule a elevati livelli di ossigeno e di ROS. Tra queste, l'anione superossido inattiva rapidamente NO provocando la formazione di perossinitrito, una molecola con elevato potere ossidativo in grado di danneggiare diverse macromolecole. L'attivazione della PKC causa inoltre la fosforilazione della eNOS e ne riduce l'attività in vitro [Hirata et al, 1995]. Nel diabete i livelli di lipidi nel sangue sono alti a causa dell'aumentata liberazione dal tessuto adiposo e anche questa condizione favorisce la produzione delle ROS e l'attivazione della PKC [Inoguchi et al, 2000]. Il fegato risponde all'aumentato

flusso di acidi grassi liberi con un'aumentata produzione di *very low density lipoproteins* (VLDL) e la sintesi di esteri del colesterolo. Questo provoca ipertrigliceridemia con un calo dei livelli di *high density lipoproteins* (HDL), favorendo il trasporto di colesterolo alle VLDL; inoltre cambia la morfologia delle LDL che diventano più aterogene, piccole e dense [Dimitriadis et al, 1995].

La disfunzione endoteliale è caratterizzata non solo dalla diminuita biodisponibilità di NO ma anche dall'aumentata sintesi di prostanoidi vasocostrittori quali TXA₂ ed endotelina: l'iperglicemia, infatti, aumenta l'espressione della COX-2 in EC [Cosentino et al, 2003] e l'endotelina promuove l'infiammazione e aumenta la proliferazione delle SMC [Hopfner et al, 1999]. L'iperglicemia ed il diabete attivano componenti della risposta infiammatoria nei tessuti vascolari e nel plasma [Esposito et al, 2002]; inoltre si osserva l'espressione della iNOS [Gunnnett et al, 1998]. Da studi condotti sulle arterie carotidi di topi, è emerso che la iNOS è un importante mediatore della disfunzione endoteliale nel diabete [Gunnnett et al, 2003]. L'endotelio diabetico risulta più permeabile e ciò consente l'adesione delle piastrine, il deposito di colesterolo e lipidi nello strato sottoendoteliale e lo sviluppo di una placca ateromasica. Nel vaso diabetico si assiste ad un calo del numero e della funzionalità delle EC. E' stato osservato, infine, che IL-1 β e TNF- α , i cui livelli sono alti nel diabete, sono in grado di inibire la crescita delle EC.



Conseguenze dell'iperglicemia

1.3.5 DIABETE E CELLULE MUSCOLARI

Il diabete causa alterazioni nella crescita e nella funzionalità delle SMC e la disfunzione endoteliale nel diabete si ripercuote anche sulle SMC.

La riduzione di NO prodotto dall'endotelio è uno dei fattori responsabili della proliferazione delle SMC, in quanto NO è in grado di regolare negativamente la

loro proliferazione [Garg et al, 1989]. La somministrazione prolungata di L-arginina riduce la proliferazione delle SMC nell'aorta di coniglio [Hamon et al, 1994]. Anche i prodotti finali della glicazione (AGE) inibiscono gli effetti antiproliferativi di NO nei confronti delle SMC [Bucala et al, 1991]. Inoltre, il TNF- α induce l'attività della fosfolipasi A₂ [Bomalaski et al, 1987] alterando la produzione di prostanoidei. Nel diabete, infatti, si osservano un'aumentata sintesi di trombossano A₂ (TXA₂), un agente mitogeno per le SMC, e una ridotta produzione di prostaciclina [Fujii et al, 1986], un inibitore della crescita delle SMC, con conseguente aumento della loro proliferazione. Anche elevati livelli di *insulin-like growth factor-1* (IGF-1), prodotti a seguito del danno vascolare, sono mitogeni per le SMC [Nicosia et al, 1994]. La maggiore proliferazione delle SMC, tuttavia, potrebbe non essere dovuta solo alla composizione dell'ambiente circostante: il fatto che la maggior proliferazione di SMC permanga anche in colture cellulari secondarie [Alipui et al, 1991] suggerisce il coinvolgimento anche di fattori prodotti dalle SMC stesse.

Il diabete provoca anche alterazioni funzionali delle SMC, dovute forse alla diversa sensibilità dei recettori agli agonisti o all'alterato numero dei recettori stessi. In modelli sperimentali di diabete si assiste ad un'alterata risposta agli agenti vasodilatanti e contratturanti a causa della disfunzione dell'endotelio [Tomlinson et al, 1992] e/o ai cambiamenti nello stato contrattile delle SMC. Nel vaso, infatti, esistono due fenotipi di SMC: uno contrattile ed uno sintetico. Quest'ultimo è espresso particolarmente nelle aree di rimodellamento vascolare, come nell'intima di lesioni aterosclerotiche dove, stimolato dal *transforming growth factor- β* (TGF- β), sintetizza collagene favorendo il deposito di matrice extracellulare. La trasformazione da un fenotipo all'altro è chiamata modulazione fenotipica ed è aumentata nel diabete [Kansaki et al, 1994].

In condizioni fisiologiche la eNOS è uno dei principali regolatori della vasodilatazione, ma nel corso di patologie infiammatorie quali il diabete nelle SMC è espressa anche la iNOS [Bardell et al, 2001] per l'azione di diverse citochine, quali IL-1 β , TNF- α , IFN- γ [De Vera et al, 1996]. Anche l'attivazione della proteina chinasi C (PKC), che è aumentata nel diabete [Inoguchi et al, 1992], stimola l'espressione della iNOS [Paul et al, 1997]. La iNOS produce quantità di NO 10-50 volte superiori rispetto alla eNOS. L'eccesso di NO reagisce, quindi, con i radicali liberi dell'ossigeno causando la formazione di perossinitriti, i principali mediatori degli effetti citotossici di NO.

1.4 ESTROGENI, NO E DIABETE

Uno dei più importanti bersagli dell'estrogeno nella parete vascolare è il sistema di NO. L'influenza dell'ormone sulla regolazione dei livelli di NO è evidente nell'aorta di coniglio, dove il rilascio basale di NO è più elevato nelle femmine che nei maschi [Hayashi et al, 1992]. Studi condotti nel nostro laboratorio dimostrano che la somministrazione di estrogeno a ratte ovariectomizzate ripristina il normale rilascio di NO [Bolego et al, 1997], ma non lo modifica in ratti maschi che avevano subito un impianto di estrogeni [Cignarella et al, 2000]. L'estrogeno, inoltre, è in grado di inibire l'attivazione della NO sintetasi inducibile (iNOS) indotta da citochine pro-infiammatorie in SMC di aorta di ratto [Zancan et al, 1999]: quest'azione biologica potrebbe proteggere dalla progressione dello stato infiammatorio e dello stress ossidativo tipico dell'aterosclerosi. L'estrogeno, infine, inibisce la proliferazione e la migrazione delle SMC [Suzuki et al, 1996] e la formazione della neointima [Akishita et al, 1997; Oparil et al, 1997]. Le azioni dell'estrogeno sembrano mediate dagli ER in quanto sono bloccate dall'antagonista recettoriale ICI 182,780 [Dubey et al, 2000]. A livello endoteliale l'estrogeno stimola l'attività della eNOS attraverso ER α [Chen et al, 1999] che media, quindi, l'attività protettiva dell'estrogeno.

La disfunzione vascolare del diabete è associata ad un'alterazione della cascata dell'NO [De Vriese et al, 2000]. Studi condotti nel nostro laboratorio dimostrano che il diabete altera le funzioni vascolari interferendo con la produzione di NO [Bolego et al, 1999]. In SMC di aorta di ratto reso diabetico per iniezione di streptozotocina il trattamento con estrogeno non è in grado di inibire l'attivazione della iNOS mediata da citochine pro-infiammatorie [Maggi et al, 2003], a differenza di quanto avviene in SMC di ratto non diabetico [Zancan et al, 1999]. In studi condotti in aorte di ratto si osserva che la funzionalità vascolare è maggiormente compromessa nei tessuti provenienti da ratte femmine rese diabetiche per iniezione di streptozotocina rispetto a ratti maschi diabetici [Pinna et al, 2001].

In accordo a quanto osservato in modelli animali, una meta-analisi di studi osservazionali ha dimostrato che le donne affette da diabete perdono la loro naturale protezione contro le patologie vascolari e presentano un rischio superiore di sviluppare eventi cardiovascolari rispetto agli uomini diabetici [Lee et al, 2000]. I dati clinici disponibili sulla terapia ormonale indicano che l'uso del composto non selettivo E₂ è associato ad una ridotta incidenza di diabete senza

alcun beneficio sugli eventi cardiovascolari nelle donne in postmenopausa [Kanaya et al,2003; Margolis et al, 2004].

Studi precedenti hanno evidenziato il coinvolgimento selettivo del recettore ER α nell'omeostasi del glucosio modulando l'espressione di geni coinvolti nella risposta all'insulina e dell'*uptake* del glucosio [Barros et al, 2006] e nella protezione dall'apoptosi delle cellule del pancreas [Le May et al, 2006].

2. Scopo del lavoro

Il diabete è una malattia cardiovascolare caratterizzata da disfunzione vascolare, elevato stress ossidativo e marcato stato infiammatorio. L'iperglicemia provoca la formazione delle ROS e aumento della produzione di NO ad opera della iNOS che è indotta dalla condizione infiammatoria che accompagna la malattia [Bardell et al, 2001]. In queste condizioni si forma il perossinitrito [Guzik et al, 2002] che provoca danni al DNA, l'ossidazione delle LDL e la nitratura della tirosina [Ischiropoulos et al, 1995].

La parete vascolare è uno dei tessuti bersaglio degli estrogeni, i quali sono in grado di modulare la produzione di NO; nei vasi di soggetti diabetici, tuttavia, l'estrogeno sembra perdere il suo effetto protettivo.

Nelle SMC ottenute da aorte di ratti diabetici mediante iniezione di streptozotocina l'estrogeno non è più in grado di inibire l'attivazione della iNOS indotta da citochine pro-infiammatorie [Maggi et al, 2003] a differenza di quanto avviene in SMC di ratto non diabetico [Zancan et al, 1999]. Questo appare correlato all'alterata espressione delle due isoforme: i livelli di mRNA e proteina ER α e, in modo ancor più evidente, di ER β sono più elevati in SMC di ratto diabetico rispetto a SMC controllo. Lo stimolo infiammatorio provoca una consistente riduzione dell'espressione di entrambe le isoforme recettoriali, mentre il trattamento con estrogeno ripristina l'espressione di ER α , ma riduce ulteriormente quella di ER β [Maggi et al, 2003]. Sulla base di questi dati è possibile ipotizzare che le due isoforme recettoriali abbiano un ruolo distinto nella modulazione dell'espressione funzionale della iNOS.

Inoltre è stato dimostrato che il recettore ER α media effetti anti-infiammatori protettivi in tessuti vascolari e non vascolari, tra cui le cellule β del pancreas.

Poiché le SMC esprimono entrambe le isoforme recettoriali e l'estrogeno si lega ad esse con la stessa affinità, primo scopo di questo studio è stato valutare il ruolo di ciascuna isoforma nella modulazione della iNOS utilizzando due ligandi selettivi, PPT e DPN, e determinare i possibili meccanismi d'azione.

Secondo scopo di questo studio è stato studiare il ruolo individuale delle due isoforme recettoriali nello sviluppo dell'iperglicemia e dell'infiammazione vascolare nel diabete in un contesto più fisiologico come la parete vascolare con un duplice approccio, utilizzando agonisti selettivi e topi knockout per ER α ed ER β .

3. Materiali e metodi

3.1 ANIMALI

Il lavoro descritto in questa tesi è stato svolto utilizzando ratti maschi Sprague-Dawley del peso di 175-200 g e topi C57B6 (25-30 g) nativi o con delezione del gene codificante per il recettore ER α o per il ER β , gentilmente forniti dalla Dr.ssa Elisabetta Vegeto (Dipartimento di Scienze Farmacologiche, Università degli Studi di Milano). Gli animali sono stabulati in condizioni controllate di temperatura ($22 \pm 1^\circ\text{C}$) e di umidità ($60 \pm 5\%$) mantenendo un ciclo luce-buio di 12 ore.

3.2 INDUZIONE DEL DIABETE

I ratti e i topi sono resi diabetici mediante iniezione nella vena caudale di streptozotocina (rispettivamente 65 o 150 mg/Kg) solubilizzata in tampone citrato 0,1 M immediatamente prima dell'uso a causa dell'instabilità della soluzione acquosa. La streptozotocina è un antibiotico estratto da *Streptomyces achromogenes* e dopo 10 ore dall'iniezione induce degranolazione e necrosi delle cellule β -pancreatiche, con elevati livelli di insulina e ipoglicemia [Junod *et al*, 1967]. Gli animali trattati con la streptozotocina presentano molte caratteristiche osservate nei soggetti diabetici non trattati quali iperglicemia, polidipsia, poliuria e perdita di peso [Hebden *et al*, 1986; Tomlinson *et al*, 1989].

Nelle 24 ore successive al trattamento, al fine di evitare l'insorgenza di crisi ipoglicemiche, si lascia a disposizione degli animali una soluzione acquosa contenente glucosio al 5%. Dopo alcuni giorni è necessario misurare la glicosuria e la glicemia per confermare l'avvenuta induzione del diabete. Il prelievo dell'aorta dei topi è avvenuto 21 giorni dopo il trattamento mentre il prelievo dell'aorta dei ratti per l'ottenimento delle SMC è avvenuto 28 giorni dopo il trattamento.

3.3 COLTURE CELLULARI

Le colture di SMC di aorta di ratto sono ottenute con il metodo dell'espianto [Ross, 1971]. Dopo il sacrificio degli animali per dislocazione cervicale sono state prelevate le aorte e poste in piastre di Petri contenenti *phosphate buffered saline* (PBS) sterile freddo. In ambiente sterile le aorte si puliscono esternamente con un pinzetta sterile, si lavano ulteriormente con PBS, quindi si aprono longitudinalmente e si privano meccanicamente dell'endotelio con un bisturi sterile. Si aggiunge qualche goccia di terreno di coltura (M199 completato con il 20% di siero fetale bovino (FCS), 1% di glutammina e 20 $\mu\text{g/ml}$ di gentamicina);

le aorte si tagliano poi in frammenti più piccoli che si distribuiscono omogeneamente in piastre di Petri da 60 mm. Si lascia asciugare il terreno di coltura per favorire l'adesione dei frammenti al fondo della piastra, quindi si aggiunge terreno di coltura fresco. Per una settimana i frammenti sono lasciati in incubatore in condizioni controllate di temperatura (37°C), umidità (90%) ed atmosfera ($O_2 : CO_2 = 95\%:5\%$) senza subire trattamenti.

Dopo una settimana devono essere eliminati i frammenti intorno ai quali le SMC sono migrate e quelli non aderiti alla piastra. Il terreno di coltura viene poi sostituito con M199 arricchito con il 10% di FCS, 1% di glutammina e 20 µg/ml di gentamicina (MEM rosso). Successivamente, il terreno di coltura si sostituisce ogni 3/4 giorni con terreno fresco finché le cellule sono migrate da tutti gli espianti e hanno raggiunto la confluenza. Osservate al microscopio ottico le cellule a confluenza presentano il caratteristico aspetto delle SMC "hill and valley". Si procede quindi alla messa in linea delle cellule: dopo aver lavato le piastre di Petri 2 volte con PBS sterile, per eliminare tracce di terreno di coltura e FCS, si aggiunge una soluzione contenente tripsina (2,5 g/l) ed EDTA (0,38 g/l) in quantità tale da ricoprire il monostrato cellulare e si lasciano le piastre in incubatore per 30" per favorire il distacco delle SMC, che assumono una forma tondeggiante.

Si aggiunge poi MEM rosso con siero per inibire l'azione della tripsina e la sospensione cellulare ottenuta si ripartisce in nuove piastre di Petri. Al raggiungimento della confluenza le cellule sono ulteriormente subcoltivate fino al 5° passaggio. Raggiunta la confluenza, le cellule vengono staccate dalle piastre e seminate in piastre da 6 pozzetti (Corning) o piastre di Petri di vario diametro per lo svolgimento degli esperimenti.

3.4 PROTOCOLLO DI STIMOLAZIONE DELLE SMC

Una volta seminate le cellule per l'esperimento, il terreno di coltura è cambiato ogni tre giorni fino al raggiungimento della confluenza. A questo punto le cellule sono lavate con PBS sterile e mantenute in un terreno di coltura privo di rosso fenolo, un colorante a debole attività estrogenica, completato con l'1% di glutammina e l'1% della miscela di antibiotici penicillina - streptomina (MEM bianco), arricchito con il 10% di FCS. Le cellule rimangono in contatto di questo terreno per due giorni, quindi sono sincronizzate per 24 ore con MEM bianco arricchito con lo 0,4% di FCS al fine di fermare il ciclo cellulare in fase di

quiescenza. Successivamente le cellule sono stimulate per 24 ore con MEM bianco arricchito con il 2% di FCS e, dove indicato, con un cocktail di citochine costituito da IL-1 β (10ng/ml), TNF- α (25 ng/ml) ed IFN- γ (10 ng/ml) più LPS (1 μ g/ml), cui si aggiungono le diverse sostanze come indicato nei singoli esperimenti. Trascorse 24 ore, viene prelevato il surnatante per il dosaggio dei nitriti. Le cellule vengono lavate due volte con PBS freddo e trattate con 100 μ l di tampone di lisi composto da 50mM Tris HCl pH 7,4, 150mM NaCl, 1% NP-40, 25 mM NaF, 0,5% Na deossicolato, 10% SDS, 1mM EGTA, 1 mM Na ortovanadato, 10mM Na pirofosfato, 1mM PMSF e gli inibitori delle proteasi Complete (Roche) [Idel *et al*, 2002]. Successivamente sono effettuati quattro cicli di congelamento in ghiaccio secco - scongelamento per favorire la lisi completa delle cellule. Infine, i campioni sono sottoposti a centrifugazione a 13200 rpm per 10 minuti a 4°C e conservati a -20°C fino al dosaggio proteico.

3.5 COLTURE D'ORGANO

Le aorte dei topi vengono prelevate e poste in piastre di Petri contenenti PBS sterile freddo. In ambiente sterile le aorte si puliscono esternamente con pinzetta sterile, si lavano ulteriormente con PBS e si tagliano in anellini. Si aggiunge terreno di coltura, MEM bianco completato con l'1% di glutammina e l'1% della miscela di antibiotici penicillina - streptomina arricchito con il 10% di FCS. Le aorte rimangono a contatto con questo terreno per 2 giorni. Successivamente i tessuti sono stimolati per 24 ore con MEM bianco arricchito con il 2% di FCS e, dove indicato, con un cocktail di citochine citato in 3.4 senza LPS, cui sono aggiunte le diverse sostanze descritte nei singoli esperimenti.

Trascorse 24 ore, le aorte vengono lavate due volte con PBS freddo, trattate con 50 μ l di tampone di lisi e sonicate in 4 cicli di 30 secondi. Successivamente si effettuano quattro cicli di congelamento-scongelamento e i campioni vengono conservati a -20° fino al dosaggio proteico.

3.6 DOSAGGIO PROTEICO

La valutazione della quantità di proteine contenuta nei lisati cellulari è stata effettuata mediante il metodo di Lowry, un dosaggio colorimetrico che prevede l'utilizzo di una soluzione alcalina di solfato di rame e il reagente di Folin Ciocalteu da aggiungere ai campioni dopo averli diluiti 1:50 con H₂O distillata. Dopo l'aggiunta dei reattivi i campioni vengono incubati a temperatura ambiente

per 30 minuti, quindi si determina la densità ottica alla lunghezza d'onda di 670 nm utilizzando uno spettrofotometro.

3.7 DETERMINAZIONE DELL' ESPRESSIONE PROTEICA MEDIANTE WESTERN BLOTTING

Almeno 50 µg di proteine per ciascun campione sono caricate su un gel di poliacrilamide al 10% e separate per SDS-PAGE. Al termine della corsa elettroforetica, le proteine sono trasferite su una membrana di PDVF mediante *Western blot* in un tampone costituito da Tris 25 mM, glicina 192 mM e metanolo 20% per 1 ora a 400 mA. Per verificare il corretto trasferimento proteico le membrane sono colorate con rosso Ponceau e quindi incubate in TBS contenente 0,1% Tween e 5% di latte in polvere, al fine di saturare i siti di legame aspecifici, tenendole in agitazione per 1 ora a temperatura ambiente. Successivamente le membrane sono incubate con gli anticorpi primari diretti contro le proteine in esame diluiti in TBS contenente 0,1% Tween e 5% di latte in polvere per una notte a 4°C (vedi tabella). Al termine dell'incubazione, le membrane sono lavate con la soluzione di lavaggio (TBS arricchito con lo 0,1% di Tween) ed incubate con gli opportuni anticorpi secondari coniugati alla perossidasi diluiti in TBS contenente 0,1% Tween e 5% di latte in polvere (vedi tabella). Il segnale viene rivelato su lastre fotografiche che vengono impressionate per chemiluminescenza (GE Healthcare).

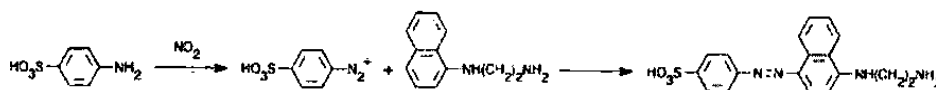
Proteina da analizzare	Anticorpo primario		Lavaggi	Anticorpo secondario		Lavaggi
	Tipo	Diluizione		Tipo	Diluizione	
iNOS	Policlonale di coniglio	1:1500	3 x 10'	Capra	1:50000	3 x 10'
p-ERK1-2	Policlonale di coniglio	1:1000	3 x 10'	Capra	1:50000	3 x 10'
β-actina	Policlonale di coniglio	1:24000	3 x 10'	Capra	1:50000	3 x 10'

Tabella 1: Elenco degli anticorpi usati e delle condizioni di utilizzo

3.8 DOSAGGIO DEI NITRITI

Per valutare la produzione di NO da parte della iNOS nelle SMC si utilizza il metodo di Griess (Robbins et al, 1994) che permette di misurare i livelli di nitrito, un prodotto che si forma dal catabolismo dell'NO. Per limitare l'ossidazione spontanea del NO_2^- a NO_3^- i surnatanti devono essere immediatamente posti in ghiaccio dopo la raccolta e, se non si procede immediatamente al dosaggio, vanno conservati a -80°C fino al momento dell'analisi. Il dosaggio si effettua in piastre da 96 pozzetti; in ogni pozzetto a $250\ \mu\text{l}$ di surnatante si aggiungono $40\ \mu\text{l}$ della miscela 1:1 HCl 6,5 M / acido sulfanilico 37,5 mM e si incuba per 10' a temperatura ambiente, quindi si aggiungono $20\ \mu\text{l}$ di N-(1-naftil) etilendiammina 12,5 mM. La reazione porta alla formazione di un composto colorato che assorbe a 550 nm. L'intensità del colore è direttamente proporzionale alla quantità di nitriti presenti nel campione e si misura dopo un'incubazione di 15' a temperatura ambiente per mezzo di un lettore per micropiastre (Bio-Rad).

La reazione che avviene è la seguente:



3.9 IMMUNOCITOCHIMICA

Per l'immunocitochimica, le SMC sono cresciute per 48 h su vetrini gelatinati in piastre da 24 pozzetti in MEM rosso. Il terreno viene cambiato con MEM bianco arricchito con il 10% di FCS per 48 h e successivamente le cellule sono incubate per 6 h con MEM bianco arricchito. Le cellule sono pretrattate con 1 nM PPT o DPN, trattate per 30 minuti con $10\ \mu\text{g}/\text{ml}$ di LPS e fissate per 5 minuti in paraformaldeide al 4% a temperatura ambiente. Successivamente si incubano per 1 h con *blocking solution* (10% siero di capra, 0.5% Tween 20 in PBS). Le cellule sono incubate *overnight* a 4°C con anticorpo specifico per p65 diluito 1:500 (Santa Cruz Biotechnology, CA, USA). Dopo aver lavato, le cellule sono incubate con un anticorpo secondario biotinilato *anti-rabbit* (Vector Laboratories, Burlingame, CA, USA) e colorate con HRP (*horseradish peroxidase*) coniugata con avidina e biotina (ABC kit, Vector Laboratories) e 3,3-diaminobenzidina (Sigma Chemical Co.). I vetrini sono stati osservati con microscopio Axioscope (Zeiss, Milano).

3.10 TRASFEZIONE TRANSIENTE

La transfezione in transiente delle SMC si ottiene utilizzando il reagente LipofectAMINE-PLUS (Invitrogen). Il metodo consente di veicolare un plasmide all'interno delle cellule dopo che il liposoma con cui si complessa il plasmide si fonde con la membrana cellulare. Il plasmide veicolato all'interno della cellula contiene il cDNA delle isoforme recettoriali degli estrogeni associato al gene reporter della luciferasi, enzima che in presenza del substrato luciferina determina un'emissione di fotoni rivelabili al luminometro.

Il giorno prima della transfezione 10^5 cellule sono seminate in piastre da 24 pozzetti in DMEM senza rosso fenolo arricchito con il 1% di FCS; dopo 24 h è aggiunto E_2 . Trascorse 24 h le cellule sono lavate con PBS freddo e raccolte con un tampone di lisi che permette di estrarre il contenuto citoplasmatico lasciando adesa alle piastre la membrana cellulare e successivamente viene misurata l'attività della luciferasi.

3.11 MATERIALI

Sono stati acquistati:

- presso la Invitrogen (San Giuliano Milanese, Milano): Medium 199 privo di rosso fenolo con sali di Eagle, soluzione di antibiotici penicillina-streptomina (50 U/ml di penicillina e 50 U/ml di streptomina), glutammina, tripsina-EDTA, PBS in pastiglie, gentamicina 10 mg/ml;
- presso la Celbio (Pero, Milano): siero fetale bovino, Medium 199 contenente rosso fenolo e sali di Eagle, materiale per colture cellulari: piastre di diverso diametro, provette Falcon, pipette sterili;
- presso la Sigma Chemical Co. (Milano) il marcatore di peso molecolare per elettroforesi, LPS, i componenti del tampone di lisi, $CuSO_4$, Na tartrato, acido sulfanilico, N-(1-naftil)-etilendiammina, rosso Ponceau, streptozotocina;
- presso la Becton Dickinson (Milano) l'anticorpo policlonale di coniglio diretto contro la proteina iNOS prodotto dalla Transduction Laboratories (Lexington, USA);
- presso la DBA (Milano) l'anticorpo secondario anti IgG di coniglio coniugato alla perossidasi;
- presso la VWR International (Milano) i reattivi per l'elettroforesi, l'acrilamide, il latte in polvere, HCl, acido acetico, i sali per il tampone CPRG;

- presso la Amersham (Cologno Monzese, Milano) le membrane di cellulosa, lastre fotografiche e reattivo ECL
- presso la Tebu Bio (Magenta, Milano) le citochine ricombinanti di ratto Peprtech;
- presso la Eppendorf (Milano) pipette, puntali e provette;
- presso la Tocris (Bristol, UK) i composti DPN, PPT, PD98059;
- presso la Roche (Monza, Milano) gli inibitori delle proteasi Complete;
- presso la Charles-River (Calco, Lecco) i ratti maschi Sprague-Dawley.

3.12 ANALISI STATISTICA

I dati di Western blotting sono stati ottenuti da almeno 3 esperimenti indipendenti e ciascun valore rappresenta la media \pm errore standard della media (SEM), seppure con la limitazione che la tecnica per sua natura è semiquantitativa. Nel caso dei dosaggi di nitriti gli esperimenti sono stati condotti in duplicato o triplicato e i dati sono stati espressi come media \pm SEM di risultati ottenuti da un minimo di 3 esperimenti.

Il confronto tra gruppi è stato condotto utilizzando l'analisi della varianza ad una via (ANOVA) seguita dal test di Fisher per confronti multipli. I valori di $p < 0.05$ sono stati considerati statisticamente significativi.

4. Risultati

4.1 IMMUNOCITOCHIMICA PER α -ACTINA NELLE CELLULE MUSCOLARI LISCE CONTROLLO E DIABETICHE

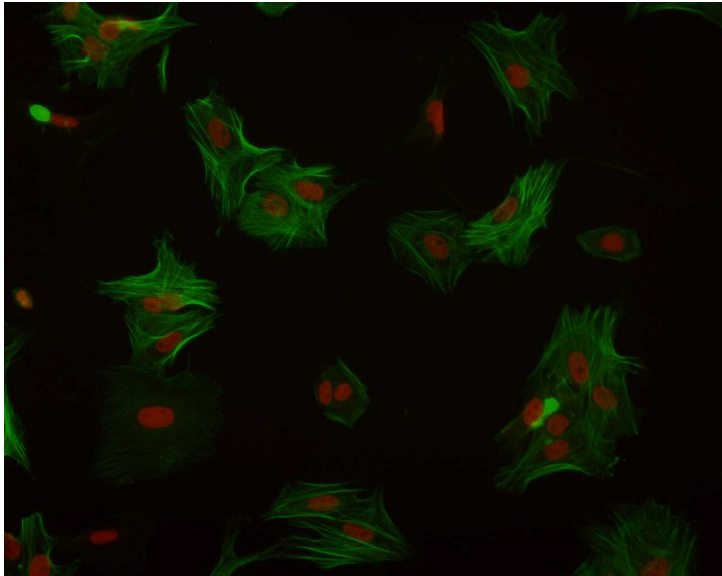
Sono stati condotti esperimenti di immunocitochimica su una parte delle cellule per verificare che nella coltura fossero presenti unicamente cellule muscolari.

Le cellule sono state seminate in piastre da 24 well e una volta arrivate a confluenza sono state trattate con anticorpo specifico per α -actina. Questa proteina è espressa solo nelle cellule muscolari ed è il maggior costituente dell'apparato contrattile.

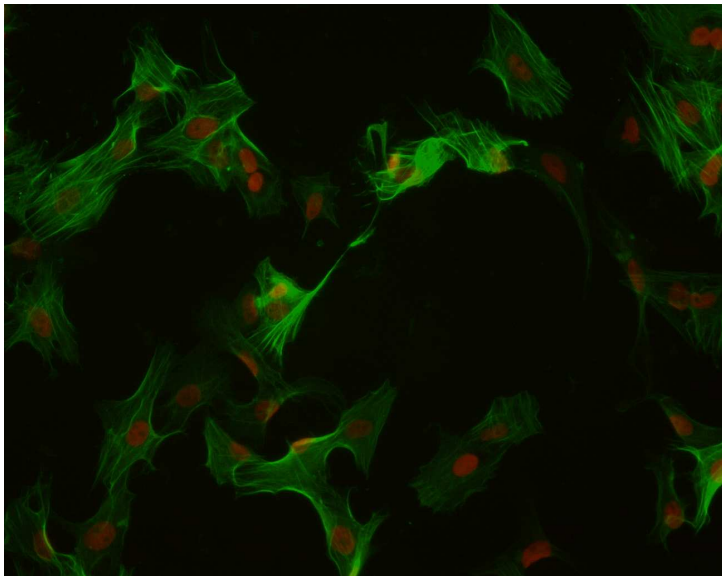
Le cellule sono state trattate con l'anticorpo specifico per evidenziare i filamenti di actina e con ioduro di propidio per evidenziare i nuclei cellulari. Successivamente i vetrini sono stati osservati al microscopio a fluorescenza.

Nelle foto tutte le cellule presenti sono cellule muscolari, infatti tutti i nuclei (in rosso) sono circondati da filamenti di α -actina (in verde) (**Figura 1**)

Figura 1: Immunocitochimica per α -actina nelle cellule muscolari lisce controllo e diabetiche



Cellule controllo



Cellule diabetiche

4.2 EFFETTO DEGLI AGONISTI SELETTIVI PER ER α ED ER β SULL'ESPRESSIONE DI iNOS IN SMC CONTROLLO E DIABETICHE STIMOLATE CON CITOCHINE

In condizioni normali, l'enzima inducibile iNOS è virtualmente assente nelle SMC; tuttavia, la sua espressione può essere indotta da citochine infiammatorie e dall'LPS. Per valutare l'espressione della iNOS in seguito allo stimolo infiammatorio e le modificazioni dell'attività funzionale dell'enzima in seguito al trattamento con le diverse sostanze ad attività estrogenica, le cellule sono state mantenute in MEM bianco per 3 giorni prima della stimolazione.

Negli esperimenti qui riportati le SMC, dopo le preincubazioni in MEM bianco, sono state trattate con concentrazioni crescenti di un agonista selettivo di ER α (PPT, 10^{-9} – 10^{-6} M) e di un agonista selettivo di ER β (DPN, 10^{-9} – 10^{-6} M) in presenza della miscela di citochine. Le figure riportano l'analisi densitometrica dell'espressione dell'enzima iNOS misurata con Western blotting nei due gruppi cellulari.

Come atteso, le citochine hanno stimolato l'espressione dell'enzima iNOS. Il trattamento con l'agonista selettivo ER α , PPT, ha ridotto fino al 20% i livelli della proteina iNOS in SMC di controllo. Al contrario, nelle SMC diabetiche il trattamento con PPT non ha avuto effetti significativi sull'espressione di iNOS (**Figura 2**).

Nella **Figura 3** sono invece riportati gli effetti di concentrazioni crescenti di DPN sui livelli di proteina iNOS. Questo agonista selettivo di ER β ha indotto un aumento dose-dipendente dell'espressione della iNOS nelle SMC controllo. Nelle SMC diabetiche, il DPN ha avuto effetti analoghi a quelli osservati nelle SMC di controllo, stimolando l'espressione di iNOS (**Figura 3**).

Questi risultati dimostrano che i ligandi selettivi per ER α e ER β modulano l'espressione di iNOS nelle SMC e suggeriscono effetti distinti dei recettori degli estrogeni nella risposta allo stato infiammatorio vascolare.

Figura 2: Effetto del PPT sull'espressione di iNOS in SMC controllo e SMC diabetiche preincubate in MEM bianco

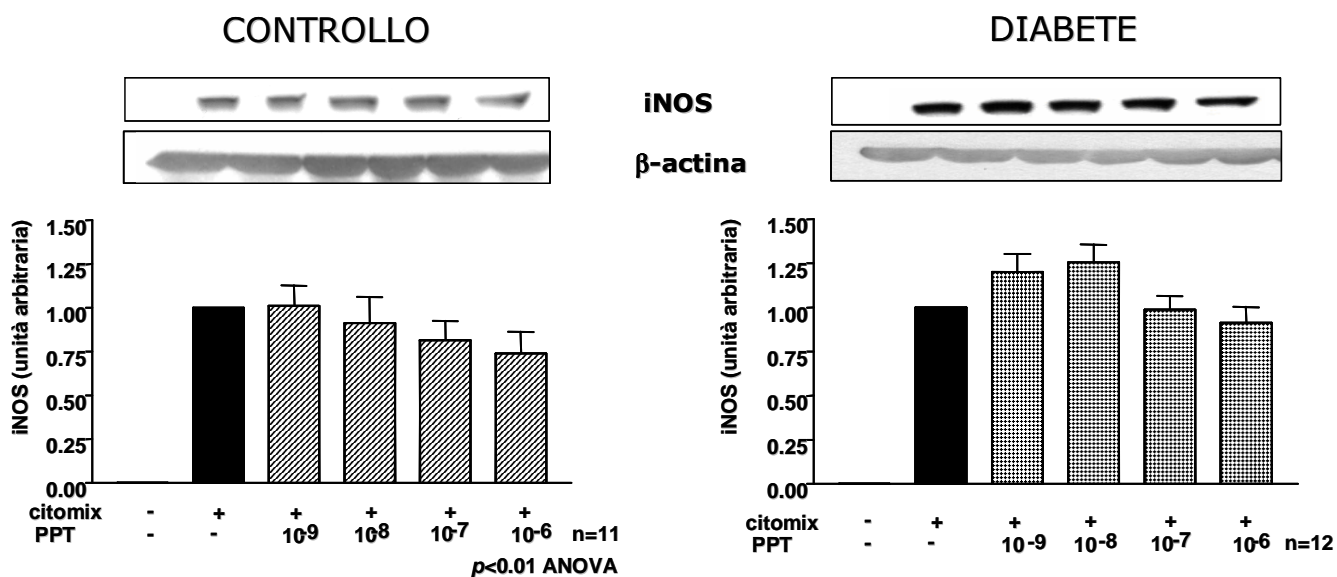
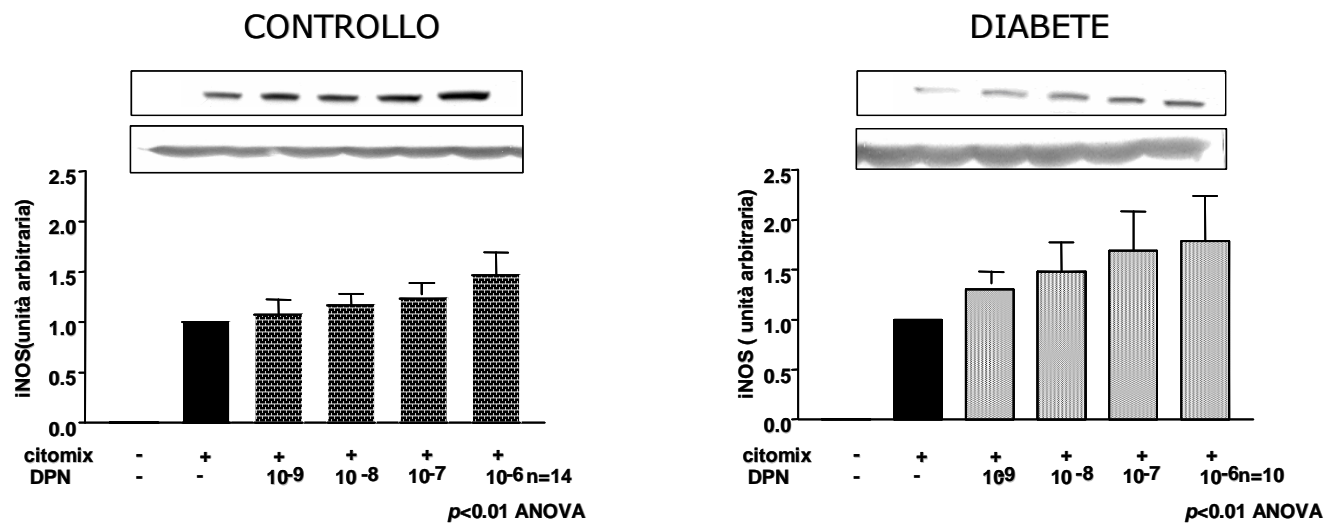


Figura 3: Effetto del DPN sull'espressione di iNOS in SMC controllo e SMC diabetiche preincubate in MEM bianco



4.3 EFFETTO DEGLI AGONISTI SELETTIVI SULLA LIBERAZIONE DI NO NEL MEDIUM

L'attività della iNOS è stata valutata mediante il metodo colorimetrico di Griess, chemisura i livelli di nitrito (NO_2^-), metabolita relativamente stabile di NO, nel terreno di coltura. Come negli esperimenti precedenti, le SMC sono state precubate in MEM bianco, sincronizzate e successivamente stimulate per 24 ore con una miscela di citochine in presenza di concentrazioni crescenti di un agonista selettivo di $\text{ER}\alpha$ (10^{-9} – 10^{-6} M) e di un agonista selettivo di $\text{ER}\beta$ (10^{-9} – 10^{-6} M).

Come atteso, le SMC trattate con il citomix hanno presentato un aumento significativo nei livelli di NO_2^- nel terreno di coltura come conseguenza dell'induzione di iNOS e non delle altre isoforme, come dimostrato in esperimenti condotti in presenza di inibitori specifici e non specifici [Maggi et al, 2003]

Nelle SMC controllo il PPT ha provocato una riduzione dei livelli di NO_2^- fino al 30% rispetto ai livelli raggiunti dopo stimolazione con le citochine. Nelle SMC diabetiche, il PPT non ha provocato variazioni significative dei livelli di NO_2^- rispetto al citomix da solo (**Figura 4**).

Il DPN non ha provocato alcuna variazione dei livelli di NO_2^- rispetto a quelli raggiunti dopo stimolazione con le citochine nè nelle SMC controllo nè nelle SMC diabetiche (**Figura 5**).

In generale la produzione di NO_2^- nel terreno di coltura nelle SMC diabetiche è inferiore a quella delle SMC controllo a causa di una ritardata cinetica di attivazione dell'enzima [Maggi et al, 2003].

FIGURA 4: Effetto del PPT sui livelli di nitrito nel medium di SMC controllo e SMC diabetiche

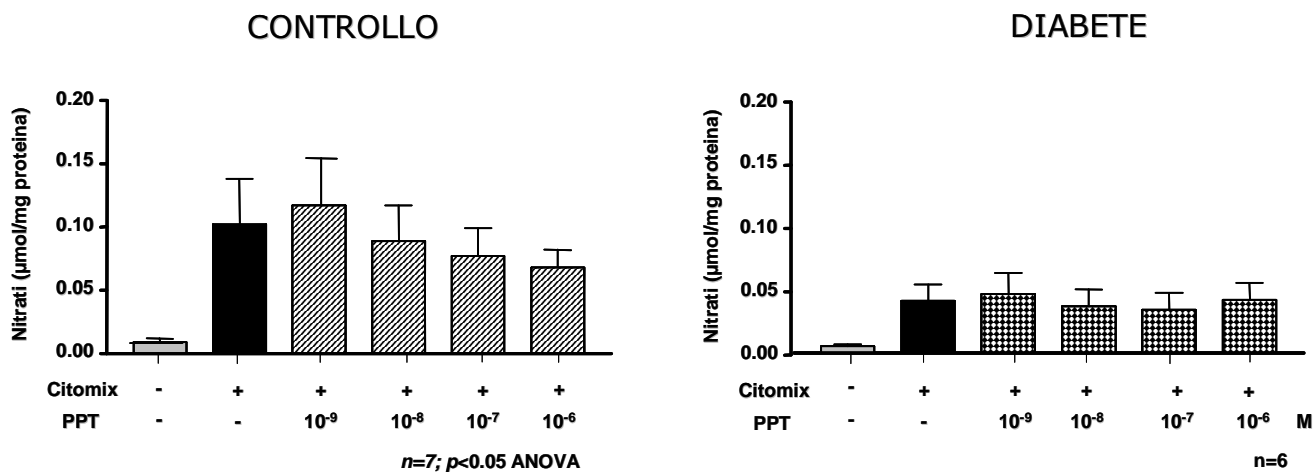
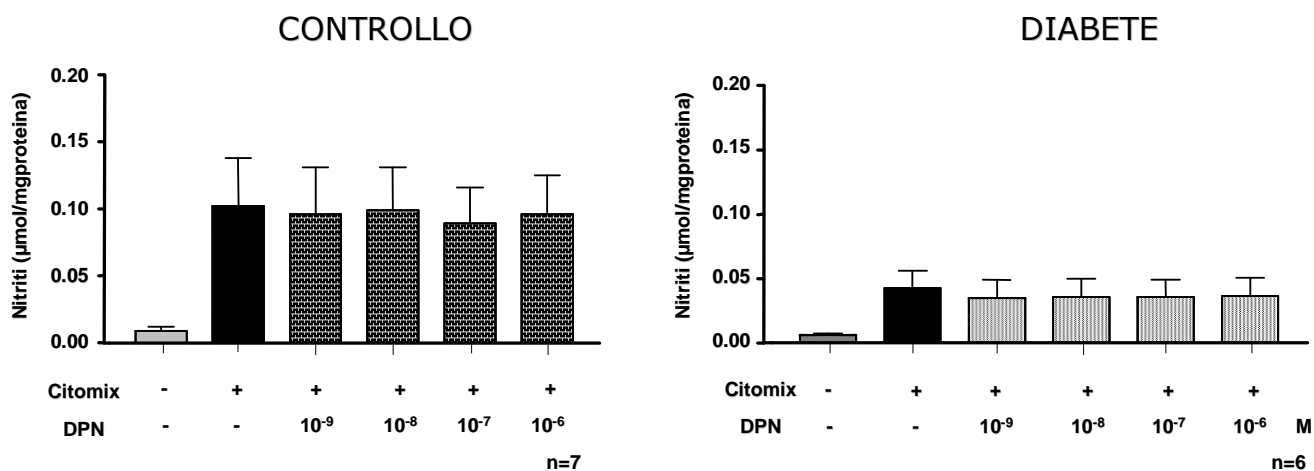


FIGURA 5: Effetto del DPN sui livelli di nitrito nel medium di SMC controllo e SMC diabetiche



4.4 EFFETTO DEGLI AGONISTI SELETTIVI SULL'ESPRESSIONE DI P-ERK1-2

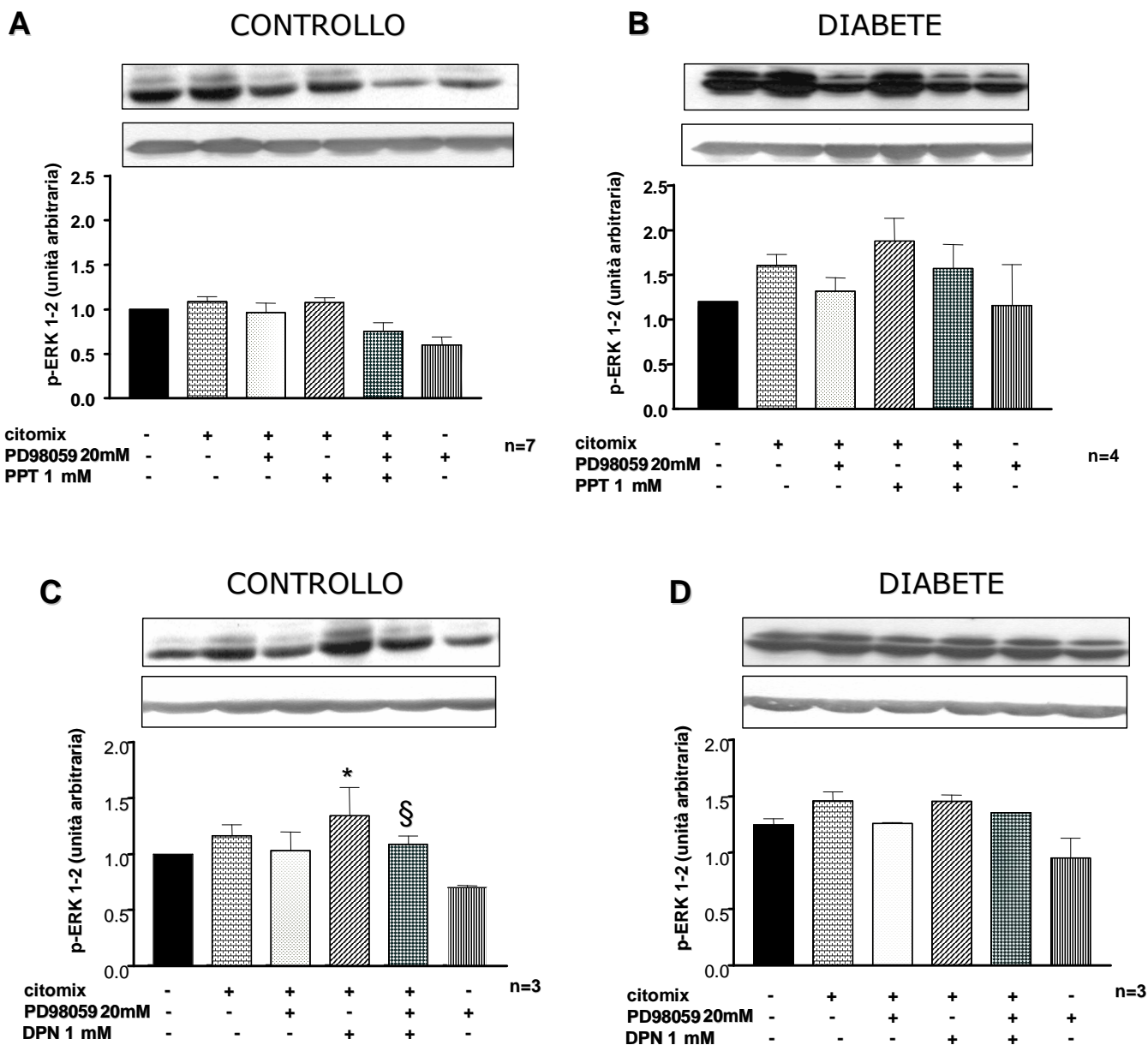
Per determinare un possibile meccanismo molecolare di trasduzione implicato nell'azione degli agonisti selettivi, nelle stesse condizioni degli esperimenti precedenti sono stati valutati i livelli della forma fosforilata di ERK1-2 (P-ERK1-2), una chinasi coinvolta nella traduzione del segnale non genomico di ER α e ER β , nelle SMC in presenza di PPT, DPN e PD98059, un'inibitore delle MEK-1.

Le figure mostrano l'analisi densitometrica dell'espressione dell'enzima P-ERK1-2 misurata con Western blotting in SMC controllo e SMC diabetiche.

Nelle SMC controllo, il trattamento con PPT non ha modificato i livelli di ERK1-2 fosforilata (**Figura 6 A**), mentre il trattamento con DPN ha innalzato i livelli della proteina. Il pre-trattamento con l'antagonista specifico di MEK-1, PD98059, ha bloccato l'effetto dell'agonista di ER β (**Figura 6 C**).

Nelle SMC diabetiche non è stato osservato un effetto significativo dei due agonisti selettivi, probabilmente perchè già a livello basale il sistema delle MAPK appare sovrattivato rispetto al controllo (**Figura 6 B-D**).

FIGURA 6: Effetto degli agonisti selettivi sull'espressione di P-ERK1-2 in SMC controllo e SMC diabetiche



* p < 0.05 vs basale; §p<0.05 vs citomix+DPN

4.5 IL DIABETE NON INFLUENZA L'ATTIVITA' TRASCRIZIONALE DEI RECETTORI DEGLI ESTROGENI NELLE SMC

Negli esperimenti condotti precedentemente è stato dimostrato che nelle SMC vascolari di ratto vi è una regolazione opposta dell'iNOS da parte degli agonisti selettivi degli estrogeni e l'effetto protettivo mediato dal recettore $ER\alpha$ si perde nelle SMC diabetiche.

Per indagare un potenziale meccanismo, le SMC di ratto controllo e diabetico sono state trasfettate con le due isoforme recettoriali degli estrogeni. Il trattamento con l'estrogeno incrementa l'attività trascrizionale di $ER\alpha$ e $ER\beta$ in entrambi i tipi cellulari (**figura 7**), suggerendo che l'attività trascrizionale non è alterata dal diabete.

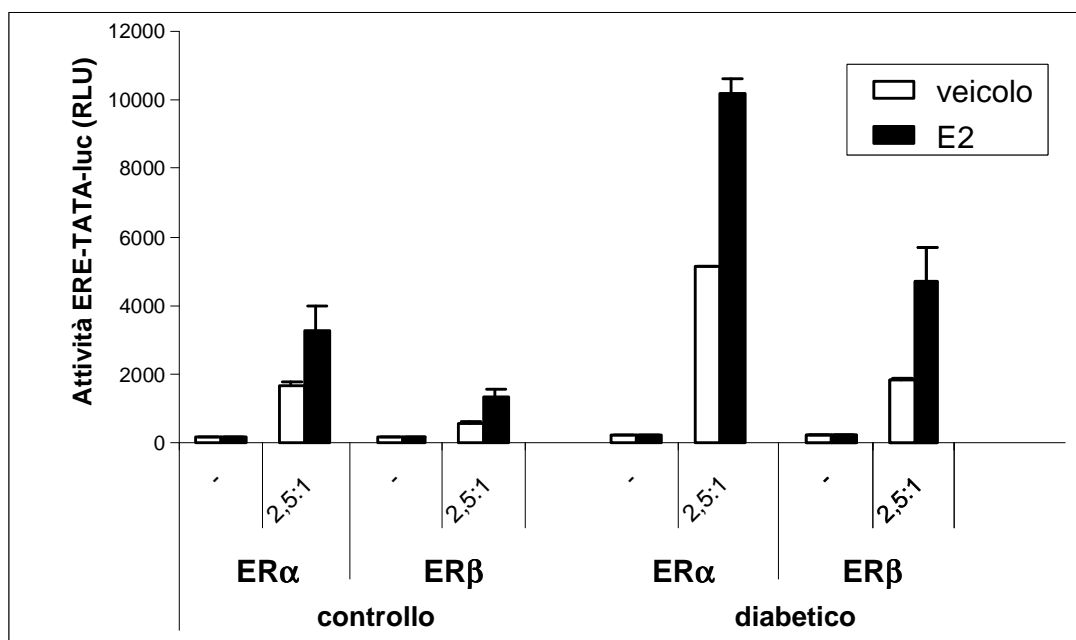


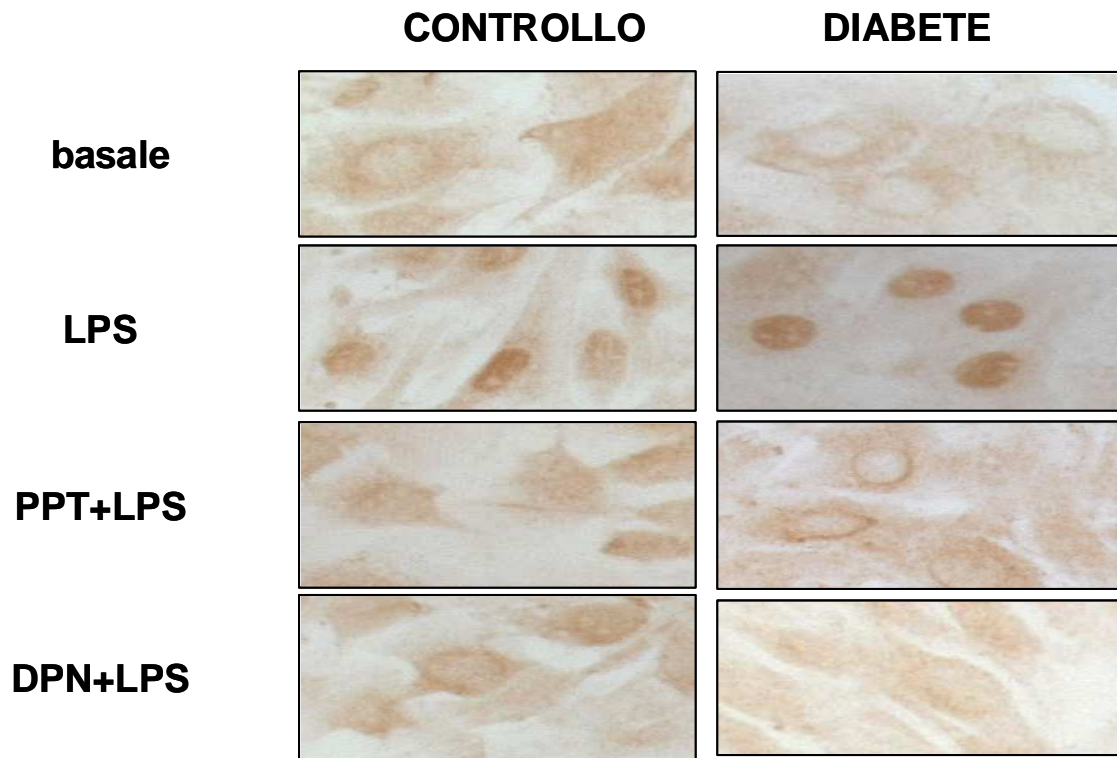
FIGURA 7: Attività trascrizionale delle isoforme recettoriali ER in SMC controllo e SMC diabetiche. Le cellule sono state trasfettate con $ER\alpha$ e $ER\beta$ e trattate con 1nmol/L di E_2 per 24 ore. è stata misurata l'attività ERE-TATA.

4.6 GLI AGONISTI SELETTIVI PER LE DUE ISOFORME RECETTORIALI DEGLI ESTROGENI PREVENGONO LA TRASLOCAZIONE DI p65

Poiché studi precedenti hanno dimostrato che il fattore di trascrizione p65, un componente di NF- κ B, gioca un importante ruolo nell'azione anti-infiammatoria dell'estrogeno è stato valutato se l'opposta modulazione dell'iNOS in seguito al trattamento con PPT e DPN fosse dovuta ad una diversa modulazione della traslocazione di p65.

Per valutare la traslocazione di p65 in SMC controllo e diabetiche sono stati condotti esperimenti di immunocitochimica. In presenza di LPS si ha aumento di p65 nel nucleo cellulare. Il pre-trattamento con gli agonisti selettivi per le due isoforme recettoriali, PPT e DPN, blocca la traslocazione di p65 sia nelle cellule controllo che nelle cellule diabetiche, suggerendo che nelle SMC il diverso controllo dell'iNOS mediato dalla due isoforme recettoriali degli estrogeni è indipendente da NF- κ B (**figura 8**).

FIGURA 8: Immunocitochimica per p65 ottenuta in SMC controllo e diabetiche, trattate con LPS, PPT e DPN

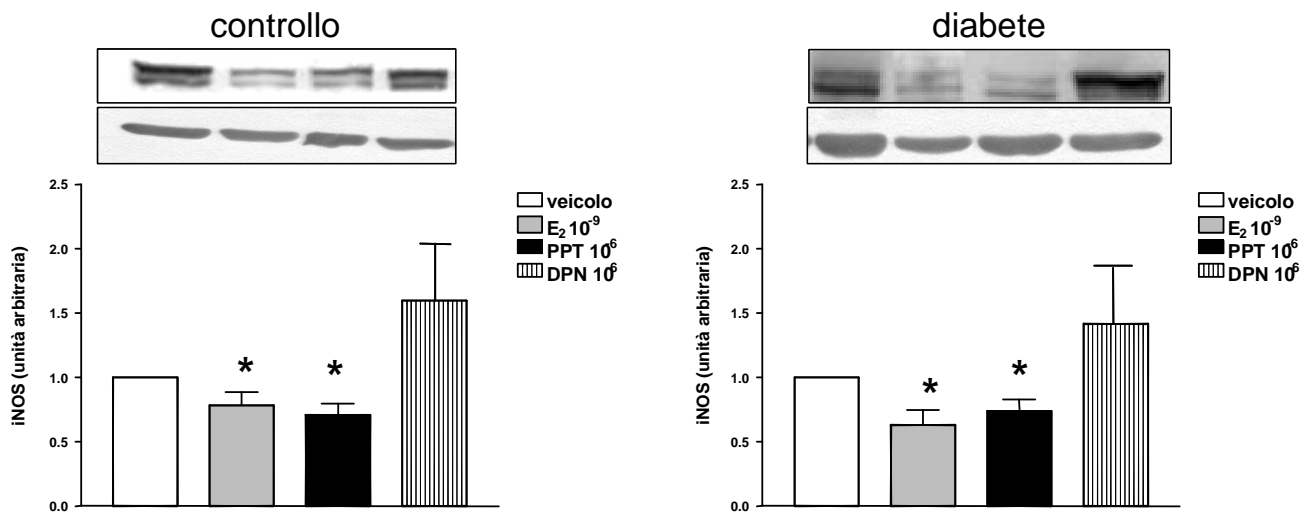


4.7 EFFETTO DEI COMPOSTI ESTROGENICI SULL'ESPRESSIONE DELLA NO SINTETASI INDUCIBILE NELLA PARETE VASCOLARE DI TOPO

In condizioni normali, l'enzima inducibile iNOS è assente nella parete vascolare di topo; tuttavia, la sua espressione può essere indotta da citochine infiammatorie. Per valutare l'espressione della iNOS in seguito allo stimolo infiammatorio e le modificazioni dell'attività funzionale dell'enzima in seguito al trattamento con le diverse sostanze ad attività estrogenica, gli anelli di aorta di topo sono stati mantenuti in MEM bianco per 2 giorni prima della stimolazione.

Negli esperimenti qui riportati i tessuti, dopo la preincubazione in MEM bianco, sono stati trattati con il 17β -estradiolo (10^{-9} M), l'agonista selettivo di ER α PPT (10^{-6} M) e l'agonista selettivo di ER β DPN (10^{-6} M) in presenza della miscela di citochine. Le figure riportano l'analisi densitometrica dell'espressione dell'enzima iNOS misurata con Western blotting nella parete vascolare di animali *wild-type* normoglicemici e diabetici.

Come atteso, le citochine hanno stimolato l'espressione dell'enzima iNOS. Il trattamento con il 17β -estradiolo e il PPT ha ridotto in maniera significativa i livelli della proteina iNOS nei tessuti degli animali normoglicemici e diabetici. Al contrario, il trattamento con il DPN ha indotto un aumento dei livelli di proteina iNOS che comunque non raggiungeva la significatività (**Figura 9**).

FIGURA 9: Effetto dei composti estrogenici sull'espressione di iNOS nella parete vascolare di topo

n=4-5; *p<0.05 vs veicolo ANOVA a una via

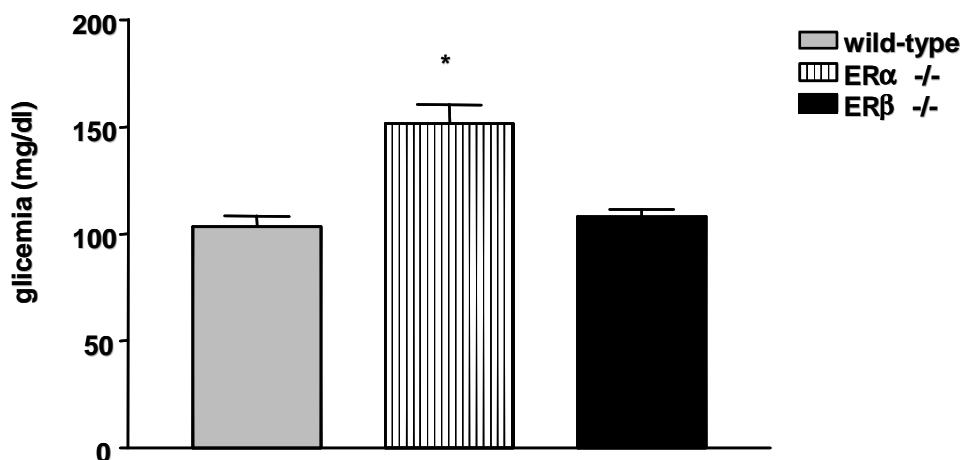
4.8 LIVELLI DI GLICEMIA NEGLI ANIMALI WILD-TYPE E NEGLI ANIMALI KNOCK-OUT PER I RECETTORI DEGLI ESTROGENI

Per caratterizzare gli effetti della delezione dei geni ER sull'omeostasi del glucosio sono stati misurati i livelli di glicemia basali negli animali *wild-type* e *knockout* per ER α ed ER β tenuti a digiuno per 24 ore.

I livelli circolanti di glucosio negli animali sono risultati significativamente più alti negli animali ER α -/- rispetto agli animali *wild-type* ed ER β -/- (**Figura 10**).

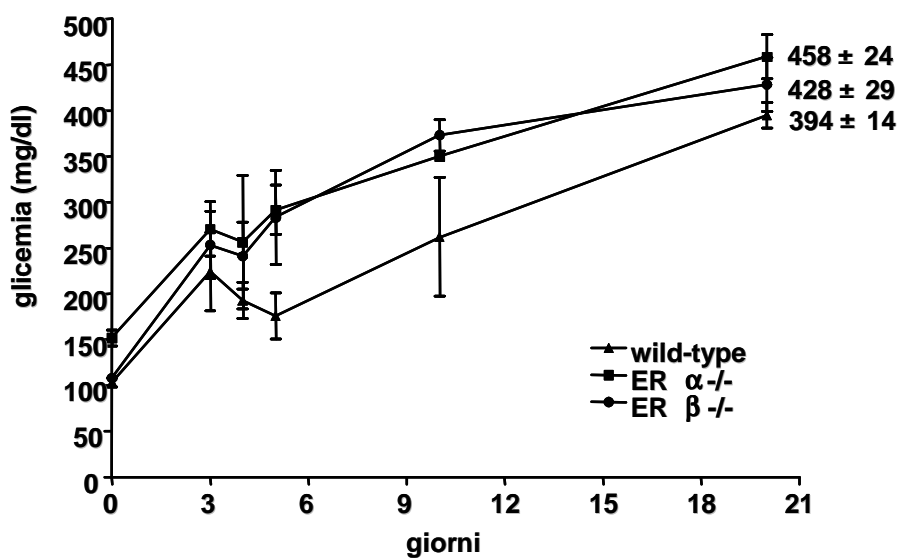
Nei giorni successivi all'induzione del diabete i livelli di glicemia a digiuno sono aumentati rapidamente negli animali ER α -/- e ER β -/- in maniera simile al gruppo *wild-type*. Al momento del sacrificio dopo 21 giorni, , nonostante le differenze osservate negli animali non diabetici, i valori di glicemia nei tre gruppi sperimentali erano paragonabili (**Figura 11**).

FIGURA 10: Livelli basali di glicemia nei topi *wild-type* e *knockout* per ER.



n=17; *p< 0,01 verso wild-type e ER β -/-, ANOVA a una via

FIGURA 11: Andamento nel tempo della glicemia negli topi *wild-type* (n=55), ER α -/- (n= 34), ER β -/- (n=33) dopo iniezione di streptozotocina (150 mg/Kg)



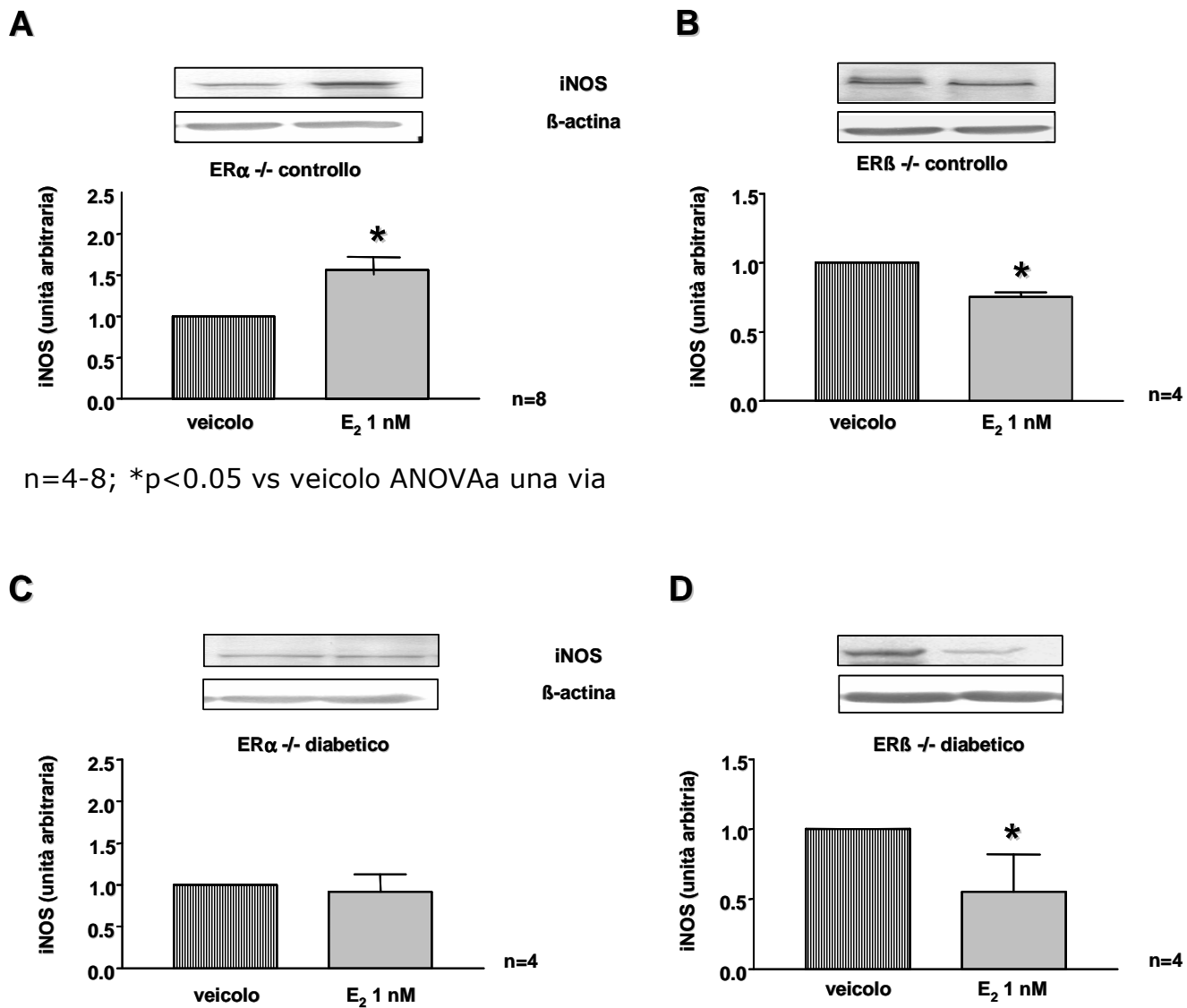
4.9 EFFETTO DEL 17 β -ESTRADIOLO SULL'ESPRESSIONE DI iNOS NELLA PARETE VASCOLARE DI ANIMALI *KNOCKOUT* PER ER α O ER β

Dopo aver sacrificato gli animali ER α ^{-/-} o ER β ^{-/-} normoglicemici e diabetici, gli anelli di aorta sono stati messi in coltura, stimolati con citochine in presenza o in assenza di 1 nmol/L di 17 β -estradiolo e successivamente sono stati valutati i livelli di espressione di iNOS.

Negli animali sani, in assenza del recettore ER α , il trattamento con estrogeno ha incrementato i livelli di iNOS (**figura 12 A**), mentre negli animali ER β ^{-/-} il trattamento con il 17 β -estradiolo ha diminuito in maniera significativa i livelli di proteina (**figura 12 B**). Questi dati suggeriscono che il recettore ER α media l'azione inibitoria dell'estrogeno su marker dell'infiammazione nella parete vascolare, mentre l'attivazione di ER β comporta effetti opposti.

Negli animali diabetici, i livelli di iNOS sono diminuiti in maniera significativa negli animali *knockout* per ER β , dimostrando un ruolo prominente di ER α nell'infiammazione vascolare anche nei topi insulino-deficienti (**figura 12 C**). Inaspettatamente il trattamento con estrogeno non ha modificato il livello di iNOS negli animali diabetici *knockout* per ER α (**figura 12 D**).

FIGURA 12: Effetto del 17 β -estradiolo sull'espressione di iNOS nella parete vascolare di topi ER α -/- e ER β -/-



n=4-8; *p<0.05 vs veicolo ANOVA a una via

n=4-8; *p<0.05 vs veicolo ANOVA a una via

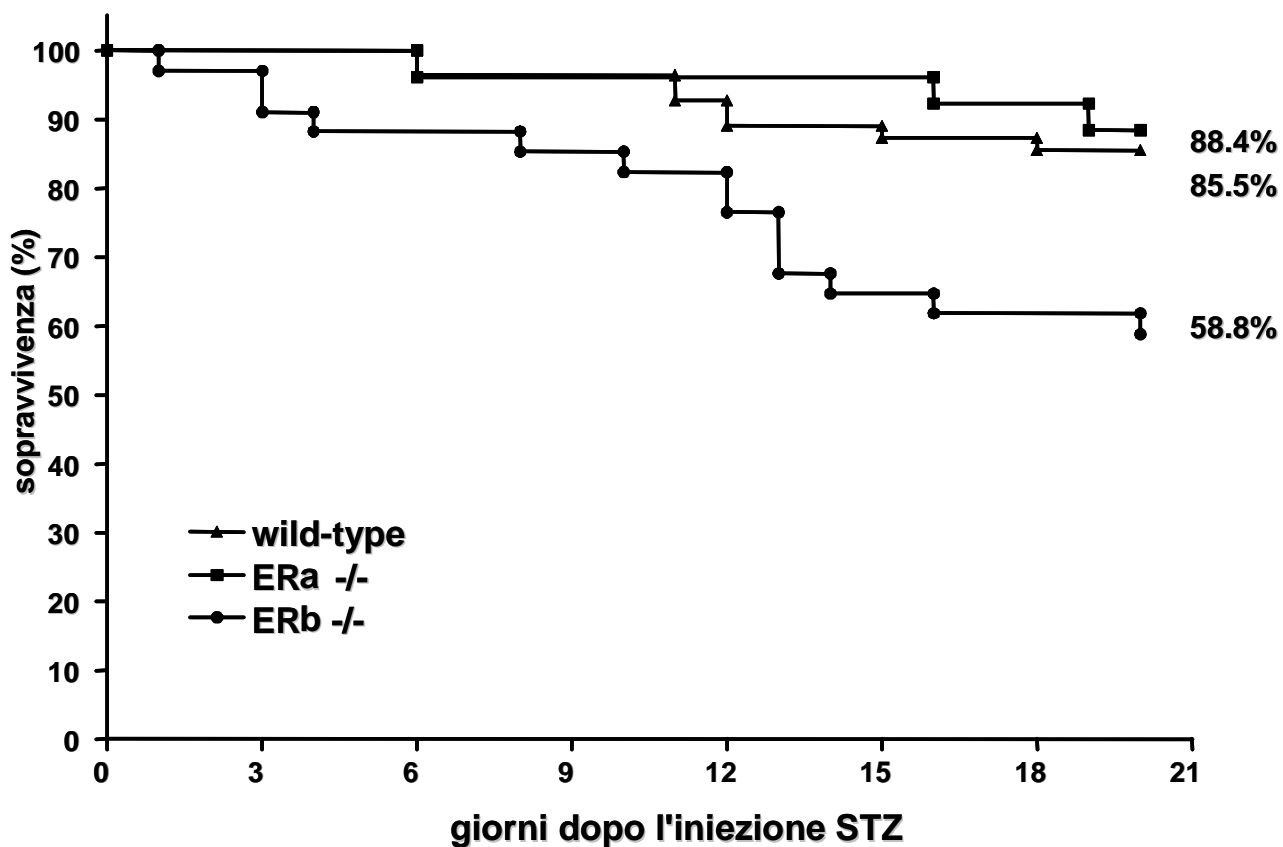
4.10 GLI ANIMALI KNOCKOUT PER IL RECETTORE ER β SONO PREDISPOSTI ALLA TOSSICITA' DA STREPTOZOTOCINA

Dopo l'induzione del diabete mediante iniezione di streptozotocina gli animali sono stati seguiti per 3 settimane per valutare il grado delle complicazioni indotte dalla STZ.

E' stata ottenuta una curva cumulativa della sopravvivenza degli animali ed è stata osservata un'elevata mortalità negli animali knockout per il recettore ER β . Solo il 58.8% degli animali ER β -/- è sopravvissuto mentre gli altri due gruppi sperimentali presentavano un sopravvivenza dell'88.4% nei topi ER α -/- e 85.5% nei topi wt (**figura 13**).

Questi risultati indicano che la delezione del recettore ER β predispone ad una tossicità da STZ attraverso vie che apparentemente non coinvolgono l'omeostasi del glucosio, mentre la delezione di ER α sembra conferire protezione attraverso meccanismi non vascolari.

Figura 13: Curva cumulativa di Kaplan-Meier della sopravvivenza negli animali wt (n=55), ER α -/- (n=34) e ER β -/- (n=33) dopo iniezione di streptozotocina (150 mg/Kg)



5. Discussione

L'incidenza delle malattie cardiovascolari differisce significativamente tra uomini e donne, in parte a causa di diversità in alcuni fattori di rischio e nel profilo degli ormoni sessuali; infatti, prima della menopausa, le donne sono meno a rischio per patologie cardiovascolari, aterosclerosi, ipertensione e ictus.

L'estrogeno esercita attività anti-infiammatorie nel tessuto vascolare, in quanto è in grado di inibire l'attivazione della iNOS [Zancan et al, 1999], la proliferazione e la migrazione delle SMC [Suzuki et al, 1996] e la formazione dell'intima [Akishita et al, 1997; Oparil et al, 1997]. Tutto ciò proteggerebbe contro la progressione dello stato infiammatorio e dello stress ossidativo tipico del processo aterosclerotico. Le azioni dell'estrogeno nei vasi sembrano mediate da ER in quanto, a livello cellulare, sono annullate dall'antagonista recettoriale ICI 182,780 [Dubey et al, 2000].

Il diabete è una malattia caratterizzata da un quadro infiammatorio e da disfunzione endoteliale. Nelle donne in premenopausa, questa patologia abolisce la protezione verso le malattie cardiovascolari [Kannel et al, 1995].

In questo studio, utilizzando *tool* farmacologici e genetici, abbiamo messo in evidenza il profilo farmacologico e potenziali applicazioni terapeutiche di agonisti selettivi ER α nel controllo dello stato infiammatorio vascolare associato al diabete.

La novità più importante di questo studio è la dimostrazione diretta delle funzioni distinte di ER α e ER β nella parete vascolare. Abbiamo focalizzato la nostra attenzione su una proteina chiave della disfunzione vascolare diabetica, l'iNOS. Per azione di diverse citochine [De Vera et al, 1996], i cui livelli sono alti nel diabete, e per l'aumentata attivazione della PKC [Inoguchi et al. 1992], nelle SMC viene indotta l'espressione della iNOS [Paul et al, 1997]. Questa isoforma produce elevate quantità di NO che reagisce con i radicali liberi dell'ossigeno generati durante l'infiammazione, causando la formazione di perossinitriti, i principali mediatori degli effetti citotossici di NO [Sydney et al, 1992]. Sembra, quindi, che l'aumentata produzione di NO da parte dell'iNOS possa essere uno dei meccanismi responsabili della disfunzione vascolare nel diabete [Gunn et al, 2003]. Nel modello utilizzato in questo studio, l'espressione della iNOS è stata indotta stimolando le SMC vascolari per 24 ore con una miscela di citochine costituita da IL1 β , TNF α ed IFN γ più LPS. Questo modello riproduce uno stato infiammatorio simile a quello riscontrabile in vivo, dove è possibile documentare la presenza contemporanea di diverse citochine e molecole pro-infiammatorie di

diversa origine. L'estrogeno inibisce la iNOS solo nelle cellule di ratto normoglicemico [Zancan et al, 1999] ma non nelle cellule di ratto diabetico [Maggi et al, 2003]. Questa modulazione dell'enzima è stata anche documentata in termini di attività, valutata mediante il dosaggio dei livelli di nitrito nel terreno di coltura. La perdita dell'effetto anti-infiammatorio potrebbe essere dovuta a un aumento di espressione delle due isoforme recettoriali nelle cellule diabetiche; inoltre, in queste cellule il rapporto relativo tra ER α ed ER β è spostato verso un aumento di ER β [Maggi et al, 2003].

Le SMC esprimono entrambe le isoforme recettoriali [Mendelsohn et al, 1999;Hodges et al, 2000] e l'estrogeno si lega ad esse con la medesima affinità; pertanto, per valutare meglio il contributo relativo di ciascuna isoforma nella modulazione della iNOS, abbiamo utilizzato i due agonisti selettivi.

Il DPN, un agonista di ER β , ha provocato un aumento dell'espressione della proteina iNOS in entrambi i tipi cellulari, ma non ha provocato variazioni dei livelli di nitriti. Questo potrebbe essere causato da una modificazione post-traduzionale della iNOS da parte dell'agonista selettivo. Analogamente all'estrogeno il PPT, agonista selettivo di ER α , ha invece diminuito l'espressione della proteina e, in modo ancora più evidente, la sua attività nelle SMC di controllo, ma non nelle SMC diabetiche. L'attività anti-infiammatoria dell'estrogeno sembra quindi mediata da ER α , come è stato dimostrato anche in altri tessuti, ad esempio nel cervello, dove questa isoforma recettoriale media la protezione degli estrogeni nei confronti della neurodegenerazione [Vegeto et al, 2003]. In linea con queste considerazioni, è stato già descritto che l'attivazione di ER α riduce l'espressione di iNOS in anelli di aorta privi di endotelio [Zhu et al, 2002].

Abbiamo dimostrato che ER α riduce la risposta infiammatoria nelle cellule vascolari, mentre ER β la aumenta.

Poiché Ghisletti et al [2005] hanno dimostrato il coinvolgimento della via di NF- κ B negli effetti anti-infiammatori del 17 β -estradiolo è stato valutato se il diverso meccanismo d'azione degli agonisti ER selettivi nell'induzione della iNOS nelle SMC fosse dovuto ad un diversa attivazione della traslocazione di p65, componente della famiglia di NF- κ B. In realtà gli esperimenti di immunocitochimica hanno escluso un coinvolgimento distinto di questa via negli effetti pro e anti-infiammatori indotti dagli agonisti selettivi.

In questo studio, inoltre, si evidenzia come l'attività anti-infiammatoria di ER α sia presente anche nei vasi dei topi diabetici. Un'altra importante osservazione di questo studio è il fatto che l'agonista ER α -selettivo inibisce l'infiammazione vascolare nei topi normoglicemici e diabetici. Questo effetto è stato osservato in anelli di aorta intera ma non nelle SMC isolate da animali diabetici, suggerendo quindi che l'attivazione di ER α nelle SMC e in altri tipi cellulari (endotelio, avventizia) sia in grado di ridurre la risposta infiammatoria in un contesto più fisiologico anche se più complesso. In linea con le nostre osservazioni, studi precedenti hanno evidenziato il coinvolgimento selettivo di ER α nell'*uptake* del glucosio nella muscolatura scheletrica e nel pancreas [Le May et al, 2006; Barros et al 2006], Rimane ancora da valutare il fatto che la funzionalità di ER α sia influenzata dalle complicanze macrovascolari in stadi più avanzati della patologia diabetica.

Dal punto di vista farmacologico, l'osservazione che un agonista ER α -selettivo, senza attivare ER β , mantiene la sua attività anti-infiammatoria anche in presenza di un continuo stato iperglicemico suggerisce il possibile utilizzo di ligandi specifici per le isoforme recettoriali di ER per prevenire le complicanze vascolari nelle donne in postmenopausa. I dati clinici disponibili sulla terapia ormonale indicano che l'uso dell'agente ormonale non selettivo E₂ è associato ad una ridotta incidenza di diabete senza alcun beneficio sugli eventi cardiovascolari nelle donne in postmenopausa [Kanaya et al, 2003; Margolis et al 2004]. Quindi l'agonista non selettivo E₂ potrebbe attivare vie con effetti contrastanti nelle cellule dove ER α ed ER β sono coespressi, riducendo i potenziali benefici terapeutici mediati da ciascuna delle due isoforme.

Ulteriori implicazioni di questo lavoro nascono dai ruoli distinti di ER α e ER β nel regolare la funzionalità vascolare, dal momento che lo squilibrio delle vie attivate da ER α vs ER β potrebbe predisporre a disfunzioni e complicanze vascolari [Barros et al, 2006]. Infatti, è stato dimostrato che l'espressione di ER α o ER β varia a seconda delle condizioni fisiologiche o patologiche, compresa l'infiammazione [Marriott et al, 2007; Schreihof et al, 2000]. Inoltre, poiché l'attività di ER dipende strettamente dalle interazioni con coregolatori e enzimi [Harrington et al, 2003], alterazioni dell'espressione o dell'attività di queste proteine potrebbero ugualmente influenzare l'attività del recettore. Si può quindi ragionevolmente supporre che alterazioni del rapporto o dell'attività di questi recettori potrebbero influire sugli effetti finali dell'azione degli estrogeni. I nostri dati sono in accordo

con uno studio recente che ha evidenziato funzioni opposte per ER α e ER β nel regolare gruppi distinti di geni nell'aorta di topo in risposte a E₂ [O'Lone et al, 2007]. Quindi, queste considerazioni sostengono la nostra ipotesi che, rispetto ai composti ormonali attualmente in uso, i ligandi ER α -selettivi siano composti più efficaci per l'integrità della parete vascolare, soprattutto in caso di patologie infiammatorie.

Per quanto riguarda il coinvolgimento specifico di ER β , il nostro lavoro fornisce indicazioni ma non prove definitive di una sua azione pro-infiammatoria nelle cellule vascolari. Per esempio, in anelli d'aorta di topi ER α -KO trattati con STZ, E₂ non modifica l'attività delle citochine (Fig. 4C). Ciò suggerisce che il diabete influenza l'attività di ER β interferendo con meccanismi compensatori, che sono attivati negli animali KO per superare il difetto genetico della delezione relativa all'altra isoforma recettoriale.

In questo lavoro di tesi è stata riscontrata anche un'elevata mortalità degli animali ER β -/- nelle 3 settimane successive all'induzione del diabete. Questo può essere dovuto ad un inasprimento delle patologie cardiache in seguito al trattamento con STZ [Schaffer et al 1989; Korte et al 2005]. Una spiegazione alternativa può essere che la delezione di ER β provoca una disfunzione del sistema immunitario, poiché questa isoforma recettoriale è espressa dalle cellule di questo sistema [Li et al 2006]. Questi esperimenti mostrano la complessità del meccanismo d'azione di ER β , che deve essere ulteriormente approfondito.

Questo ed altri lavori evidenziano un ruolo emergente degli ER come regolatori del metabolismo del glucosio e della disfunzione vascolare associate al diabete [Barros et al, 2006; Le May et al, 2006; Godslan et al, 2005; Bryzgalova et al, 2006]. Negli ultimi anni, sono stati pubblicati diversi studi riguardanti l'importanza di altri membri della superfamiglia dei recettori nucleari, tra cui LXR e FXR, nel metabolismo del glucosio e nella risposta all'insulina [Laffitte et al, 2003; Zhang et al, 2006; Cao et al, 2003]. Andando ad aggiungersi al ruolo ben caratterizzato dei PPAR in questo campo, queste osservazioni suggeriscono l'esistenza di meccanismi molecolari condivisi dai recettori nucleari attivati che governano il metabolismo integrato di lipidi e glucosio. Infine, potrebbero essere identificati bersagli o vie importanti, che siano suscettibili di modulazione farmacologica selettiva attraverso nuovi composti più efficaci e sicuri. Tali composti potrebbero portare a progressi nel trattamento della sindrome metabolica, del diabete e delle patologie correlate.

La disponibilità di composti selettivi per le isoforme di ER rappresenta un potente strumento di ricerca che certamente aiuterà a definire i dettagli delle interazioni tra ER α e ER β e con le altre componenti cellulari nella muscolatura vascolare, e permetterà di sfruttare il potenziale terapeutico degli agonisti di ER, soprattutto nella terapia delle patologie associate alla menopausa.

6. Bibliografia

- ❖ Akishita M., Ouchi Y., Miyoshi H. et al. Estrogen inhibits cuff-induced intimal thickening of rat femoral artery: effects on migration and proliferation of vascular smooth muscle cells. *Atherosclerosis* 1997; 30: 1-10.
- ❖ Alipui C., Tenner T. E. Jr., Ramos K. Rabbit aortic smooth muscle cell culture: a model for the pharmacological study of diabetes-induced alterations in cell proliferation. *J Pharmacol. Methods* 1992; 26: 211-222.
- ❖ Barchiesi F., Jackson E.K., Imthurn B. et al. Differential regulation of estrogen receptor subtypes α and β in human aortic smooth muscle cells by oligonucleotides and estradiol. *J Clin Endocrinol Metab* 2004; 89: 2373-2381.
- ❖ Bardell A.L., Macleod K.M. Evidence for inducible nitric-oxide synthase expression and activity in vascular smooth muscle of streptozotocin diabetic rats. *J Pharmacol Exp Ther.* 2001; 296: 252-259.
- ❖ Barrett-Connor E. Is insulin-dependent diabetes mellitus caused by coxsackie virus B infection? A review of epidemiologic evidence. *Rev Infect Dis* 1985; 7:207-215.
- ❖ Barrett-Connor E. Sex differences in coronary heart disease: why are women so superior? *Circulation* 1997; 95: 252-264.
- ❖ Barros RP., Machado UF., Gustafsson JÅ. Estrogen receptors: new players in diabetes mellitus *Trends Mol Med.* 2006;12:425-431.
- ❖ Barros RP., Machado UF., Warner M., Gustafsson JÅ. Muscle GLUT4 regulation byestrogen receptors ER β and ER α . *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2006;103:1605-1608.
- ❖ Beckman JA., Goldfine AB., Gordon MB. et al. Ascorbate restores endothelium-dependent vasodilation impaired by acute hyperglycemia in humans. *Circulation* 2001; 103: 1618-1623
- ❖ Bhalla RC., Toth KF., Bhatta RA. et al. Estrogen reduces proliferation and agonist-induced calcium increase in coronary artery smooth muscle cells. *Am J Physiol* 1997; 272: H1996-H2003
- ❖ Block N., Komori K., Robinson K. et al. Diabetes-associated impairment of hepatic insulin receptor tyrosine kinase activity: a study of mechanisms. *Endocrinology* 1991; 128: 312-322.
- ❖ Bolego C., Cignarella A, Sanvito P, Pelosi V, Pellegatta F, Puglisi L, Pinna C. The acute estrogenic dilation of rat aorta is mediated solely by selective estrogen receptor- α agonists and is abolished by estrogen deprivation. *J Pharmacol Exp Ther* 2005; 313:1203-1208
- ❖ Bolego C., Cignarella A., Ruzza R. et al. Differential effects of low- and high-dose estrogen treatments on vascular responses in female rats. *Life Sci* 1997; 60: 2291-2302.

- ❖ Bolego C., Cignarella A., Zancan V. et al. Diabetes abolishes the vascular protective effects of estrogen in female rats. *Life Sci* 1999; 64: 741-749.
- ❖ Bomalaski J.S., Chen M.J., Clark M.A. Induction of phospholipase A₂ activity and synthesis of phospholipase A₂ activating protein (PLAP) by tumor necrosis factor (Abstract). *Arthritis Rheum* 1987; 30: S28.
- ❖ Borissova A.M., Zaharieva S., Tankova T.S.V. et al. Prostaglandin E₂ affects both insulin secretion and peripheral insulin sensitivity. *Diabetes Metab* 1991; 17: 346-349.
- ❖ Brownlee M., Cerami A., Vlassara H. Advanced glycosylation end products in tissue and the biochemical basis of diabetic complications. *N Engl J Med* 1988; 318: 1315-1321.
- ❖ Bryzgalova G., Gao H., Ahren B., et al. Evidence that oestrogen receptor- α plays an important role in the regulation of glucose homeostasis in mice: insulin sensitivity in the liver. *Diabetologia*. 2006;49:588-597.
- ❖ Brzozowski AM., Pike ACW., Dauter Z. et al. Molecular basis of agonism and antagonist in the estrogen receptor. *Nature* 1997; 389, 753-758
- ❖ Bucala R., Tracey K.J., Cerami A. Advanced glycosylation products quench nitric oxide and mediate defective endothelium-dependent vasodilation in experimental diabetes. *J Clin Invest* 1991; 87: 432-438.
- ❖ Byers MJ, Zangl A, Phernetton TM, Lopez G, Chen DB, Magness RR. Endothelial vasodilator production by ovine uterine and systemic arteries: ovarian steroid and pregnancy control of ER α and ER β levels. *J Physiol* 2005;565(Pt 1):85-99
- ❖ Cao G., Liang Y., Broderick CL., et al. Antidiabetic action of a liver X receptor agonist mediated by inhibition of hepatic gluconeogenesis. *J Biol Chem*. 2003;278:1131-1136.
- ❖ Castano E., Vorojekina DP. and Notides AC. Phosphorylation of serine-167 on the human estrogen receptor is important for estrogen response element binding and transcriptional activation *Biochem J* 1997; 326:149-157
- ❖ Cenni B., Picard D. Ligand – independent activation of steroid receptors: new roles for old players. *Trends Endocrinol Metab* 1999; 10: 41-46.
- ❖ Chambliss KL., Shaul PW. Estrogen modulation of endothelial nitric oxide synthase. *Endocr Rev* 2002; 23:665-686
- ❖ Chen Z., Yuhanna I.S., Galcheva-Gargova Z., Karas R.H. et al. Estrogen receptor beta mediates the nongenomic activation of endothelial nitric oxide synthase by estrogen. *J Clin Invest* 1999; 103: 401-406.
- ❖ Cignarella A., Bolego C., Pinna C. et al. The influence of sex hormones on vascular responses in the aorta of

- streptozotocin-diabetic male rats. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* 2000; 361: 514-520.
- ❖ Cignarella A., Paoletti R., Puglisi L. Direct effects of estrogen on the vessel wall. *Med Res Rev* 2001; 21: 171-184.
 - ❖ Cosentino F., Eto M., De Paolis P. et al. High glucose causes upregulation of cyclooxygenase-2 and alters prostanoid profile in human endothelial cells: role of protein kinase C and reactive oxygen species. *Circulation* 2003; 107: 1017-1023
 - ❖ Cosentino F., Hishikawa K., Katusic ZC. et al. High glucose increases nitric oxide synthase expression and superoxide anion generation in human aortic endothelial cells. *Circulation* 1997;96: 25-28.
 - ❖ Darblade B, Pendaries C, Krust A, Dupont S, Fouque MJ, Rami J, Chambon P, Bayard F, Arnal JF. Estradiol alters nitric oxide production in the mouse aorta through the alpha-, but not beta-, estrogen receptor. *Circ Res.* 2002;90(4):413-9.
 - ❖ De Caterina R., Libby P., Peng H.B. et al. Nitric oxide decreases cytokine-induced endothelial activation. Nitric oxide selectively reduces endothelial expression of adhesion molecules and proinflammatory cytokines. *J Clin Invest* 1995; 96: 60-68.
 - ❖ De Vera M.E. , Shapiro R.A., Nussler A.K. et al. Transcriptional regulation of human inducible nitric oxide synthase (NOS2) gene by cytokines: initial analysis of the human NOS2 promoter. *Proc Natl Acad Sci USA* 1996; 93: 1054-1059.
 - ❖ De Vriese AS., Verbeuren TJ., Van de Voorde J., et al. Endothelial dysfunction in diabetes. *Br J Pharmacol* 2000; 130: 963-974
 - ❖ Dimitriadis E., Griffin M., Owens D. et al. Oxidation of low-density lipoprotein in NIDDM: its relationship to fatty acid composition. *Diabetologia* 1995; 38:1300-1306.
 - ❖ Dong Z.Y., Qi X.O., Xie K.P. et al. Protein tyrosine kinase inhibitors decrease induction of nitric oxide synthase activity in lipopolysaccharide-responsive and lipopolysaccharide-nonresponsive murine macrophages. *J Immunol* 1993; 151: 2717-2724.
 - ❖ Dubal DB., Zhu H., Yu J. et al. Estrogen receptor alpha, not beta, is a critical link in estradiol-mediated protection against brain injury. *Proc Natl Acad Sci USA* 2001; 98:1952-1957
 - ❖ Dubey R.K., Jackson E.K., Gillespie D.G. et al. Clinically used estrogens differentially inhibit human aortic smooth muscle cell growth and mitogen-activated protein kinase activity. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2000; 20: 964-972.
 - ❖ Dubey R.K., Jackson E.K., Lüscher T.F. Nitric oxide inhibits angiotensin II-induced migration of rat aortic smooth muscle cell. Role of cyclic-nucleotides and angiotensin-1 receptors. *J Clin Invest* 1995; 96: 141-149.

- ❖ Dubey RK., Oparil S., Imthurn B. et al. Sex hormones and hypertension. *Cardiovasc Res* 2002; 53:688-708
- ❖ Edwards DP Regulation of signal transduction pathways by estrogen and progesterone. *Annu. Rev. Physiol.* 2005; 67:335-76
- ❖ El Tanani M., Hickman S., Thomas C. et al. Two separate mechanisms for ligand-independent activation of the estrogen receptor. *Mol Endocrinol* 1997; 11 : 928-937
- ❖ Endoh H., Maruyama K., Masuhiro Y. et al. Purification and identification of p68 RNA helicase acting as a transcriptional coactivator specific of the activation function of Human estrogen receptor α . *Mol Cell Bio* 1999; 19: 5363-5372
- ❖ Esposito K., Nappo F., Marfella R. et al. Inflammatory cytokine concentrations are acutely increased by hyperglycemia in humans: role of oxidative stress. *Circulation* 2002; 106: 2067-2072
- ❖ Förstermann U., Closs E.I., Pollok J.S. et al. Nitric oxide synthase isozymes. Characterization, purification, molecular cloning, and functions. *Hypertension* 1994; 23: 1121-1131.
- ❖ Förstermann U., Kleinert H. Nitric oxide synthase: expression and expressional control of the three isoforms. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch Pharmacol* 1995; 352: 351-364.
- ❖ Fujii Y., Kaizuka M., Hashida F., et al. Insulin regulates Na^+ /glucose cotransporter activity in rat small intestine. *Biochim Biophys Acta* 1991; 1063: 90-94.
- ❖ Furchgott, RF., Zawadzki JV., The obligatory role of endothelial cells in the relaxation of arterial smooth muscle by acetylcholine, *Nature* 1980; 288: 373-376.
- ❖ Galea E, Santizo R., Feinstein DL. et al. Estrogen inhibits NF-kB dependent inflammation in brain endothelium without interfering with I κ B degradation. *Neuroreport* 2002; 13: 1469-1472
- ❖ Garg U.C., Hassid A. Nitric oxide-generating vasodilators and 8-bromocyclic guanosine monophosphate inhibits mitogenesis and proliferation of cultured rat vascular smooth muscle cells. *J Clin Invest* 1989; 83: 1774-1777.
- ❖ Gaub M.-P., Bellard M., Sheuer I. et al. Activation of the ovalbumin gene by the estrogen receptor involves the fos-jun complex. *Cell* 1990; 63: 1267-1276
- ❖ Ghisletti S, Meda C, Maggi A, Vegeto E. 17 β -estradiol inhibits inflammatory gene expression by controlling NF-kB intracellular localization. *Mol Cell Biol.* 2005; 25: 2957-68
- ❖ Godsland IF. Oestrogens and insulin secretion. *Diabetologia.* 2005;48:2213-2220.
- ❖ Greene G.L., Glina P., Waterfield M., et al. Sequence and expression of human estrogen receptor complementary DNA. *Science* 1986; 231:1150-4

- ❖ Gunnett CA., Chu Y., Heistad DD. et al. Vascular effects of LPS in mice deficient in expression of the gene for inducible nitric oxide synthase. *Am J Physiol.* 1998; 275: H416-H421
- ❖ Gunnett CA., Heistad DD., Faraci FM. Gene-targeted mice reveal a critical role for inducible nitric oxide synthase in vascular dysfunction during diabetes. *Stroke* 2003; 34: 2970-2974
- ❖ Guo X, Razandi M, Pedram A, Kassab G, Levin ER. Estrogen induces vascular wall dilation: mediation through kinase signaling to nitric oxide and estrogen receptors alpha and beta. *J Biol Chem* 2005;280:19704-10
- ❖ Guzik T.J., Korbout T., Adamek-Guzik T. Nitric oxide and superoxide in inflammation and immune regulation. *Physiol Pharmacol* 2003; 54: 469-487.
- ❖ Guzik T.J., West N., Pillai R. et al. Nitric oxide modulates superoxide release and peroxynitrite formation in human blood vessels. *Hypertension* 2002; 39: 1088-1094.
- ❖ Hamon M., Vallet B., Bauters C. et al. Long-term oral administration of L-arginine reduces intimal thickening and enhances neoendothelium-dependent acetylcholine-induced relaxation after arterial injury. *Circulation* 1994; 90: 1357-1362.
- ❖ Harrington WR, Sheng S, Barnett DH, Petz LN, Katzenellenbogen JA, Katzenellenbogen BS. Activities of estrogen receptor alpha- and beta-selective ligands at diverse estrogen responsive gene sites mediating transactivation or transrepression. *Mol Cell Endocrinol.* 2003;206(1-2):13-22.
- ❖ Harrington WR., Sheng S., Barnett DH., et al. Activities of estrogen receptor alpha- and beta-selective ligands at diverse estrogen responsive gene sites mediating transactivation or transrepression. *Mol Cell Endocrinol.* 2003;206:13-22.
- ❖ Harris HA, Katzenellenbogen JA, Katzenellenbogen BS. *Endocrinology* 2002; 143:4172-4177.
- ❖ Hayashi T., Fukuto J.M., Ignarro L.J et al. Basal release of nitric oxide from aortic rings is greater in female rabbits than in male rabbits: implications for atherosclerosis. *Proc Natl Acad Sci USA* 1992; 89: 11259-11263.
- ❖ Hayashi T., Ishikawa t., Yamada K., et al. Biphasic effect of estrogen on neuronal constitutive nitric oxide synthase via Ca²⁺-calmodulin dependent mechanism *Biochem Biophys Res Commun* 1994; 203: 1013-1019
- ❖ Hebden R.A., Gardiner S., Bennett T., et al. The influence of streptozotocin-induced diabetes mellitus on fluid and electrolyte handling in rats. *Clin Sci* 1986; 70: 111-117.
- ❖ Heyliger C.E. Pierce G.N., Singal P.K. et al. Cardiac alpha- and beta-adrenergic receptor alterations in diabetic cardiomyopathy. *Basic Res Cardiol* 1982; 77: 610-618.

- ❖ Hirata K., Kuroda R., Sakoda T. et al. Inhibition of endothelial nitric oxide synthase activity by protein kinase C. *Hypertension* 1995; 25: 180-185.
- ❖ Hodgins JB., Kregge JK., Redick RL. et al. Estrogen receptor α is a major mediator of 17β -estradiol's atheroprotective effects on lesion size in Apo E^{-/-} mice. *J Clin Invest* 2001; 107:333-340
- ❖ Hopfner RL., Gopalakrishnan V. Endothelin: emerging role in diabetic vascular complications. *Diabetologia* 1999; 42:1383-1394
- ❖ Ignar-Trowbridge DM., Pimentel M., Parker MG. et al. Peptide growth factor cross-talk with estrogen receptor requires the A/B domain and occurs independently of protein kinase C or estradiol. *Endocrinology* 1996; 137: 1735-1744
- ❖ Inoguchi T., Battan R., Handler E. et al. Preferential elevation of protein kinase C isoform beta II and diacylglycerol levels in aorta and heart of diabetic rats: Differential reversibility to glycemic control by islet transplantation. *Proc Natl Acad Sci USA* 1992; 89: 11059- 11063.
- ❖ Inoguchi T., Li P., Umeda F. et al. High glucose level and free fatty acid stimulate reactive oxygen species production through protein kinase C-dependent activation of NAD(P)H oxidase in cultured vascular cells. *Diabetes* 2000; 49: 1939-1945
- ❖ Ischiropoulos H., al-Melhdi A.B. Peroxynitrite-mediated oxidative protein modification. *FEBS Lett* 1995; 364: 279-282.
- ❖ Junod A., Lambert A.E., Orci L. et al. Studies of the diabetogenic action of streptozotocin. *Pro Soc Exp Biol Med* 1967; 126: 201-205.
- ❖ Kanaya AM., Herrington D., Vittinghoff E. et al. Heart and Estrogen/progestin Replacement Study. Glycemic effects of postmenopausal hormone therapy: the Heart and Estrogen/progestin Replacement Study – a randomized, double-blind, placebo-controlled trial. *Ann Intern Med.* 2003;138:1-9.
- ❖ Kannel WB., Wilson PW. Risk factor that attenuate the female coronary disease advantage. *Arch Intern Med* 1995; 155:57-61
- ❖ Kansaki T., Shinomiya M., Ueda S. et al. Enhanced arterial intimal thickening after balloon catheter injury in diabetic animals accompanied by PDGF β -receptor overexpression of aortic media. *Eur J Clin Inv* 1994 ;24 :377-381.
- ❖ Kato S., Endoh H., Masuhiro Y. et al. Activation of the estrogen receptor through phosphorylation by mitogen-activated protein kinase. *Science* 1995; 270: 1491-1494
- ❖ Kelly MJ., Levin ER. Rapid action of plasma membrane estrogen receptor. *Trends Endocrinol Metab* 2001; 12: 152-156

- ❖ Kelly MJ., Qiu J. and Ronnekleiv OK. Estrogen modulation of G-protein-coupled receptor activation of potassium channels in the central nervous system. *Ann NY Acad Sci* 2003; 1007: 6-16
- ❖ Kibbe M., Billiar T., Tzeng E. Inducible nitric oxide synthase and vascular injury. *Cardiovasc Res* 1999; 43: 650-657.
- ❖ Kleinert H., Euchenhofer C., Ihrig-Biedert I. et al. Glucocorticoids inhibit the induction of NO synthase II (iNOS) by downregulating cytokine-induced activity of transcription factor NF- κ B. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch Pharmacol* [suppl] 1995; 351: R76.
- ❖ Korte T., Fuchs M., Arkudas A., et al. Female mice lacking estrogen receptor β display prolonged ventricular repolarization and reduced ventricular automaticity after myocardial infarction. *Circulation*. 2005;111:2282-90.
- ❖ Krasinski K., Spyridopoulos I., Asahara T et al. Estradiol accelerates functional endothelial recovery after arterial injury. *Circulation* 1997; 95: 1768-1772
- ❖ Krolewski A.S., Warram J.H., Valsania P. et al. Evolving natural history of coronary artery disease in diabetes mellitus. *Am J Med* 90 (Suppl 2A) 1991; 56S-61S.
- ❖ Kunz D., Mühl H., Walker G. et al. Two distinct signalling pathways trigger the expression of inducible nitric oxide synthase in rat renal mesangial cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 1994; 91: 5387-5391.
- ❖ Kushner P., Agard DA., Greene GL. Et al Estrogen receptor pathways to AP1. *J Steroid Biochem Mol Biol* 2000; 74: 311-317
- ❖ Laffitte BA., Chao LC., Li J., et al. Activation of liver X receptor improves glucose tolerance through coordinate regulation of glucose metabolism in liver and adipose tissue. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2003;100:5419-5424.
- ❖ Le May C., Chu K., Hu M. et al. Estrogens protect pancreatic β -cells from apoptosis and prevent insulindeficient diabetes mellitus in mice. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2006;103:9232-9237.
- ❖ Le Mellay V., Grosse B., Lieberherr M., Phospholipase C and membrane action of calcitriol and estradiol *J. Biol Chem* 1997; 272: 11902-11907
- ❖ Lee W.I. et al. Impact of diabetes on coronary artery disease in women and men:a meta analysis of prospective studies. *Diabetes Care* 2000; 23: 962-8.
- ❖ Li H., Föstermann U. Nitric oxide in the pathogenesis of vascular disease. *Pathol* 2000; 190: 244-254
- ❖ Li J., McMurray RW. Effects of estrogen receptor subtype-selective agonists on immune functions in ovariectomized mice. *Int Immunopharmacol* 2006;6:1413-23.

- ❖ Lowry O.H. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem* 1951; 193: 265-275
- ❖ Ma ZQ., Santagati S., Patrone C. et al. Insulin-like growth factors activate estrogen receptor to control the growth and differentiation of the human neuroblastoma cell line SK-ER3. *Mol Endocrinol* 1994; 8:910-918
- ❖ Maggi A., Cignarella A., Brusadelli A. et al. Diabetes undermines estrogen control of inducible nitric oxide synthase function in rat aortic smooth muscle cells through overexpression of estrogen receptor- β . *Circulation* 2003; 108: 211-217.
- ❖ Mandup-Poulsen T. Cytokine-mediated beta-cell destruction: the molecular effector mechanism causing IDDM (Abstract). *J Autoimmun* 1990; 3: 77.
- ❖ Margolis KL., Bonds DE., Rodabough RJ., et al. Women's Health Initiative Investigators. Effect of oestrogen plus progestin on the incidence of diabetes in postmenopausal women: results from the Women's Health Initiative Hormone Trial. *Diabetologia* 2004;47:1175-1187.
- ❖ Marletta M.A. Nitric oxide synthase: aspects concerning structure and catalysis. *Cell* 1994; 78: 927-930.
- ❖ Marriott LK., McGann-Gramling KR., Hauss-Wegrzyniak B. et al. Brain infusion of lipopolysaccharide increases uterine growth as a function of estrogen replacement regimen: suppression of uterine estrogen receptor- α by constant, but not pulsed, estrogen replacement. *Endocrinology*. 2007;148:232-240.
- ❖ McDonnell D.P., Norris J.D. Connections and regulation of the human estrogen receptor. *Science* 2002; 296: 1642-1644.
- ❖ Mendelsohn M.E., Karas R.H. The protective effects of estrogen on the cardiovascular system. *N Engl J Med* 1999;340:1801-1811.
- ❖ Mendelsohn ME, Karas RH. Molecular and cellular basis of cardiovascular gender differences. *Science* 2005; 308:1583-1587.
- ❖ Mendelsohn ME. Genomic and nongenomic effects of estrogen in the vasculature. *Am J Cardiol* 2002; 90:3F-6F.
- ❖ Moncada S., Higgs A. The L-arginine-nitric oxide pathway. *N Engl J Med* 1993; 329: 2002-2012.
- ❖ Mosselman S., Polman J., Dijkema R. ER beta: identification and characterization of a novel human estrogen receptor. *FEBS Lett* 1996; 392:49-53
- ❖ Nadal A., Ropero AB., Laribi O. et al. Nongenomic actions of estrogens xenoestrogens by binding at a plasma membrane receptor unrelated to estrogen receptor alpha and estrogen receptor beta *Proc Natl Acad Sci USA* 2000; 97:11603-11608
- ❖ Nakaki T., Nakayama M., Kato R. Inhibition by nitric oxide and nitric

- oxide-producing vasodilators of DNA synthesis in vascular smooth muscle cells. *Eur J Pharmacol* 1990; 189: 347-353.
- ❖ Nakamura Y, Suzuki T, Miki Y, Tazawa C, Senzaki K, Moriya T, Saito H, Ishibashi T, Takahashi S, Yamada S, Sasano H. Estrogen receptors in atherosclerotic human aorta: inhibition of human vascular smooth muscle cell proliferation by estrogens. *Mol Cell Endocrinol.* 2004;219:17-26
 - ❖ Natan C.F., Hibbs J.B. Role of nitric oxide synthesis in macrophage antimicrobial activity. *Curr Opin Immunol* 1991; 3: 65-70.
 - ❖ National Diabetes Data Group Classification and diagnosis of diabetes mellitus and other categories of glucose intolerance. *Diabetes* 1979; 28: 1039-1057.
 - ❖ Nicosia R.F., Nicoria S.V., Smith M. Vascular endothelial growth factor, platelet-derived growth factor, and insulin-like growth factor-1 promote rat aortic angiogenesis in vitro. *Am J Pathol* 1994; 145: 1023-1029.
 - ❖ Nordmeyer J, Eder S, Mahmoodzadeh S, Martus P, Fielitz J, Bass J, Bethke N, Zurbrugg HR, Pregla R, Hetzer R, Regitz-Zagrosek V. Upregulation of myocardial estrogen receptors in human aortic stenosis. *Circulation* 2004;110:3270-5.
 - ❖ O'Lone R., Knorr K., Jaffe IZ. et al. Estrogen receptors α and β mediate distinct pathways of vascular gene expression, including genes involved in mitochondrial electron transport and generation of reactive oxygen species. *Mol Endocrinol.* 2007;21:1281-1296.
 - ❖ Oparil S., Levine R.L., Chen S.J. et al. Sexually dimorphic response of the balloon-injured rat carotid artery to hormone treatment. *Circulation* 1997; 95: 1301-1307.
 - ❖ Palmer RMJ., Ferrige AG., Moncada S., Nitric oxide accounts for the biological activity of endothelium-derived relaxing factor. *Nature* 1987; 327: 524-526.
 - ❖ Patrone C., Ma Z., Pollio G. et al. Cross-coupling between insulin and estrogen receptor in human neuroblastoma cells. *Mol Endocrinol* 1996; 10: 499-507
 - ❖ Paul A., Doherty K., Plevin R. Differential regulation by protein kinase C isoforms of nitric oxide synthase induction in RAW 264.7 macrophages and rat aortic smooth muscle cells. *Br J Pharmacol* 1997; 120: 940-946.
 - ❖ Pelzer T., Jazbutyte V., Hu K. et al The estrogen receptor- α agonist 16-LE2 inhibits cardiac hypertrophy and improves hemodynamic function in estrogen-deficient spontaneously hypertensive rats. *Cardiovascular Res* 2005; 67:604-612
 - ❖ Philips A., Chalbos D., Rochefort H., Estradiol increases and anti-estrogens antagonize the growth factor-induced activator protein-1 activity in MCF-7 breast cancer cells without affecting c-

- fos and c-jun synthesis. *J Biol Chem* 1993; 268: 14103-14108
- ❖ Pieper GM. Acute amelioration of diabetic endothelial dysfunction with a derivative of the nitric oxide synthase cofactor, tetrahydrobiopterin. *J Cardiovasc Pharmacol* 1997; 29: 8-15.
 - ❖ Pieper GM., Peltier BA. Amelioration by L-arginine of a dysfunctional arginine/nitric oxide pathway in diabetic endothelium. *J Cardiovasc Pharmacol* 1995; 25: 397-403
 - ❖ Pietras R. and Szego CM. Specific binding sites for estrogen at the outer surfaces of isolated endometrial cells. *Nature* 1977; 265: 69-72
 - ❖ Pinna C., Cignarella A., Zanardo R. et al. Gender differences and antioxidant treatment affect aortic reactivity in short-term diabetic rats. *Eur Pharmacol* 2001; 431: 71-79.
 - ❖ Pradhan A.D., Manson J.E., Rifai N. et al. C-reactive protein, interleukin 6, and risk of developing type 2 diabetes mellitus. *JAMA* 2001; 286: 327-334.
 - ❖ Radomski M.W., Palmer R.M., Moncada S. The anti-aggregating properties of vascular endothelium: interactions between prostacyclin and nitric oxide. *Br J Pharmacol* 1987; 92: 639-646.
 - ❖ Razandi M, Pedram A, Merchenthaler I, Greene GL, Levin ER. Plasma membrane estrogen receptors exist and functions as dimers. *Mol Endocrinol*. 2004;18:2854-65
 - ❖ Revankar CM., Cimino DF., Sklar LA. et al. A transmembrane intracellular estrogen receptor mediates rapid cell signaling. *Science* 2005; 307:1625-1630
 - ❖ Rogatsky I., Trowbridge JM. And Garabedian MJ. Potentiation of human estrogen receptor α transcriptional activation through phosphorylation of serines 104 and 106 by cyclin A-CDK2 complex. *J Biol Chem* 1999; 274: 22296-22302
 - ❖ Ross R. The smooth muscle cell. II. Growth of smooth muscle in culture and formation of elastic fibres. *J Cell Biol* 1971; 50: 172-186.
 - ❖ Rubanyi GM, Freay AD, Kauser K, Sukovich D, Burton G, Lubahn DB, Couse JF, Curtis SW, Korach KS. Vascular estrogen receptors and endothelium-derived nitric oxide production in the mouse aorta – gender difference and effect of estrogen receptor gene disruption. *J Clin Invest* 1997;99:2429-2437.
 - ❖ Sack M.N., Rader D.I., Cannon R.O.III. Oestrogen and inhibition of oxidation of low-density lipoproteins in postmenopausal women. *Lancet* 1994; 343: 269-270.
 - ❖ Schaffer SW., Mozaffari MS., Artman M., Wilson GL. Basis for myocardial mechanical defects associated with non-insulin-dependent diabetes. *Am J Physiol*. 1989;256:E25-30
 - ❖ Schreihof DA., Stoler MH., Shupnik MA. Differential expression and

- regulation of estrogen receptors (ERs) in rat pituitary and cell lines: estrogen decreases ER α protein and estrogen responsiveness. *Endocrinology*. 2000;141:2174-2184.
- ❖ Shanker G., Sorci-Thomas M., Adams M.R. Estrogen modulates the expression of tumor necrosis factor alpha mRNA in phorbol ester-stimulated human monocytic THP-1 cells. *Lymphok Cytok Res* 1994; 13:377-382.
 - ❖ Simoncini T, Genazzani AR, Liao JK. Nongenomic mechanisms of endothelial nitric oxide synthase activation by the selective estrogen receptor modulator raloxifene. *Circulation*. 2002;105:1368-73.
 - ❖ Simoncini T, Hafezi-Moghadam A, Brazil DP, Ley K, Chin WW, Liao JK. Interaction of oestrogen receptor with the regulatory subunit of phosphatidylinositol-3-OH kinase. *Nature* 2000;407:538-41.
 - ❖ Srivastava S., Weitzmann M.N., Cenci S. *et al.* Estrogen decreases TNF gene expression by blocking JNK activity and the resulting production of c-jun and junD. *J Clin Invest* 1999; 104: 503-513.
 - ❖ Stauffer S.R., Coletta C.J., Tedesco R. *et al.* Pyrazole ligands: structure-affinity/activity relationship and estrogen receptor- α -selective agonists. *J Med Chem* 2000; 43: 4934-4947.
 - ❖ Sun J., Huang Y.R., Harrington W.R. *et al.* Antagonists selective for estrogen receptor α . *Endocrinology* 2002; 143: 941-947.
 - ❖ Suzuki A., Mizuno K. InoY. *et al.* Effects of 17 beta-estradiol and progesterone on growth-factor-induced proliferation and migration in human female aortic smooth muscle cells in vitro. *Cardiovasc Res* 1996; 32: 516-523.
 - ❖ Tager H. Abnormal products of the human insulin gene. *Diabetes* 1984; 33: 693-699.
 - ❖ Tamir S., Izrael S., Vaya J. The effect of oxidative stress on ER α and ER β expression. *J Steroid Biochem Mol Biol*, 2002; 81: 327-33.
 - ❖ Tiidus P.M. Radical species in inflammation and overtraining. *Can J Physiol Pharmacol* 1998; 76: 533-538.
 - ❖ Tomlinson K, Gardiner SM, Bennett T. Diabetes mellitus in Brattleboro rats: cardiovascular, fluid, and electrolyte status. *Am J Physiol* 1989; 256: R1279-R1285.
 - ❖ Tomlinson K.C., Gardiner S.M., Hebden RA *et al.* Functional consequences of streptozotocin-induced diabetes mellitus, with particular reference to the cardiovascular system. *Pharmacol Rev* 1992; 44: 103-150
 - ❖ Tsao P.S., Wang B., Buitrago R. *et al.* Nitric oxide regulates monocyte chemotactic protein-1. *Circulation* 1997; 96: 934-940.
 - ❖ Vegeto E, Pollio G, Pellicciari C, Maggi A. Estrogen and progesterone induction of survival of monoblastoid cells

- undergoing TNF- α -induced apoptosis. *FASEB J.* 1999;13:793- 803.
- ❖ Vegeto E., Belcredito S., Eterri S., et al Estrogen receptor- α mediates the antiinflammatory activity of estradiol. *Proc Natl Acad Sci USA* 2003; 100:9614-9619
 - ❖ Wade CB., Robinson S., Shapiro RA., Dorsa DM., Estrogen receptor ER α and ER β exhibit unique pharmacologic properties when coupled to activation of the mitogen-activated protein kinase pathway. *Endocrinology* 2001; 142: 2336-2342
 - ❖ Ward JD. Diabetic neuropathy. *Br Med Bull* 1989; 45:111-126
 - ❖ Watters JJ. Dorsa DM., Transcriptional effects of estrogen on neuronal neurotensin gene expression involve cAMP/protein kinase A-dependent signaling mechanisms *J Neurosci* 1998; 18: 6672-6680
 - ❖ Wellman G.C., Bonev A.D., Nelson M.T. et al. Gender differences in coronary artery diameter involve estrogen, nitric oxide and Ca²⁺ dependent K⁺ channels. *Circ Res* 1996; 79: 1024-1030.
 - ❖ Wilcox JG., Hwang J., Hodis HN. et al. Cardioprotective effects of individual conjugated equine estrogens through their possible modulation of insulin resistance and oxidation of low-density lipoprotein. *Fertil Steril* 1997; 67: 57-62
 - ❖ Zancan V., Santagati S., Bolego C. et al. 17 β -estradiol decreases nitric oxide synthase II synthesis in vascular smooth muscle cells. *Endocrinology* 1999; 140: 2004-2009.
 - ❖ Zhang Y., Lee FY., Barrera G., et al. Activation of the nuclear receptor FXR improves hyperglycemia and hyperlipidemia in diabetic mice. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2006;103:1006-1011.
 - ❖ Zhu Y., Bian Z., Lu P. et al. Abnormal vascular function and hypertension in mice deficient in estrogen receptor β . *Science.* 2002;295:505-508.
 - ❖ Zwijsen RM., Wientjens E., Klompmaker R. et al. CDK-independent activation of estrogen receptor by cyclin D. *Cell* 1997; 88:405-415