



UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI SASSARI

**SCUOLA DI DOTTORATO IN SCIENZE BIOMEDICHE**  
**INDIRIZZO IN FARMACOLOGIA DI GENERE**  
(XXIII Ciclo)

“Le cellule endoteliali del cordone ombelicale hanno un  
destino cellulare che dipende dal sesso del feto”

Coordinatore: Prof. EUSEBIO TOLU

Tutore: Prof.ssa FLAVIA FRANCONI

Tesi di Dottorato di: Dr.ssa ROBERTA ADDIS

ANNO ACCADEMICO 2009-2010

## SOMMARIO

<b>INTRODUZIONE</b>	pag. 3
<b>SCOPO</b>	pag. 17
<b>MATERIALI E METODI</b>	pag. 18
<i>Cellule</i>	pag. 18
<i>Isolamento delle HUVEC</i>	pag. 19
<i>Caratterizzazione cellulare mediante espressione del fattore di Von Willebrand in immunofluorescenza</i>	pag. 19
<i>Proliferazione cellulare</i>	pag. 20
<i>Determinazione dimensione e forma</i>	pag. 21
<i>Determinazione della permeabilità cellulare mediante dosaggio dell'attività della Lattatodeidrogenasi (LDH)</i>	pag. 21
<i>Dosaggio dell'inibitore dell'attivatore del plasminogeno tipo 1 (PAI-1)</i>	pag. 21
<i>Dosaggio dei nitriti totali</i>	pag. 22
<i>Dosaggio di H<sub>2</sub>O<sub>2</sub></i>	pag. 23
<i>Serum Starvation</i>	pag. 23
<i>Lisi cellulare e determinazione proteica</i>	pag. 24
<i>Western Blotting</i>	pag. 24
<i>Controllo positivo dell'autofagia e dell'apoptosi</i>	pag. 25
<i>Analisi densitometrica e statistica</i>	pag. 26
<b>RISULTATI</b>	pag. 27
<i>Differenze e similarità delle cellule endoteliali in condizioni basali</i>	pag. 27
<i>Proliferazione, dimensione e forma</i>	pag. 27

<i>Dosaggio dell' attività dell' LDH</i>	pag. 27
<i>Dosaggio di PAI-1</i>	pag. 29
<i>Dosaggio dei nitriti totali ed espressione di eNOS</i>	pag. 29
<i>Produzione di H<sub>2</sub>O<sub>2</sub></i>	pag. 30
<i>Studio dell'autofagia</i>	pag. 30
<i>Espressione e attività della AKT in condizioni basali</i>	pag. 32
<i>Espressione della protein kinase mTOR in condizioni basali</i>	pag. 32
<i>Digiuno ed autofagia</i>	pag. 33
<i>Espressione di LC3</i>	pag. 34
<i>Espressione ed attività di AKT</i>	pag. 35
<i>Espressione di mTOR</i>	pag. 36
<i>Espressione della Caspase 9</i>	pag. 36
<b>DISCUSSIONE</b>	pag. 38
<b>CONCLUSIONI</b>	pag. 45
<b>RINGRAZIAMENTI</b>	pag. 47
<b>BIBLIOGRAFIA</b>	pag. 48

## INTRODUZIONE

"Essere uomo o essere donna" è importante dal punto di vista della salute poiché i fattori di rischio, la prevalenza e l'incidenza, l'insorgenza, l'espressione clinica, la storia naturale e l'approccio terapeutico ad una determinata patologia, possono variare sensibilmente a seconda del sesso e del genere.

La distinzione che abbiamo appena fatto tra sesso e genere si riallaccia ad una discussione che ha pervaso il mondo scientifico per lunghi anni. Per sesso si intendono le differenze e le somiglianze biologiche, mentre il genere è un concetto più ampio che comprende le differenze indotte dalla cultura e dalla società. Il termine genere, che deriva dal latino *genus, generis*, affine a *gignere* – generare, risponde alla necessità di dare valore a quanto vi è nella cultura in cui viviamo che ci porta ad essere uomini e donne al di là dell'essere maschio o femmina. Originariamente fu introdotto nelle scienze sociali per descrivere come le diverse società e culture interpretassero l'essere maschio e l'essere femmina, pertanto, il genere include gli elementi che caratterizzano essere donna od uomo in una determinata società (Greaves L., O. Hankivsky et al. 1999; Grant K. and P. Ballem 2000; Franconi F. and L. I. Ferro 2010).

In medicina avere un approccio di genere significa considerare le condizioni economiche, di vita, il ruolo sociale, circa la femminilità e la mascolinità, ovviamente senza dimenticare la biologia. Inoltre, bisogna considerare quel fenomeno definito epigenetica, e che potremo tradurre come la possibilità di variare i nostri geni attraverso una rete di informazioni e comunicazioni prodotta dall'esperienza e dalla cultura e dalle molecole che incontriamo nel corso della nostra vita. Molecole che non sono solo farmaci, rimedi botanici, supplementi alimentari, ma anche cibi e bevande, basta pensare all'alcol ed agli inquinanti ambientali (fumo da tabacco), metalli (Gesensway D. 2001). Dobbiamo ricordare che fino ad ora non solo c'è stata una sottovalutazione del ruolo della cultura nella salute, ma c'è stato anche un grave errore metodologico. Infatti la ricerca

preclinica e clinica, a meno che non si trattasse di fenomeni genere-specifici, è stata fatta prevalentemente su soggetti di genere maschile. I risultati si sono poi traslati alle donne, riconoscendo una specificità al genere femminile solo nel settore riproduzione. Ciò non meraviglia, perché da Ippocrate fino agli anni novanta del secolo scorso, le donne sono state considerate, dalla maggior parte dei ricercatori e degli operatori sanitari, dei “piccoli uomini” (Piras P. and F. Franconi 2009). Conseguentemente, il corpo maschile è stato considerato la norma, venendosi a creare una sorta di cecità rispetto al genere (*gender blindness*). La cecità di genere viene consolidata nelle convenzioni sociali e linguistiche, dove si usa un linguaggio neutrale tramite termini “a-sessuati”, come il medico, il paziente, negando l’importanza del sesso e del genere (Franconi F. and L. I. Ferro 2010).

Il pregiudizio di genere è sostenuto anche dal fatto che, ancora oggi, i libri di testo trascurano le problematiche relative al determinante genere (Dijkstra A. F., P. Verdonk et al. 2008). E’ evidente dalle suddette osservazioni, che il pregiudizio di genere si estende in vari campi ed a vari livelli, che impattano l’uno su l’altro potenziandosi a vicenda.

Questo stato di cose ha portato nella ricerca e nella cura a differenze non giustificabili, che contraddicono le basi della medicina e che non sono d’accordo con uno degli obiettivi del 3° millennio, la cura personalizzata, che necessariamente deve anche essere tenuta in conto prima di arrivare all’obiettivo delle categorie dei pazienti.

La precedente situazione ha generato maggiori effetti negativi per la salute della donna, tuttavia in alcuni casi il pregiudizio di genere ha, invece, riguardato gli uomini. Infatti, patologie ritenute classicamente femminili (depressione o emicrania) sono state studiate in maniera meno appropriata negli uomini (Risberg G., E. Johansson et al. 2009). In definitiva, non è stata offerta la migliore cura possibile ad entrambi i generi, e ciò, ha anche impedito il raggiungimento dell’equità nella cura.

Le differenze di genere sono state prese in esame solo negli ultimi venti anni. Infatti era solo il 1991, quando la cardiologa americana Bernardine Healy, che fra l'altro è stata anche a capo del National Institute of Health (NIH), denunciò, sul prestigioso *New England Journal of Medicine*, il comportamento discriminante dei cardiologi nei confronti delle donne parlando della sindrome di *Yentl*. *Yentl* era il nome che Isaac Bashevis Singer dava ad una ragazza ebraica che per studiare le sacre scritture ebraiche (Torah) fu costretta a travestirsi da maschio per poter soddisfare il suo desiderio (Healy B. 1991).

Molte differenze di genere sono state individuate in questi ultimi anni, ed ormai è sempre più evidente che il cuore, i vasi, il cervello, il fegato, il polmone, il rene, necessitano di essere declinati sia al femminile sia al maschile. Quindi, le diversità devono essere integrate nei processi e nelle politiche di cura e di tutela della salute, poiché la scarsa conoscenza e la scarsa considerazione delle differenze biologiche e sociali hanno prodotto il cosiddetto "*paradosso donna*": le donne vivono più a lungo degli uomini, ma si ammalano di più ed hanno un maggior numero di anni di vita in cattiva salute.

Le malattie cardiovascolari rappresentano la principale causa di morte negli uomini e nelle donne dei paesi più industrializzati. Negli ultimi anni è divenuto evidente che esistono differenze nell'incidenza delle malattie cardiovascolari tra i due sessi. Infatti mentre negli uomini gli eventi cardiovascolari iniziano a manifestarsi già dalla quarta decade di vita nelle donne tale incidenza è bassa prima della menopausa ma aumenta dopo i 60 anni (Peterson S., V. Peto et al. 2005; Regitz-Zagrosek V. 2006). Dopo i 50 anni le malattie cardiovascolari e cerebrovascolari rappresentano la causa principale di mortalità e disabilità nelle donne e la loro incidenza è maggiore di tutte le altre cause di morte messe insieme (Assmann G and H. Schulte 1992; Jonsdottir L.S., N. Sigfusson et al. 2002; Rosano G.M.C. 2010).

Nella donna lo stato di deficit ormonale che si manifesta dopo la menopausa influenza notevolmente i fattori di rischio cardiovascolari e la loro penetranza. Infatti se si considerano coorti di pazienti con ipercolesterolemia familiare si può

notare che mentre negli uomini gli eventi cardiovascolari iniziano a manifestarsi sin dalla metà della terza decade di vita nelle donne sono infrequenti prima dei 40-50 anni supportando la importanza della protezione degli ormoni sessuali sull'effetto aterogenetico dell'assetto lipidico (Pérez-López F.R., L. Larrad-Mur et al. 2010; Rosano G.M.C. 2010). Pertanto nel considerare le strategie di prevenzione cardiovascolare è necessario non soltanto differenziare i due sessi ma anche considerare lo stato di deficienza ormonale (Pérez-López F.R., L. Larrad-Mur et al. 2010; Rosano G.M.C. 2010).

Inoltre nelle strategie preventive cardiovascolari è necessario considerare l'associazione dei fattori di rischio metabolici quali sovrappeso, alterazione del metabolismo glucidico ed ipertensione arteriosa che sono di particolare importanza nelle donne dopo la menopausa (Ferrannini E., A. Natali et al. 1997; Harris M.M., J. Stevens et al. 2000; Vasan R.S., M.G. Larson et al. 2001). L'associazione tra ipertensione e fattori di rischio metabolici è stata considerata da molti solamente nella prospettiva della loro associazione nel determinare un aumento del rischio cardiovascolare, e solo più recentemente è divenuto chiaro che l'ipertensione e i fattori di rischio metabolici sono correlati tra loro influenzandosi l'un l'altro ed avendo cause comuni (Reaven G. M. 1993; Reaven G. 1999; Rosano G.M.C. 2010).

Gli eventi cellulari alla base di patologie del sistema cardiovascolare, quali ipertensione e aterosclerosi, vedono il coinvolgimento di diversi tipi cellulari, fra cui le cellule muscolari lisce vasali VSMC, le LDL e le cellule endoteliali vasali (Libby P., M. Aikawa et al. 2006; Versari D., E. Daghini et al. 2009; Ribeiro F., A.J. Alves et al. 2009).

L'endotelio fornisce un rivestimento cellulare per tutti i vasi sanguigni nel sistema circolatorio, e forma una barriera tra lo spazio vascolare e i tessuti. Questo strato cellulare non viene più visto come una struttura inerte, ma è stato riconosciuto per essere un organo dinamico, importante in diverse funzioni di omeostasi sia in condizioni di salute che durante diverse malattie, fondamentale per la struttura e la regolazione del tono vascolare (Augustin H.G., D. H. Kozian et al. 1994; Limaye

V. and Vadas 2007; Versari D., E. Daghini et al. 2009). Infatti, le cellule endoteliali sono in grado di sintetizzare e secernere un ampio spettro di sostanze anti-aterosclerotiche, tra cui la più caratterizzata è l'ossido nitrico (NO), un gas che è generato dal metabolismo della L-arginina dalla NO sintetasi endoteliale (eNOS), costitutivamente espressa nelle cellule endoteliali (Luscher T.F. and P.M. Vanhoutte 1990; Taddei S., L. Ghiadoni et al. 2003; Versari D., E. Daghini et al. 2009).

In condizioni fisiologiche, la stimolazione endoteliale induce la produzione e il rilascio di NO, che diffonde alle cellule e ai tessuti circostanti ed esercita il suo ruolo protettivo cardiovascolare attraverso il rilassamento delle cellule muscolari lisce, impedendo l'adesione dei leucociti e la loro migrazione nella parete arteriosa, proliferazione delle cellule muscolari, adesione e l'aggregazione piastrinica e l'espressione di molecole di adesione (Luscher T.F. and P.M. Vanhoutte 1990; Kim K.M., S. B. Chun et al. 2001; Taddei S., L. Ghiadoni et al. 2003; Versari D., E. Daghini et al. 2009). In condizioni di malattia, compresa la presenza di fattori di rischio cardiovascolare, l'endotelio subisce alterazioni funzionali e strutturali, perdendo così il suo ruolo protettivo e divenendo una struttura pro-aterosclerotica (Luscher T.F. and P.M. Vanhoutte 1990; Taddei S., L. Ghiadoni et al. 2003; Versari D., E. Daghini et al. 2009). Nelle prime fasi, la principale modifica endoteliale è solo funzionale ed è solitamente indicata come "disfunzione endoteliale". La caratteristica fondamentale di questa condizione è la ridotta biodisponibilità di NO. Questo può essere la conseguenza di una ridotta produzione di eNOS o, più frequentemente, di un aumento d'inibizione attraverso le specie reattive dell'ossigeno (ROS) (Luscher T.F. and P.M. Vanhoutte 1990; Taddei S., L. Ghiadoni et al. 2003; Versari D., E. Daghini et al. 2009).

La ridotta espressione di eNOS può dipendere dagli effetti esercitati dagli estrogeni su questo enzima attraverso la diversa espressione dei propri recettori (Walter P., S. Green et al. 1985; Geary G. G., A. M. McNeill et al. 2001; Duckles S. and V. Miller 2010). Esistono due tipi di recettori degli estrogeni (ER): ER $\alpha$  il primo recettore ad essere clonato (Walter P., S. Green et al. 1985) e ER $\beta$  che è

stato scoperto nel 1996 (Kuiper G. G., E. Enmark et al. 1996; Mosselman S., J. Polman et al. 1996; Tremblay G.B., A. Tremblay et al. 1997). Attualmente sono state identificate distinte vie molecolari con cui gli estrogeni ed i ER possono disciplinare i processi biologici (Hall J. M., J.F. Couse et al. 2001; Heldring N., A. Pike et al. 2007). La via classica (diretta) include l'attivazione del ligando e il legame diretto del DNA agli elementi di risposta degli estrogeni (ERE) prima della modulazione della regolazione dei geni (Kushner Peter J., D.A. Agard et al. 2000); una seconda via include le interazioni proteina-proteina con altri fattori di trascrizione dopo l'attivazione del ligando e perciò la regolazione genica è influenzata da un legame indiretto al DNA (Paech K., P. Webb et al. 1997); una terza via, anche se non ben caratterizzata, spesso definita via non genomica, con rapidi effetti, è stata osservata in numerosi tessuti. Il ligando attiva un recettore possibilmente associato alla membrana anche se non è ben chiaro se sia il classico recettore ER (Levin E. R. 2001; Deecher D., P. Swiggard et al. 2003; Razandi M., A. Pedram et al. 2004), una sua isoforma (Li L., M. P. Haynes et al. 2003; Wang Z., X. Zhang et al. 2005) o un recettore diverso (Doolan C: M. and B. J. Harvey 2003). Dopo questo evento iniziale si attiva la cascata del segnale attraverso secondi messaggeri che possono aumentare i livelli di NO nel citoplasma che porterebbe, in definitiva, ad una risposta fisiologica rapida senza il coinvolgimento genico della regolazione. Ed infine, la via del ligando indipendente, che include l'attivazione attraverso altre vie segnale, come ad esempio la via mediata dai fattori di crescita. In questo caso protein chinasi attive, fosforilano i ER i quali dimerizzano, si legano al DNA regolando i geni (Heldring N., A. Pike et al. 2007).

Gli estrogeni esercitano divergenti azioni sulle cellule vascolari. Ad esempio uno studio condotto da Kawagoe e colleghi (Kawagoe J., M. Ohmichi et al. 2007) basandosi su dati già presenti in letteratura (Morales D. E., K. A. McGowan et al. 1995; Kolodgie F.D., A. Jacob et al. 1996; Bhalla R. C., K. F. Toth et al. 1997; Krasinski K., I. Spyridopoulos et al. 1997; Nakamura Y., T. Suzuki et al. 2004) mostra un aumento, mediato dagli estrogeni, della crescita delle cellule endoteliali

mentre si ha una inibizione della crescita delle cellule muscolari lisce, risultando in un'azione vasoprotettiva. Altri studi sottolineano la diversa espressione dei ER con varie risposte nei vari tipi cellulari, ad esempio Toth e colleghi (Toth B., G. Saadat et al. 2008) affermano che le cellule endoteliali estratte da vena di cordone ombelicale umano (HUVEC) esprimono ER $\beta$  ma non ER $\alpha$  espresso invece in altri tipi cellulari come le VSMC (Malorni W., E. Straface et al. 2008), e che quindi le risposte fisiologiche agli estrogeni potrebbero essere diverse in base al tipo di recettore espresso.

I ROS sono un gruppo di molecole prodotte nelle cellule quando l'ossigeno viene metabolizzato. Tradizionalmente considerati molecole distruttive determinanti la morte cellulare attraverso, ad esempio, il danneggiamento del DNA o dei lipidi, recentemente hanno anche dimostrato di contribuire alla proliferazione delle cellule, alla migrazione e alla sopravvivenza (Rhee S.G. 2006). Questo gruppo è composto da diversi membri, tra cui l'anione superossido ( $O_2^-$ ), ossido di azoto (NO), perossido di idrogeno ( $H_2O_2$ ), e l'anione idrossile ( $OH^-$ ). Sono prodotti da una serie di enzimi, tra cui nicotinammide adenina dinucleotide fosfato (NADPH) ossidasi (NOx), e xantina ossidasi (Regier D. S., D. G. Greene et al. 2000), lipoossigenasi (Kuhn H. and B. J. Thiele 1999; Silverman E. S. and J. M. Drazen 1999) e mieloperossidasi (Klebanoff S. J. 2005; Malle E., P. G. Furtmüller et al. 2007). In particolare l' $H_2O_2$ , si forma sia come prodotto finale di degenerazione di  $O_2^-$ , ad opera di una famiglia di enzimi cellulari chiamato superossido dismutasi (SOD), o dalla sua rottura spontanea (Paravicini T. M. and R. M. Touyz 2006; Genestra M. 2007; Malorni W., I. Campesi et al. 2007; Groeger G., C. Quiney et al. 2009). La produzione dei ROS è controbilanciata da enzimi antiossidanti come la SOD, la catalasi, la glutatione perossidasi, le tioredoxine e le perossiredoxine ed è tamponata da molecole antiossidanti come il glutatione ridotto (GSH) (Papaharalambus C. A. and K. K. Griendling 2007).

Come già accennato, a basse concentrazioni, i ROS hanno un ruolo fisiologico nella parete vasale e la loro produzione e rimozione è finemente controllata dai sistemi antiossidanti. In queste condizioni si comportano come importanti

molecole segnale coinvolte in diversi aspetti della funzione vascolare come, ad esempio, la proliferazione ed il tono delle VSMC e dell'endotelio e quindi il fisiologico rimodellamento vasale (Fortemaison N., F. Miot et al. 2005; Groeger G., C. Quiney et al. 2009). Tuttavia, quando i livelli superano i valori fisiologici e le difese antiossidanti sono insufficienti, i ROS provocano stress ossidativo. Alti livelli di  $O_2^-$ , il conseguente accumulo di  $H_2O_2$  e la diminuzione della biodisponibilità di NO, a causa dell'avidità reazione di  $O_2^-$  con quest'ultimo per formare il perossinitrito, giocano un ruolo chiave nel rimodellamento vascolare e, più in generale, nelle modificazioni funzionali e strutturali che avvengono nella parete vasale nel corso dell'inizio e della progressione di diverse malattie vascolari, incluse ipertensione e aterosclerosi (Fortuno A., G. San Jose et al. 2005; Miller A. A., T. M. De Silva et al. 2007). Inoltre, il perossinitrito è un forte ossidante che attacca proteine, lipidi e acidi nucleici, causando danno cellulare (Fortuno A., G. San Jose et al. 2005). Elevati livelli di ROS hanno effetti deleteri nella parete vascolare, quali la promozione dell'apoptosi delle cellule endoteliali e delle VSMC (Malorni W., I. Campesi et al. 2007; Malorni W., E. Straface et al. 2008), dell'espressione di molecole di adesione infiammatorie e dell'ipertrofia e iperplasia delle VSMC (Miller A. A., T. M. De Silva et al. 2007). Alte concentrazioni di  $H_2O_2$  sono proapoptotiche, mentre basse concentrazioni stimolano la crescita e la differenziazione (Touyz R. M. and E. L. Schiffrin 2004). I ROS, inoltre, modulano la struttura vascolare attraverso l'aumento della deposizione delle proteine della matrice extracellulare, come il collagene e la fibronectina.  $O_2^-$  e  $H_2O_2$  influenzano l'attività delle metalloproteinasi 2 e 9 (MMP2 e MMP9) vascolari, che promuovono la degradazione della membrana basale e dell'elastina, rispettivamente. Anche il tono vasomotore potrebbe essere modulato attraverso l'effetto diretto dei ROS: questi sembrano infatti controllare la contrazione ed il rilasciamento a seconda del letto vascolare e del tipo di specie generate (Touyz R. M. and E. L. Schiffrin 2004).

L'endotelio svolge anche importanti funzioni anticoagulanti mediante un'importante azione fibrinolitica. Quest'attività è svolta attraverso attivatori e

inibitori, con lo scopo di produrre plasmina che a sua volta degrada la fibrina a prodotti solubili. Le cellule endoteliali sintetizzano e rilasciano l'attivatore tissutale del plasminogeno (t-PA) una serin proteasi che converte il plasminogeno in plasmina. Inoltre sintetizzano e rilasciano anche un inibitore dell'attivatore del plasminogeno (PAI-1) il più potente inibitore naturale di t-PA, realizzando un delicato equilibrio tra produzione di t-PA e PAI (Calò L. and A. Semplicini 1998). Come ben descritto in letteratura i livelli di PAI-1 rivestono particolare importanza nell'insorgenza e decorso di alcune malattie cardiovascolari (Bailey Merz C. N., L. J. Shaw et al. 2006; Gramling M. W. and F. C. Church 2010) infatti un aumento di PAI-1 porterebbe a un aumentato rischio di trombosi. Inoltre numerosi studi rilevano l'esistenza di espressione diversa di PAI-1 legata al genere con maggiori livelli negli uomini rispetto alle donne (Asselbergs F.W., S.M. Williams et al. 2006; Asselbergs F. W., S. M. Williams et al. 2007; Schoenhard J., F. Asselbergs et al. 2008).

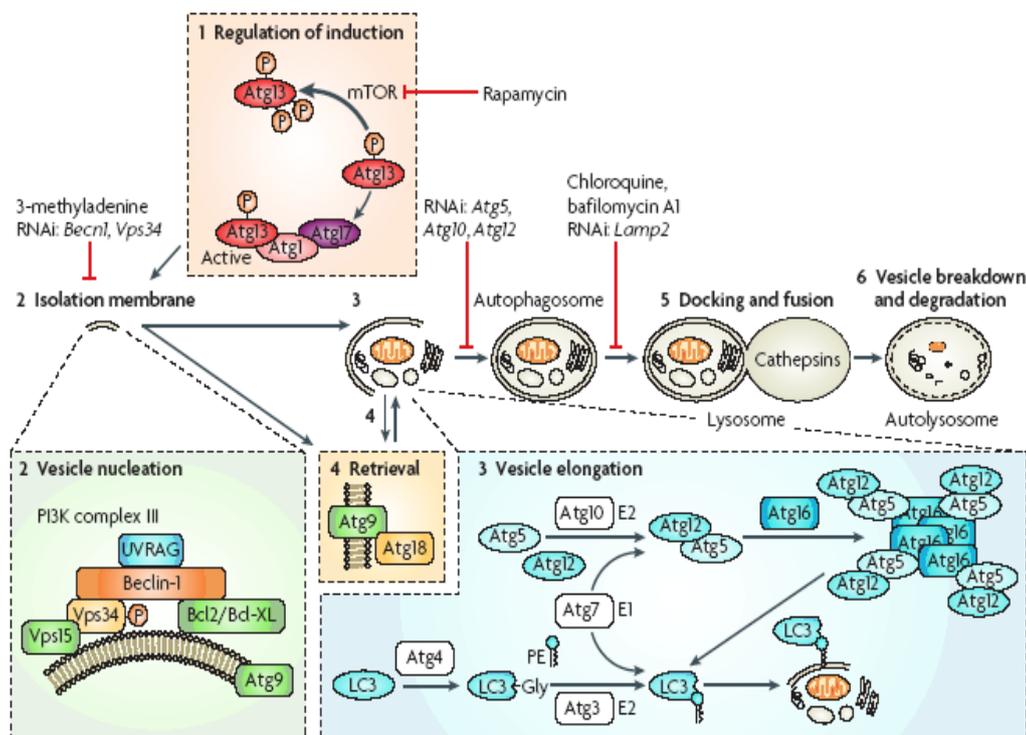
Dato il loro coinvolgimento critico nello sviluppo delle malattie cardiovascolari, il presente studio è stato condotto su colture primarie di cellule endoteliali vascolari umane estratte da cordoni ombelicali di neonati maschi e femmine con lo scopo di investigare, in funzione del sesso/genere, il destino e la sopravvivenza cellulare in ambienti non favorevoli, quale quello indotto da digiuno (starvation). Infatti la starvation induce una serie di risposte difensive da parte della cellula per potenziare la capacità di sopravvivenza.

I meccanismi molecolari che intervengono durante la starvation includono la riduzione del danno ossidativo, la riduzione dell'apoptosi e l'aumento dell'autofagia (Du L., R. W. Hickey et al. 2009). La relazione funzionale fra l'apoptosi e l'autofagia è complessa e quest'ultima può contribuire alla morte della cellula oppure, al contrario, costituire una difesa contro lo stress acuto, come nel caso del digiuno (Galluzzi L., M. C. Maiuri et al. 2007).

Mentre l'apoptosi comporta la demolizione rapida di tutte le strutture e gli organelli cellulari, l'autofagia, recentemente considerata come utile strategia per la sopravvivenza, è un fenomeno lento e spazialmente circoscritto, in cui parti di

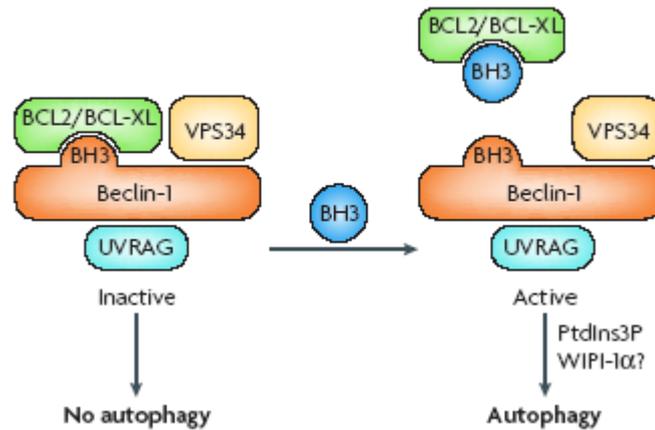
citoplasma sono sequestrate all'interno di vacuoli e successivamente digerite dalle idrolasi lisosomiali (Mizushima N., B. Levine et al. 2008). Funziona anche da meccanismo di turnover per eliminare organelli danneggiati, patogeni intracellulari e porzioni superflue di citoplasma (Galluzzi L, Vicencio JM et al. 2008; Tinari A., A. M. Giammarioli et al. 2008; Vicencio J. M., L. Galluzzi et al. 2008).

I dettagli molecolari di questo processo sono stati meglio caratterizzati nel lievito *Saccharomyces cerevisiae*, in proteine prodotte da un gruppo di geni noti come geni autofagici (*atg*), i quali sono evolutivamente conservati dai lieviti all'uomo, e regolano l'autofagia (Klionsky and Emr 1990; Klionsky D. J., A. J. Meijer et al. 2005; He C., H. Song et al. 2006; Maiuri M. C., E. Zalckvar et al. 2007; Mizushima N. 2007).



**Fig.1** Vari step che intervengono nell'autofagia (Maiuri MC, et al., 2007).

Per meglio comprendere il processo autofagico, lo analizzeremo attraverso 5 stadi differenti che vanno dalla regolazione dell'induzione alla formazione dell'autolisosoma, passando per il sequestro di membrana, la nucleazione e l'allungamento della vescicola. Nel primo step si assiste a una fine regolazione ad opera della protein chinase mTOR, di cui discuteremo in seguito, sulla fosforilazione della proteina autofagica Atg13. Infatti un'inibizione di mTOR porta alla defosforilazione di Atg13 la quale si associa al complesso Atg1-Atg17 permettendo così l'attivazione della funzione catalitica di Atg1 che induce l'autofagia. Nel secondo step, in cui si ha il sequestro di membrana e la nucleazione vescicolare, gioca un ruolo attivo la Vsp34, una PI3K di classe III, per generare una PI3-fosfato. L'attivazione di Vsp34 dipende dalla formazione di un complesso multiproteico in cui sono coinvolte la beclina, omologo umano di Atg6, il gene soppressore tumorale associato all'irradiazione di UV (UVRAG) e Vps15, una chinase miristilata. La beclina è stata originariamente identificata come partner d'interazione con Bcl-2, una proteina anti-apoptotica (Liang X. H., L. K. Kleeman et al. 1998). L'interazione beclina-Bcl-2 è mediata dal dominio BH3 nella beclina (Maiuri M. C., E. Zalckvar et al. 2007; Oberstein A., P. D. Jeffrey et al. 2007), e tale interazione diminuisce drasticamente in condizioni di digiuno permettendo alla beclina di partecipare alla formazione del complesso multiproteico (Patingre S., A. Tassa et al. 2005; Maiuri M. C., E. Zalckvar et al. 2007). La dissociazione fra la beclina e Bcl-2, indotta da digiuno, potrebbe essere una via in cui la mancanza di nutrienti induca l'autofagia (Patingre S., A. Tassa et al. 2005; Criollo A., J. M. Vicencio et al. 2007) quindi identificando Bcl-2 non solo come proteina anti-apoptotica ma anche anti-autofagica. Infatti altri studi riportano che Bcl-2 sopprime l'autofagia attraverso l'inibizione dell'aumento del calcio citosolico essendo quest'ultimo un induttore di autofagia (Høyer-Hansen M., L. Bastholm et al. 2007).



**Fig.2** Interazione beclina-Bcl-2 mediata dal dominio BH3 nella beclina (Maiuri MC, et al., 2007).

Nel terzo step, in cui si ha il processo dell'allungamento vescicolare, vengono coinvolti due sistemi di coniugazione di tipo ubiquitino. Una via coinvolge la coniugazione covalente di Atg12 con Atg5, con l'aiuto dell'enzima Atg7 o dell'enzima Atg10. La seconda via coinvolge la coniugazione di fosfatidiletanolamina (PE), glicerofosfolipide presente nella membrana plasmatica, a LC3, omologo umano di Atg8, attraverso l'azione sequenziale di Atg4, dell'enzima Atg3 e Atg7 (Klionsky D. J., A. J. Meijer et al. 2005). La coniugazione lipidica porta alla conversione della forma solubile di LC3, detta LC3I, presente nel citosol, alla forma associata alla vescicola autofagica detta LC3II (Kabeya Y., N. Mizushima et al. 2000; Kabeya Y., N. Mizushima et al. 2004). La composizione delle membrane interna ed esterna dell'autofagosoma sembra essere decisamente diversa. Nei mammiferi LC3 è attualmente la sola proteina identificata a livello della membrana interna dell'autofagosoma (Kabeya Y., N. Mizushima et al. 2000). Dopo la coniugazione, sia Atg5-Atg12 che LC3-II diventano componenti strutturali delle cisterne a doppio membrane o autofagosomi e sono così ridistribuiti tra le frazioni di membrana. Pertanto, i livelli di proteine Atg5-Atg12 e/o LC3-II coniugati nelle frazioni di membrana

sono spesso usati come misura per determinare l'attività autofagica (Kabeya Y., N. Mizushima et al. 2004).

Attraverso gli step 4 e 5, gli autofagosomi vanno incontro a maturazione, mediante la fusione con i lisosomi per formare gli autolisosomi. In questi ultimi, la membrana interna, così come il contenuto luminale dei vacuoli autofagici è degradato dagli enzimi lisosomiali (Klionsky D. J., A. J. Meijer et al. 2005; Maiuri M. C., E. Zalckvar et al. 2007; Mizushima N. 2007).

Come già accennato questo raffinato sistema è finemente regolato dall'attivazione e inibizione di numerose protein-chinasi fra cui AKT e mTOR. AKT è espressa, nelle cellule di mammifero, in tre diverse isoforme definite AKT1, AKT2 e AKT3 conosciute anche come PKB  $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$  codificate da diversi geni (*Akt1*, *Akt2*, *Akt3*) che codificano per enzimi membri della famiglia delle serine-treonine chinasi .

L'AKT1 è coinvolta nelle vie di sopravvivenza cellulare e crescita generale dei tessuti attraverso l'inibizione dei processi apoptotici, attivazione della sintesi proteica: svolge un ruolo chiave nella via cellulare che porta all'ipertrofia nei muscoli scheletrici (Yang Z. Z., O. Tschopp et al. 2003; Hanada M., J. Feng et al. 2004).

L'AKT2 è una molecola-segnale nella via di rilascio dell'insulina: è implicata nell'induzione del trasporto del glucosio (Cheng J. Q., A. K. Godwin et al. 1992; Garofalo R. S., S. J. Orena et al. 2003) mentre il ruolo dell'AKT3 è meno chiaro, ma sembra essere maggiormente espresso nel cervello (Brodbeck D., P. Cron et al. 1999; Yang Z. Z., O. Tschopp et al. 2003).

mTOR è una serina-treonina chinase che regola l'accrescimento cellulare e il metabolismo in risposta agli stimoli ambientali (Shaw R. J. and L. C. Cantley 2006). Forma due complessi chiamati TORC1 e TORC2. TORC1 e TORC2 presentano distinte funzioni cellulari, ma entrambi sono essenziali per la vitalità cellulare (Helliwell S. B., I. Howald et al. 1998; Loewith R., E. Jacinto et al. 2002). TORC1, quando attivato da disponibilità di nutrienti (in particolare amminoacidi), coordina la sintesi proteica e la degradazione per promuovere la crescita quando i nutrienti sono abbondanti. TORC2 è sensibile ai fattori di

crescita, come l'insulina e fattori insulino-simile, e promuove le risposte allo stress necessarie per la sopravvivenza della cellula (Avruch J., K. Hara et al. 2006; Jacinto E., V. Facchinetti et al. 2006). Nei mammiferi, mTOR funziona in entrambi i complessi (Stanfel M. N., L. S. Shamieh et al. 2009). Infatti mTOR coordina gli input implicati nell'accrescimento cellulare ((Wullschleger S., R. Loewith et al. 2006), che includono fattori di crescita, nutrienti, energia, e lo stress ambientale come il digiuno.

Entrambe queste proteine, AKT e mTOR, sono componenti sequenziali situati a valle della cascata PI3K la cui attivazione permette di inibire i processi di apoptosi e autofagia che possono anche intervenire nella trasformazione maligna e nella crescita tumorale (Marte B. M. and J. Downward 1997; Kang H. Y., D. Shim et al. 2006). Brevemente la cascata enzimatica ha inizio mediante l'oligomerizzazione e attivazione del recettore delle tirosin-chinasi. Ciò attiva PI3K che, a sua volta, fosforila la fosfatidilinositolo-bifosfato (PIP2) a fosfatidilinositolo-trifosfato (PIP3). PIP3, a sua volta, fosforila e attiva AKT che trasloca dal citosol al nucleo (Brazil D. P. and B. A. Hemmings 2001; Hanada M., J. Feng et al. 2004).

AKT, a questo punto, può fosforilare direttamente mTOR e attivare così questa chinasi (Navé B. T., M. Ouwens et al. 1999). Tutto ciò può essere inibito dal digiuno come già accennato. Infatti, ciò provoca l'inibizione del segnale di mTOR e di conseguenza attiva l'autofagia come risposta di sopravvivenza alla carenza nutritiva (Powers T., I. Dilova et al. 2004; Martin D. E. and M. N. Hall 2005; De Virgilio C. and R. Loewith 2006).

Quindi, riassumendo, l'autofagia inizialmente vista come processo di morte cellulare è ora riconosciuta come processo di sopravvivenza cellulare in risposta a condizioni ambientali avverse ma non solo, infatti è riconosciuto anche come processo multivalente coinvolto nella normale fisiologia della cellula (Klein L., C. Münz et al. 2010). Infatti partecipa all'immunità da microrganismi e può contribuire allo sviluppo delle malattie autoimmuni, anche se il meccanismo

d'azione deve essere ancora ben indagato (Strawbridge and Blum 2007; Crotzer V. L. and J. S. Blum 2008).

Perciò la ricerca sull'autofagia può essere utile per rivelare potenziali bersagli terapeutici per le malattie dovute ad alterazioni proteiche, malattie cardiovascolari nonché cancro e malattie autoimmuni .

## SCOPO

Lo scopo della ricerca è valutare se esistono differenze di genere, a livello endoteliale, nella capacità di sopravvivenza cellulare in microambienti non favorevoli.

A tal fine sono state studiate le cellule endoteliali estratte dalla vena di cordoni ombelicali di neonati maschi e femmine (HUVEC), sia in condizioni basali che in condizioni di digiuno (starvation).

Infatti il digiuno è il principale induttore di autofagia, attualmente considerata una risposta difensiva da parte della cellula utile alla sopravvivenza.

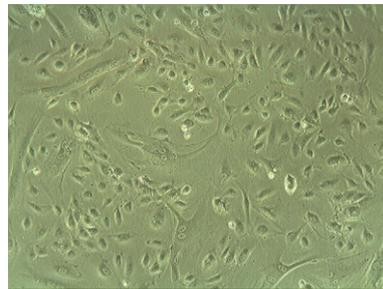
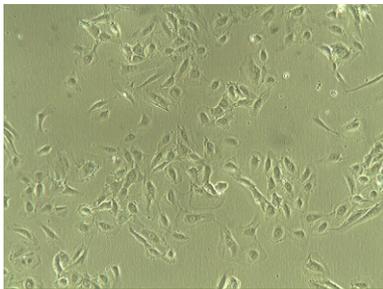
## MATERIALI E METODI

### *Cellule*

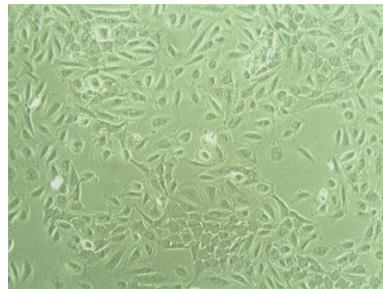
Si sono utilizzate cellule endoteliali umane estratte da vene di cordoni ombelicali (HUVEC) di neonati maschi e femmine. I funicoli, forniti dal Dipartimento di Farmacologia, Ginecologia e Ostetricia dell'Università di Sassari, sono stati selezionati tenendo in considerazione diversi parametri elencati di seguito:

il sesso del neonato, il tipo di parto e di gravidanza, la razza e l'età della partoriente, l'uso di tabacco prima e/o durante la gravidanza, il peso corporeo, eventuali malattie fra cui il diabete gestazionale e il trattamento farmacologico.

I dati così ottenuti sono stati raccolti in una scheda riepilogativa, previa autorizzazione al trattamento dei dati personali delle puerpere.



**A**



**B**

**Fig.3** HUVEC maschili (pannello A) e femminili (pannello B) rispettivamente a P2 e P3. Immagini acquisite al microscopio ottico.

### ***Isolamento delle HUVEC***

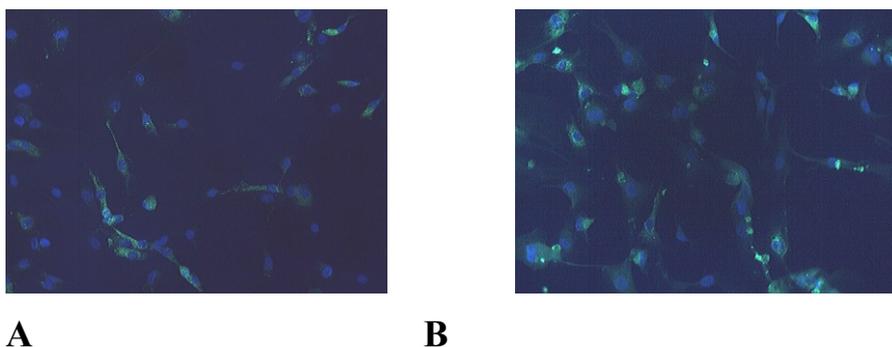
Per l'isolamento delle cellule endoteliali si è proceduto nel seguente modo: i cordoni, sono stati incannulati nella vena, riconoscibile per il lume più ampio rispetto alle due arterie presenti, sono stati lavati due volte con PBS senza  $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$  (Sigma-Aldrich, Saint Louis, USA) per allontanare eventuali grumi di sangue che ostruissero il lume, e sottoposti a digestione con collagenasi Type 1A (Sigma-Aldrich, Saint Louis, USA) ad una concentrazione di 110U/ml, per 10 minuti a 37°C, in atmosfera umidificata al 5% di  $\text{CO}_2$ , per permettere il distacco delle cellule endoteliali. Il prodotto della digestione è stato centrifugato a 800xg per 10 min e seminato in fiasche con coating di gelatina (Sigma-Aldrich, Saint Louis, USA) all'1%, dopo conta con il trypan blue 0,4% per valutare la densità di semina.

Le cellule sono state coltivate in terreno di coltura M199 (Sigma-Aldrich, Saint Louis, USA) addizionato del 10% FBS (Sigma-Aldrich, Saint Louis, USA), 10% NBCS (Sigma-Aldrich, Saint Louis, USA), 2mM L-Glutamina e 1% di antibiotici/antimicotici (Sigma-Aldrich, Saint Louis, USA) e mantenute a 37°C in atmosfera umidificata al 5% di  $\text{CO}_2$ .

### ***Caratterizzazione cellulare mediante espressione del fattore di Von Willebrand in immunofluorescenza***

Le cellule sono state seminate a una densità di circa 75000 cellule/chamber slide. Sono state lavate con PBS e successivamente fissate in PFA 4% in PBS per 5 minuti a temperatura ambiente. Dopo un ulteriore lavaggio in PBS sono state fissate in metanolo freddo per 1 minuto a temperatura ambiente per facilitare la permeabilizzazione. Dopo un lavaggio in PBS le cellule sono state trattate con blocking solution (PBS con l'aggiunta di 4% di BSA e 0,1% di Triton X-100) per 10 minuti e incubate con l'anticorpo primario (diluizione 1:400 in blocking solution) per 60 minuti a temperatura ambiente. Dopo 2 lavaggi con PBS si

procede con l'incubazione con l'anticorpo secondario (diluizione da 1:64 a 1:100), coniugato con il probe fluorescente, per 30 minuti al buio. Dopo ulteriori lavaggi in PBS si controcolorano i nuclei col DAPI (1ug/ml) per 4 minuti al buio. Dopo un ultimo lavaggio in PBS si montano i vetrini con il Mountig Medium per fluorescenza.



**Fig.4** Caratterizzazione delle HUVEC mediante valutazione dell'espressione del Fattore di vonWillebrand in immunofluorescenza: **A** HUVEC femminili, **B** HUVEC maschili.

### ***Proliferazione cellulare***

Per determinare la proliferazione cellulare delle HUVEC femminili e maschili nell'arco di tempo di 7 giorni si è utilizzato il CellTiter 96 Aqueous one solution cell proliferation assay (Promega, Madison, USA), metodo colorimetrico che misura la proliferazione cellulare mediante la riduzione da parte delle cellule dell'MTS in formazano, prodotto colorato solubile nel mezzo di coltura. Brevemente le cellule sono state seminate ad una densità di 15000 cellule/cm<sup>2</sup> in una piastra da 96 pozzetti per i tempi zero, 3, 4, 5, 6, 7 giorni. Al tempo zero è stato fatto un cambio terreno a tutti i time point e si è misurata la proliferazione cellulare, al tempo zero, utilizzando un lettore di micropiastre, dopo incubazione per 6 ore con PMS/MTS, alla lunghezza d'onda di 490 nm. Per i successivi time point è stata seguita la metodica applicata al tempo zero.

### ***Determinazione dimensione e forma***

La determinazione delle dimensioni e della forma delle cellule femminili e maschili è stata effettuata con il software Labworks su foto acquisite al microscopio ottico, ingrandimento 100x. Brevemente le immagini sono state ottimizzate mediante “l’image enhancement” e le singole cellule, da un minimo di 5 a un massimo di 10, scelte random, sono state misurate come perimetro e come area mediante la funzione misurazioni manuali.

### ***Determinazione della permeabilità cellulare mediante dosaggio dell’attività della Lattatodeidrogenasi (LDH)***

La determinazione della permeabilità cellulare è stata effettuata mediante il Cytotoxicity Detection Kit (LDH) (Roche, Mannheim, Germany). Le cellule sono state seminate ad una densità di 20000 cellule/pozzetto in una piastra da 96 pozzetti. Dopo 24 ore è stato fatto un cambio terreno alle cellule con Assay medium, fornito nel kit, per i low control, con una soluzione all’1% di Triton X-100 in Assay medium per gli high control e con H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 50 µM in Assay medium per i campioni trattati con perossido d’idrogeno come specificato nel kit. Dopo 72 ore sono stati raccolti 100 ul di supernatante da ciascun pozzetto diluiti di 1 a 4 in assay medium, ai quali si è aggiunto 100ul di miscela di reazione, e incubati per 30 minuti a una temperatura compresa fra i 15 e 25°C, al buio. Successivamente si è proceduto alla lettura al lettore di micropiastre a una lunghezza d’onda di 490nm con lunghezza d’onda di riferimento di 600nm.

### ***Dosaggio dell’inibitore dell’attivatore del plasminogeno tipo 1 (PAI-1)***

Il dosaggio del rilascio di PAI-1 nel mezzo di coltura è stato fatto mediante il PAI-1 Antigen ELISA kit (Hyphen Biomed, Neuville sur Oise, France) seguendo

le istruzioni della casa madre. Brevemente l'immunoconiugato, anticorpo monoclonale HRP coniugato, specifico per il PAI, viene introdotto nei pozzetti di una piastra da 96 pozzetti fornita dal kit, rivestiti con un altro anticorpo monoclonale, specifico per PAI-1. Quindi si aggiunge il campione da testare e si dà inizio alla reazione immunologica.

Quando presente il PAI-1 si lega all'anticorpo legato alla piastra mediante un epitopo e lega l'altro anticorpo coniugato con HRP mediante un altro epitopo. Dopo una fase di lavaggio, viene introdotto il substrato, la perossidasi 3,3', 5,5' - tetrametilbenzidina (TMB), in presenza di perossido di idrogeno ( $H_2O_2$ ), che sviluppa una colorazione blu. Quando la reazione viene bloccata con l'acido solforico, si sviluppa un colore giallo. La quantità di colore sviluppato è direttamente proporzionale alla concentrazione di PAI-1 nel campione esaminato.

### ***Dosaggio dei nitriti totali***

Il dosaggio dei nitriti totali è stato effettuato sui surnatanti delle cellule in coltura ad un passaggio compreso fra 3 e 5.

Brevemente, a 100ul di surnatante sono stati aggiunti 5 ul di nitrato riduttasi 10U/ml, 37,3 ul di NADPH, per ridurre i nitrati a nitriti, portati a un volume di 200ul e incubati per 1 ora a 25°C. Successivamente sono stati aggiunti 200ul di etanolo assoluto a ciascun campione per deproteinizzare e incubati overnight a temperatura ambiente. Dopo centrifugazione a 18000xg per 20 minuti a 4°C, sono stati recuperati i surnatanti e si è proceduto con la reazione di Griess. Lo Standard fornito a una concentrazione di 100uM è stato diluito eseguendo una diluizione seriale 1:2 in terreno M199 deproteinizzato in modo da ottenere concentrazioni di 50, 25, 12,5, 6,25, 3,125, 1,56, 0,78 uM. La lettura è stata effettuata a 540 nm mediante spettrofotometro.

### ***Dosaggio di H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>***

Il dosaggio di H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> è stato effettuato con il Hydrogen Peroxide Colorimetric Detection kit (Stressgen, New York, USA). Lo Standard, fornito alla concentrazione di 100ng/ml, è stato diluito eseguendo una diluizione seriale 1:2 in PBS, in modo da ottenere concentrazioni di 3,400, 1,700, 850, 425, 212,5 e 106,5 ng/ml che corrispondono a 100µM, 50µM, 25µM, 12,5µM, 6,25µM e 3,125µM rispettivamente.

Nei pozzetti sono stati dosati 50µl di standard e campioni, tutti in duplicato. Ad ogni pozzetto sono stati aggiunti 100µl di Color Reagent e incubati per 30 minuti a RT. E' stata quindi effettuata la lettura a 550 nm con un lettore di micropiastre.

### ***Serum Starvation***

Le HUVEC sono state utilizzate al passaggio 3. Le cellule XX e XY, sono state seminate in duplicato ad una densità di 30000/cm<sup>2</sup> e arrivate circa all'80% di confluenza trattate nel seguente modo: un duplicato è stato posto in coltura per 36 ore con terreno M199 privo dell'aggiunta del siero (Serum Starvation) e il secondo, per il medesimo tempo, con terreno M199 completo (Basali). La scelta del tempo di starvation è stata attuata sulla base della curva di crescita in starvation delle cellule XX e XY. Queste mostravano un rallentamento nella proliferazione diverso nel tempo, con un dimezzamento delle cellule adese vitali, uguale in ambo i tipi cellulari alle 36 ore. La determinazione della vitalità è stata eseguita mediante conta cellulare con trypan blue (Sigma-Aldrich, Saint Louis, USA).

### ***Lisi cellulare e determinazione proteica***

Le HUVEC trascorso il tempo di incubazione, sono state lavate due volte con PBS a 4°C e lisate in ghiaccio per 15 minuti, con Buffer di Lisi 1X (Cell Signalling Technology) così composto : 20 mM Tris (pH 7.5), 150 mM NaCl, 1 mM EGTA, 1% Triton, 2,5 mM sodium pyrophosphate, 1 mM  $\beta$ -glycerophosphate, 1 mM  $\text{Na}_3\text{VO}_4$ , 1  $\mu\text{g}/\text{ml}$  Leupeptin, con l'aggiunta di phenylmethylsulfonylfluoride (PMSF) 1mM, come inibitore delle proteasi. Successivamente il lisato è stato sonicato per pochi minuti e centrifugato a 9000xg per 5 minuti a 4°C. Il lisato così ottenuto è stato sottoposto a determinazione proteica con il Bradford Reagent (Sigma-Aldrich, Saint Louis, USA) utilizzando il Micro 2 ml Bradford Assay Protocol. Tale protocollo è usato quando un largo volume (almeno 1 ml) di campione diluito è disponibile per la determinazione proteica. Il range della concentrazione lineare degli standard va da 1 a 10  $\mu\text{g}$  di proteina totale in 1 ml. Brevemente si preparano gli standard con BSA in buffer di lisi per coprire il range suddetto in un volume di 1 ml per ciascuno standard; per il bianco si aggiunge solo 1 ml di buffer di lisi. Si preparano i campioni da testare, con una concentrazione approssimativa che rientri nel range, in un volume di 1 ml. A ciascun campione si aggiunge 1 ml di Bradford reagent, si miscela e si lascia a incubare per un tempo compreso fra 5 e 45 minuti. Si legge allo spettrofotometro a una lunghezza di 595nm. Si mette in grafico l'assorbanza netta con le concentrazioni degli standard e si determina la concentrazione proteica dei campioni da testare in base alla curva standard.

### ***Western Blotting***

Dopo aver determinato la concentrazione proteica dei campioni, un uguale quantità di proteine è stata separata attraverso il 12% SDS-PAGE e trasferite su membrana di nitrocellulosa.

Le membrane sono state poi bloccate con Tris buffered saline-Tween 20 (TBST) contenente 5% di latte e incubate con l'anticorpo primario overnight a 4°C. Dopo lavaggi con TBST le membrane sono state incubate con anticorpo secondario coniugato con HRP per 1 ora a temperatura ambiente.

Dopo un secondo round di lavaggi con TBST, le membrane sono state sviluppate con il sistema ECL.

Gli anticorpi primari utilizzati sono i seguenti: AKT, eNOS, Beclin-1, mTOR, caspase 9 (Cell Signaling Technology), polyclonal anti-LC3 (MBL, International Corporation, Woburn, USA), anti-Actin (20-33) IgG fraction of antiserum (Sigma-Aldrich, Saint Louis, USA).

Per la determinazione dell'attività di AKT è stato usato il Nonradioactive AKT kinase Assay Kit (Cell Signaling Technology). L'immobilized phospho AKT (Ser473) antibody è stato usato per immunoprecipitare AKT dagli estratti cellulari. Dopo è stato eseguito un in-vitro kinase assay utilizzando la proteina di fusione GSK-3 come substrato. La misura della fosforilazione della GSK3, attraverso l'anticorpo phospho-GSK3  $\alpha/\beta$ , ci indica in maniera indiretta l'attività di AKT.

### ***Controllo positivo dell'autofagia e dell'apoptosi***

Il sistema è stato saggiato con un controllo positivo ottenuto mediante l'uso della rapamicina (50  $\mu$ M) (Sigma-Aldrich, Saint Louis, USA) noto inibitore dell'attività di mTOR, e perciò induttore di autofagia (Zeng Z., D. Sarbassov et al. 2007; Barilli A., R. Visigalli et al. 2008; Stanfel M. N., L. S. Shamieh et al. 2009) su cellule in condizioni basali. L'incubazione di 36 ore con rapamicina aumenta, come atteso, l'espressione di LC3II, ed il rapporto LC3II/LC3I indicando che le cellule sono andate incontro a processi autofagici.

Inoltre il sistema è stato anche saggiato con un controllo positivo per l'apoptosi ottenuto trattando le cellule in condizioni basali con staurosporina (200nM) (Alexis Biochemical, USA)

### *Analisi densitometrica e statistica*

L'analisi densitometrica delle lastre fotografiche è stata effettuata mediante il software LabWorks e l'analisi statistica mediante il software SigmaStat 3,1.

## **RISULTATI**

### ***Differenze e similarità delle cellule endoteliali in condizioni basali***

#### ***Proliferazione, dimensione e forma***

Per quel che riguarda l'aspetto strettamente cellulare si è proceduto analizzando la proliferazione, la dimensione e la forma, nel tempo e in condizioni basali, di campioni maschili e femminili.

La proliferazione è stata studiata per sette giorni ed è stata valutata costruendo una retta sia nelle cellule XX che XY. Le cellule femminili presentano la seguente retta di regressione:  $y=3452x+972,82$   $R^2=0,7337$ , mentre le cellule maschili hanno una retta di regressione  $y=2708,2x+1291,4$   $R^2=0,6728$ , il confronto delle differenze indica che la proliferazione è significativamente maggiore nelle cellule femminili ( $P<0,01$ ) rispetto alle cellule maschili.

Invece la dimensione e la forma cellulare non differiscono significativamente tra i due diversi tipi cellulari anche se esaminate per un periodo di 14 giorni.

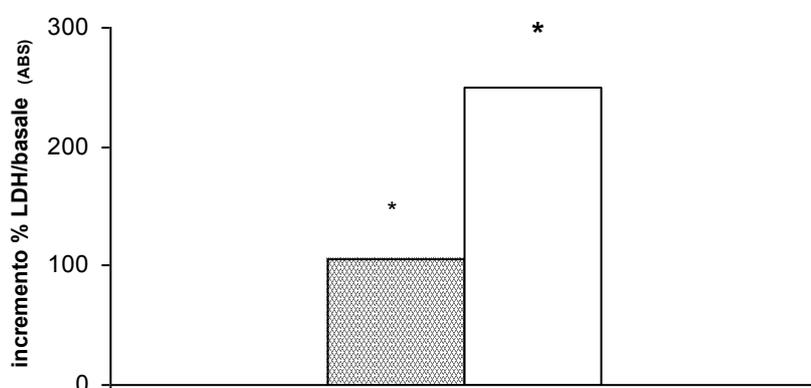
#### ***Dosaggio dell'attività dell' LDH***

Il grado di permeabilità cellulare è stato valutato misurando l'attività della LDH rilasciata dalle cellule in condizione basali e dopo esposizione ad acqua ossigenata (tabella 1, figura 5). L'attività dell' LDH può essere utilizzata come un indicatore dell'integrità della membrana e quindi essere considerata una misura della citotossicità causata da composti chimici o tossici ambientali. Come possiamo osservare dalla tabella 1, in condizioni basali non ci sono differenze significative fra i due tipi cellulari anche se le cellule XY sembrano liberare meno LDH, si nota anche che vi è una notevole variabilità almeno per quanto riguarda questo

parametro nelle cellule maschili. Tuttavia, in seguito ad esposizione delle cellule ad H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> si ha un aumento significativo della liberazione della LDH, l'aumento, come ben evidenziato nella figura 5, è più marcato (250%) nelle cellule maschili che nelle cellule femminili dove si avvicina al 100%.

	<i>Attività LDH<sub>(ABS)</sub></i>	
	<i>Basali</i>	<i>Incubazione con H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (50μM)</i>
<i>Cellule XX</i>	29,90±3,70	61,60±9,90 *
<i>Cellule XY</i>	15,30±8,10	53,50±13,30 *

**Tab.1** I dati sono espressi come media di 6 esperimenti indipendenti ± ES (\*P<0,05).



**Fig.5** Incremento percentuale dell'attività di LDH rispetto al basale, riportato in tabella 1, in HUVEC femminili  e maschili  dopo stimolazione per 72 ore con H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 50 μM. I dati sono espressi come media di 6 esperimenti indipendenti e ES (t test \*0,01<P<0,05).

### ***Dosaggio di PAI-1***

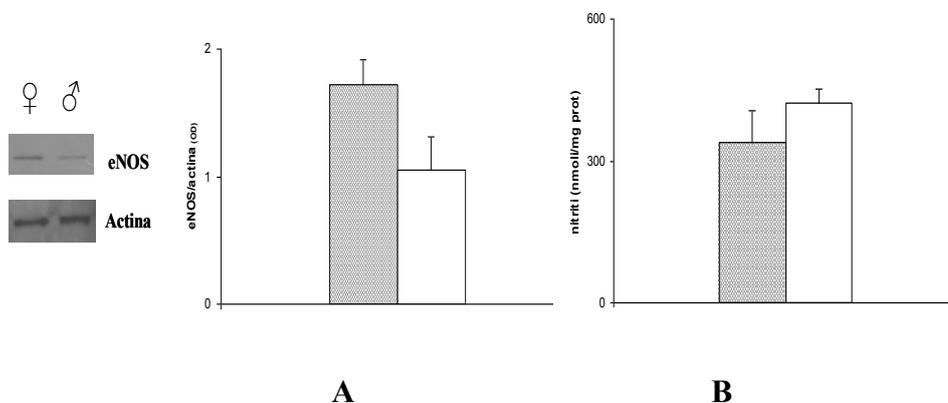
Abbiamo eseguito il dosaggio PAI-1 nel soprannatante. Il PAI-1 è l'inibitore dell'attivatore del plasminogeno tipo 1 che viene secreto dall'endotelio soprattutto in diverse condizioni cliniche definite protrombotiche. Come possiamo osservare in tabella 2 non si hanno differenze statisticamente significative fra cellule XX e XY.

<b><i>Parametri biochimici</i></b>	<b><i>HUVEC XX</i></b>	<b><i>HUVEC XY</i></b>
<b><i>PAI-1 nel surnatante (ng/ml)</i></b>	192,80±28,50 (n=4)	209,60±8,60 (n=4)
<b><i>Nitriti totali nel surnatante (nM/mg proteina)</i></b>	339,90±65,50 (n=6)	422,30±30,80 (n=6)
<b><i>Espressione Beclina (od)</i></b>	0,94±0,08 (n=13)	1,88±0,17** (n=13)
<b><i>Espressione AKT (od)</i></b>	0,68±0,13 (n=16)	0,30±0,13* (n=16)
<b><i>Attività di AKT (od)</i></b>	4,23±0,29 (n=7)	2,83±0,50* (n=7)

**Tab. 2** Parametri biochimici misurati in condizioni basali in HUVEC femminili e maschili. I dati sono espressi come media ± ES (\*P<0,05 \*\*P<0,001). In parentesi il numero degli esperimenti indipendenti.

### ***Dosaggio dei nitriti totali ed espressione di eNOS***

La produzione di nitriti totali nelle cellule XX e XY è stata misurata mediante dosaggio colorimetrico come descritto in materiali e metodi. La figura 6 mostra che la produzione dei nitriti non differisce in maniera statisticamente significativa nei due tipi cellulari. Questo dato è in linea con il fatto che l'espressione di eNOS fra i due tipi cellulari non differisce sebbene sia più alta nelle cellule XX.



**Fig.6 A.** Espressione di eNOS in HUVEC femminili ☒ e maschili □, in condizioni basali, normalizzati su actina. I dati sono espressi come media di 11 esperimenti indipendenti e ES; **B.** Quantità di nitriti e nitrati misurati nel surnatante di HUVEC femminili ☒ e maschili □ in condizioni basali. I dati sono espressi come media di 6 esperimenti indipendenti e ES.

### *Produzione di H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>*

Come si può osservare dalla tabella 3, le HUVEC maschili in condizioni basali producono una quantità di H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> significativamente maggiore (circa il 35%) rispetto alle cellule femminili.

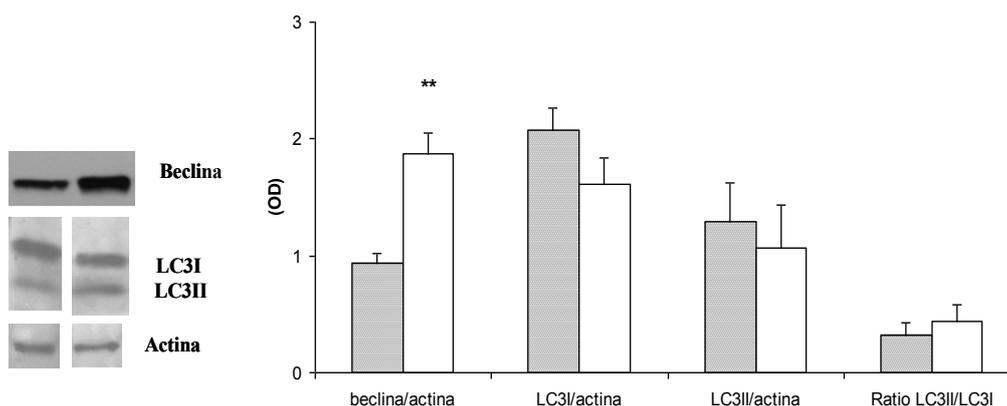
	<i>Produzione di H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (μM)</i>
<i>Cellule XX</i>	43,90±3,00
<i>Cellule XY</i>	58,60±5,90*

**Tab.3** I dati sono espressi come media di 15 esperimenti indipendenti ± ES (t test \*0,01<P<0,05).

### *Studio dell'autofagia*

L'autofagia è quel processo che consente alle cellule di riciclare il proprio contenuto e di rimuovere in modo selettivo mitocondri, altri organelli danneggiati e altro materiale danneggiato. Per valutare il grado di autofagia delle cellule in esame, si sono analizzati marker specifici dei target coinvolti nei pathway molecolare che portano all'autofagia. In particolare, si è studiato la Beclina e LC3. La Beclina e il suo partner vincolante PI3K, sono necessari per l'avvio della formazione dell'autofagosoma mentre LC3I e LC3II sono marker della membrana dell'autofagosoma che si forma durante le ultime fasi del processo.

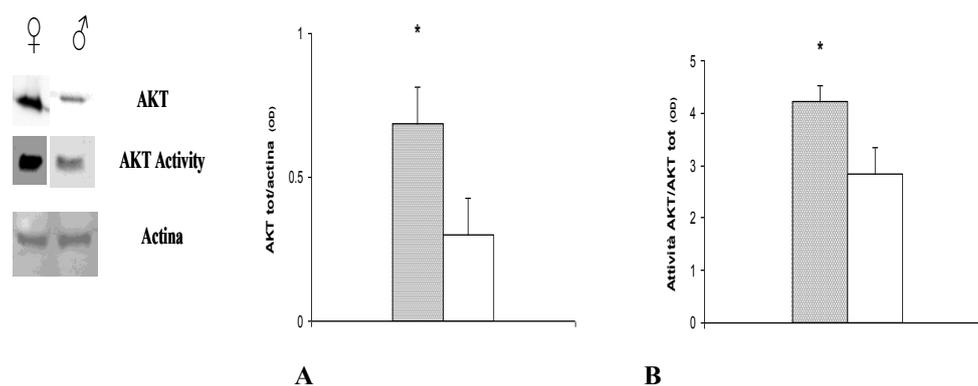
In condizioni basali, è evidente che la Beclina (figura 7) è notevolmente (99,5%) più espressa nelle cellule maschili rispetto alle cellule femminili. Mentre, LC3I è maggiormente espressa nelle cellule XX (di circa il 25%) rispetto alle cellule XY (figura 7). Infine, l'espressione di LC3II la forma lipidata di LC3I è pressoché uguale in ambo i sessi. Il rapporto LC3II/LC3I, che indica la formazione dei vacuoli, è praticamente uguale.



**Fig.7** Espressione di beclina (n=13), LC3I, LC3II, rapporto LC3II/LC3I (n=7) in HUVEC femminili  $\square$  e maschili  $\square$ , in condizioni basali, normalizzati su actina. I dati sono espressi come media e ES (\*\*P<0.001). In parentesi il numero degli esperimenti indipendenti.

### *Espressione e attività della AKT in condizioni basali*

Visto che in letteratura (Lleo A., P. Invernizzi et al. 2007) l'induzione degli autofagosomi è inversamente correlata ai livelli di AKT abbiamo ritenuto opportuno procedere alla misurazione dell'espressione e dell'attività di questa protein-chinasi. Come si può osservare nella figura 8 pannello A, le cellule femminili presentano un'espressione di AKT significativamente maggiore (di circa il 130%) rispetto alle cellule maschili. Questo dato correla con l'attività di AKT, infatti, le cellule XX mostrano un'attività superiore (di circa il 50%) rispetto alle cellule XY (figura 8 pannello B) e questa differenza è statisticamente significativa.



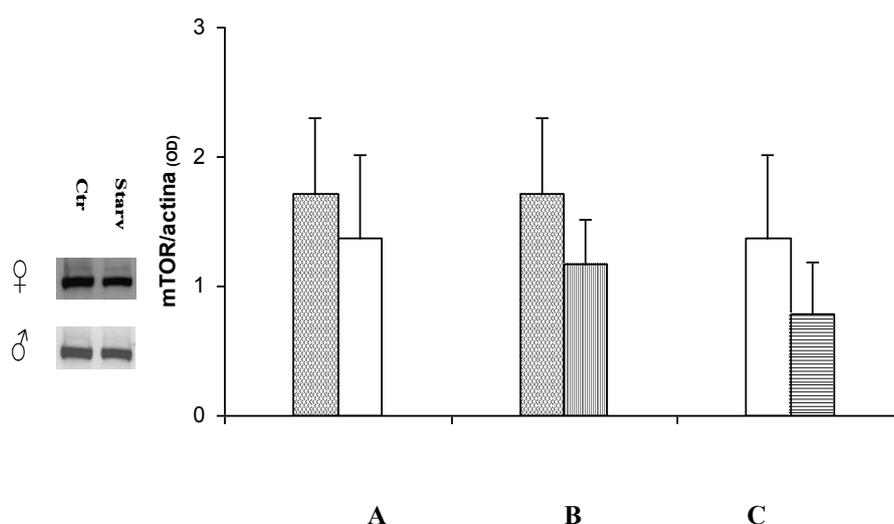
**Fig.8 A.** Espressione di AKT totale in HUVEC femminili  $\boxtimes$  e maschili  $\square$ , in condizioni basali, normalizzati su actina. I dati sono espressi come media di 16 esperimenti indipendenti e ES, (t test  $*0,01 < P < 0,05$ ); **B.** Attività di AKT in HUVEC femminili  $\boxtimes$  e maschili  $\square$ , in condizioni basali, normalizzati su AKT totale. I dati sono espressi come media di 7 esperimenti indipendenti e ES, ( $*0,01 < P < 0,05$ ).

### *Espressione della protein kinase mTOR in condizioni basali*

mTOR è una serin-treonina protein chinasi che regola fra l'altro l'accrescimento cellulare e il metabolismo in risposta agli stimoli ambientali; ma in questo

contesto è importante ricordare che la sua attivazione sopprime l'autofagia e viceversa (Shaw R. J. and L. C. Cantley 2006).

La figura 9 pannello A, mostra l'espressione di mTOR. Essa è più alta nelle cellule XX di circa il 20% rispetto a quella misurate nei lisati provenienti dalle cellule XY, tuttavia questa differenza non è statisticamente significativa.



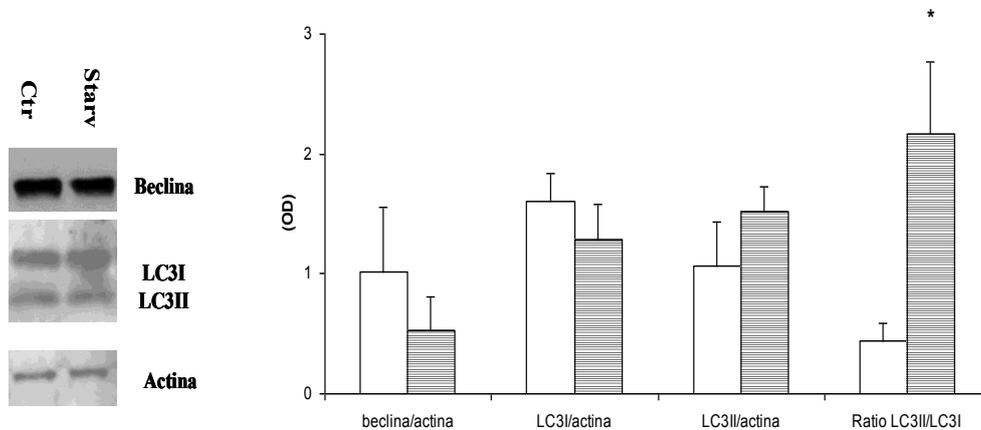
**Fig.9 A.** Espressione di mTOR in HUVEC femminili  e maschili , in condizioni basali, normalizzati su actina. I dati sono espressi come media di 4 esperimenti indipendenti e ES; **B.** Espressione di mTOR in HUVEC femminili prima  e dopo starvation per 36 ore , normalizzati su actina. I dati sono espressi come media di 4 esperimenti indipendenti e ES; **C.** Espressione di mTOR in HUVEC maschili prima  e dopo starvation per 36 ore , normalizzati su actina. I dati sono espressi come media di 4 esperimenti indipendenti e ES.

### ***Digiuno ed autofagia***

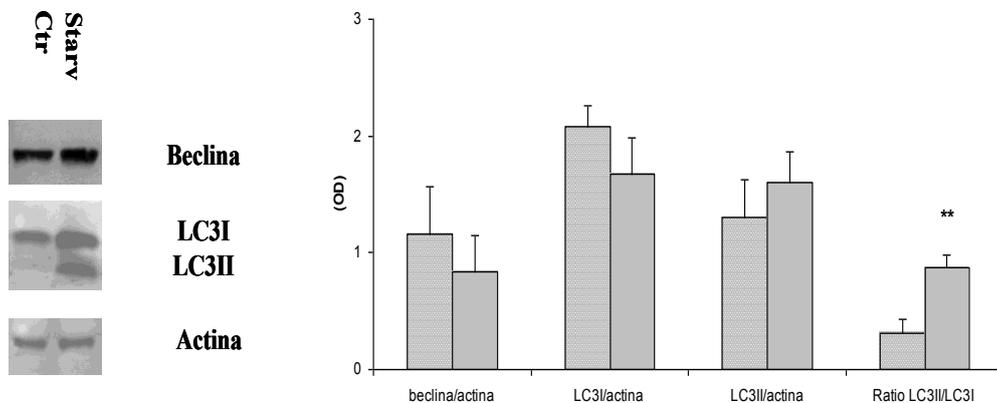
Il principale stimolo capace di indurre l'autofagia è il digiuno (starvation). Nelle nostre condizioni sperimentali, si osserva che il digiuno di 36 ore induce una diminuzione dell'espressione di Beclina sia nelle cellule maschili che femminili tuttavia tale riduzione non è statisticamente significativa (figura 10, 11), forse per il basso numero degli esperimenti.

### *Espressione di LC3*

Se andiamo ad analizzare, rispettivamente, le frazioni LC3I e LC3II, dopo starvation, possiamo notare, nelle cellule femminili (figura 11) e maschili (figura 10), una diminuzione della frazione LC3I (rispettivamente del 18% e del 20%) ed un aumento della frazione LC3II, che deriva dal clivaggio di LC3I, rispetto alle stesse cellule in condizioni basali pari al 23% e 42% nelle cellule femminili e maschili. Il rapporto LC3II/LC3I triplica in ambo i tipi rispetto alle condizioni basali (figure 10 e 11) indicando una minore autofagia nelle cellule femminili.



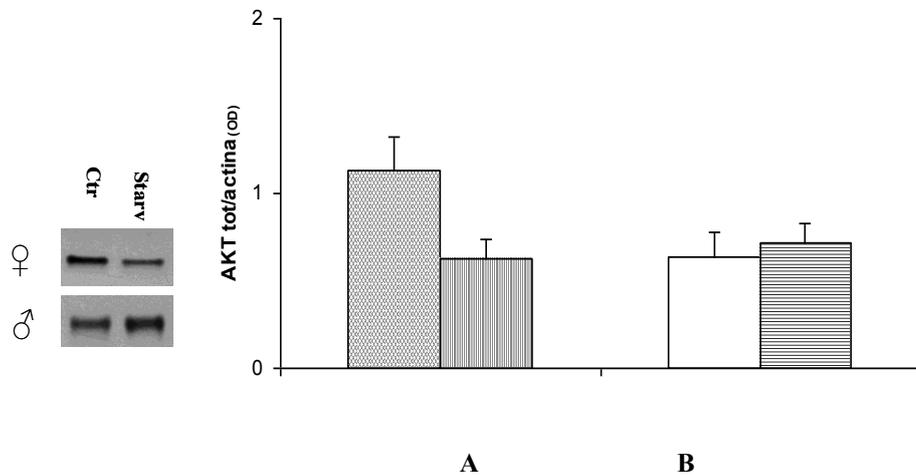
**Fig.10** Espressione di beclina, LC3I, LC3II e rapporto LC3II/LC3I in HUVEC maschili prima  $\square$  e dopo starvation per 36 ore  $\boxplus$ , normalizzati su actina. I dati sono espressi come media di 7 esperimenti indipendenti e ES, (t test  $*0,01 < P < 0,05$ )



**Fig. 11** Espressione di beclina, LC3I, LC3II e rapporto LC3II/LC3I in HUVEC femminili prima  e dopo 36 ore di starvation , normalizzati su actina. I dati sono espressi come media di 7 esperimenti indipendenti e ES, (\*\*P=0,013).

### ***Espressione ed attività di AKT***

In condizioni di starvation le cellule femminili (figura 12, pannello A) mostrano una diminuzione statisticamente significativa, di circa il 50% dell'espressione di AKT rispetto alle stesse cellule in condizioni basali, raggiungendo lo stesso livello espresso nelle cellule maschili. In queste ultime, l'espressione di AKT già poco elevata in condizioni basali, non subisce modificazioni a seguito della starvation (figura 12, pannello B). L'attività di AKT dopo starvation non è più misurabile in ambedue i tipi cellulari.



**Fig.12 A.** Espressione di AKT totale in HUVEC femminili prima e dopo starvation per 36 ore , normalizzati su actina. I dati sono espressi come media di 7 esperimenti indipendenti e ES, (\*P<0,05); **B.** Espressione di AKT totale in HUVEC maschili prima e dopo starvation per 36 ore , normalizzati su actina. I dati sono espressi come media di 7 esperimenti indipendenti e ES.

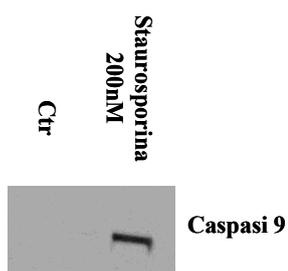
### *Espressione di mTOR*

La figura 9, pannelli B e C, mostrano i dati prima e dopo starvation dell'espressione di mTOR in cellule XX e XY. Come possiamo notare nelle cellule femminili si ha una diminuzione dell'espressione di mTOR del 32% rispetto alle medesime cellule in condizioni basali. Nelle cellule maschili si ha una diminuzione di circa il 50% rispetto alle medesime cellule in condizioni basali e del 35% se confrontate con le cellule femminili dopo starvation.

### *Espressione della Caspase 9*

L'autofagia è comunemente considerata un processo indipendente dalle caspasi, marker proteico solitamente utilizzato per identificare i processi apoptotici (Jiang

C., Z. Wang et al. 2001; Yu W., B. G. Sanders et al. 2003). Pertanto abbiamo misurato un marker di apoptosi ed esattamente la caspasi 9, che dopo autoclivaggio in seguito all'associazione con il citocromo c rilasciato dai mitocondri, da origine alla cascata delle caspasi (Sun S. Y., P. Yue et al. 2002; Bhakar A. L., J. L. Howell et al. 2003; Chandrasekar, Vemula et al. 2004; Jeong W., T. S. Chang et al. 2004), per capire se vi erano differenze nel processo apoptotico. Tale enzima non è misurabile nè in condizioni basali nè in condizioni di digiuno, a questo proposito si ricorda che l'esame della caspase 9 è stato condotto sulle cellule adese che all'incirca dopo 36 ore di digiuno sono il 50%. Il sistema è stato saggiato con l'uso di un controllo positivo incubando le cellule con l'antibiotico staurosporina, noto induttore di apoptosi (figura 13) (Paul C., Simon et al. 2010).



**Fig.13** Espressione di Caspasi 9 in cellule trattate con staurosporina 200nM.

## DISCUSSIONE

Nel nostro studio siamo andati ad investigare se esistessero differenze associate al sesso-genere in culture primarie di cellule endoteliali umane isolate da cordone ombelicale di neonati maschi e femmine reclutati seguendo i criteri di inclusione ed esclusione indicati nei metodi. E' importante ricordare che le HUVEC sono cellule che hanno vissuto in un medium del tutto particolare sia dal punto di vista ormonale, basta pensare agli alti livelli di estrogeni e progesterone, ed al termine della gravidanza si ricorda il picco di prolattina (Partonen T. 1994; Asher I., B. Kaplan et al. 1995; Buckwalter J. G., F. Z. Stanczyk et al. 1999; Valentino V., F. Bernardi et al. 2006) che possono influire sull'espressione della eNOS (Kleinert H., T. Wallerath et al. 1998; Hisamoto K., M. Ohmichi et al. 2001), sulla produzione di NO (Tostes R. C., D. Nigro et al. 2003; Florian M., Y. Lu et al. 2004), ma anche sull'enzima di conversione dell'angiotensina (Tostes R. C., D. Nigro et al. 2003) sul metabolismo dell'acido arachidonico in prostaciclina (Hermenegildo C., P. J. Oviedo et al. 2005; Oviedo P. J., C. Hermenegildo et al. 2005) nonché sull'endotelina 1 (Bilsel A. S., H. Moini et al. 2000; Tostes R. C., D. Nigro et al. 2003) che dal punto di vista di altri fattori (Calò L. and A. Semplicini 1998).

Vogliamo anche sottolineare che i nostri esperimenti son stati condotti ai primi passaggi, questo perché è noto che la fisiologia delle HUVEC cambia in funzione del numero dei passaggi ad esempio la lunghezza e l'attività dei telomeri, che varia in base al numero dei cicli replicativi cellulari portando ad un accorciamento e a una inibizione dell'attività degli stessi che conduce alla senescenza cellulare e alla morte (Hastings R., M. Qureshi et al. 2004; Chen J.H., C. N. Hales et al. 2007; Zunic G., M. Colic et al. 2009; Saliques S., M. Zeller et al. 2010), la produzione dei nitriti (Zunic G., M. Colic et al. 2009), ecc.

Dopo aver caratterizzato le cellule abbiamo studiato la morfologia delle stesse e la loro proliferazione, data l'importanza che questo processo riveste nei processi

angiogenico e antiangiogenico (Nakatsu M. N., R. C. A. Sainson et al. 2003; Arnaoutova I., J. George et al. 2009). Le dimensioni e la forma non sono diverse, mentre le cellule XX crescono maggiormente. Un fenomeno analogo è stato visto nelle VSMC di aorta di ratto (Straface E., R. Vona et al. 2009) ed in cellule staminali endoteliali e mesenchimali (Ray R., N.M. Novotny et al. 2008; Herrmann J., A. Abarbanell et al. 2010) nonché nei fibroblasti cardiaci (Griffin M., H.W. Lee et al. 2000) ma poiché i dati sono scarsi, è necessaria una certa cautela prima di affermare che una maggiore proliferazione sia una caratteristica delle cellule XX.

La liberazione dell'inibitore del plasminogeno, che gioca un ruolo in alcune malattie cardiovascolari (Bairey Merz C. N., L. J. Shaw et al. 2006; Gramling M. W. and F. C. Church 2010), non presenta differenze nei due tipi cellulari e ciò suggerisce, che almeno a questo livello, non sono presenti differenze del processo della fibrinolisi. Tuttavia dati umani mostrano che i livelli di PAI-1 sono maggiori nei maschi rispetto alle femmine quando correlati alle caratteristiche delle malattie cardiovascolari (Mannucci P. M., L. Bernardinelli et al. 2005; Asselbergs F.W., S.M. Williams et al. 2006; Asselbergs F. W., S. M. Williams et al. 2007) e che queste differenze potrebbero essere influenzate da fattori genetici espressi in modo diverso nei due sessi (Collet J. P., G. Montalescot et al. 2003; Morange P. E., N. Saut et al. 2007; Schoenhard J., F. Asselbergs et al. 2008). Ad esempio, uno studio condotto recentemente da Bentley e collaboratori (Bentley J. P., F. W. Asselbergs et al. 2010) ha suggerito la possibile interazione fra geni del sistema renina-angiotensina, bradichinina e sistema fibrinolitico sui rischi delle malattie cardiovascolari, estendendo ricerche precedenti (Brown N. J., M. Agirbasli et al. 1999; Minai K., T. Matsumoto et al. 2001; Moore J. H., M. E Smolkin et al. 2002; Asselbergs F.W., S.M. Williams et al. 2006; Asselbergs F. W., S. M. Williams et al. 2007) le quali sottolineavano l'influenza dei geni di questi sistemi sulle concentrazioni plasmatiche di tPA e PAI-1.

La produzione dei nitriti e l'espressione di eNOS non differiscono nei due tipi cellulari. Questo risultato non in linea con la letteratura attualmente presente

(Laughlin M. H., W. V. Welshons et al. 2003; Kane M. O., E. Anselm et al. 2009) potrebbe essere ricondotto ad una relativa bassa numerosità campionaria, infatti eNOS risulta maggiormente espressa, anche se non a livello statisticamente significativo, nelle cellule femminili rispetto alle maschili e ciò indica un trend simile ai dati presenti in letteratura (Laughlin M. H., W. V. Welshons et al. 2003; Kane M. O., E. Anselm et al. 2009). Tuttavia considerando che le HUVEC XX e XY non esprimono il recettore alfa degli estrogeni (Toth B., G. Saadat et al. 2008) a differenza di altre cellule della parete vasale come VSMC dove esso è presente (Jensen I., C.H. Rinaldo et al. 1998; Tatsumi H., J. Kitawaki et al. 2002; Malorni W., E. Straface et al. 2008), tale differenza potrebbe derivare proprio dall'assenza del recettore alfa. È stato dimostrato che i recettori alfa e beta ( $ER\alpha$  e  $ER\beta$ ) esercitano azioni ben distinte in numerosi sistemi ed apparati (Harris M.M., J. Stevens et al. 2000; Gustafsson J.A. 2003) ad esempio esperimenti condotti su topi transgenici suggeriscono che gli effetti degli estrogeni sull'espressione della eNOS siano mediati attraverso  $ER\alpha$  (Geary G. G., A. M. McNeill et al. 2001; Duckles S. and V. Miller 2010) recettore che come abbiamo accennato è assente nelle HUVEC. Pertanto è possibile che non sussistano delle differenze proprio per l'assenza di questi recettori.

Dall'altra parte, esistono anche recettori di membrana degli estrogeni che attivano numerose chinasi (Chimento A., R. Sirianni et al. 2010; Ning N., G. Lin et al. 2010) fra cui AKT, il cui aumento può portare ad una attivazione di NOS (McNeill A. M., N. Kim et al. 1999; Moriarty K., K. H. Kim et al. 2006; Gavin K. M., D. R. Seals et al. 2009; Duckles S. and V. Miller 2010). I dati in nostro possesso, (AKT più alta significativamente nelle cellule femminili e maggiori livelli di eNOS anche se non significativi) suggeriscono che questo secondo sistema sia meno rilevante rispetto a quello mediato dai recettori alfa degli estrogeni.

La eNOS produce NO, un radicale che esercita un'importante funzione di messaggero (Cook-Mills J. M., M. Marchese et al. 2010; Durán W. N., J. W. Breslin et al. 2010; Siervo M., L. Capuano et al. 2010), e un'altra specie reattiva

dell'ossigeno importante nella signaling trasduction è  $H_2O_2$ . L' $H_2O_2$  è un metabolita delle cellule ed è uno dei ROS più importanti nella biologia del sistema cardiovascolare (Paravicini T. M. and R. M. Touyz 2006; Genestra M. 2007; Malorni W., I. Campesi et al. 2007) e non solo (Rhee S.G. 2006; Bedard K. and K. H. Krause 2007; Groeger G., C. Quiney et al. 2009). Nonostante sia stata considerata per anni una forma attivata dell'ossigeno particolarmente dannosa, oggi sappiamo che esercita molteplici ruoli in situazioni sia fisiologiche che patologiche (Rhee S.G. 2006; Bedard K. and K. H. Krause 2007; Groeger G., C. Quiney et al. 2009) ad esempio è importante nei meccanismi di difesa contro i patogeni. I nostri dati mostrano una produzione maggiore, statisticamente significativa, di  $H_2O_2$  nelle cellule maschili rispetto alle cellule femminili. Al momento attuale non siamo in grado di definire le cause di tale aumento però vorremmo sottolineare che questo sembra essere un fenomeno generale (Malorni W., I. Campesi et al. 2007) riguardando numerosi tipi cellulari incluso le VSMC maschili di aorta di ratto (Straface E., R. Vona et al. 2009) dove le cellule maschili mostrano un bilancio redox più sfavorevole rispetto alla controparte femminile.

Una maggiore produzione di ROS può indicare una maggiore suscettibilità allo stress ossidativo ed è anche noto che lo stress ossidativo influenza grandemente il destino cellulare (Malorni W., E. Straface et al. 2008; Maselli A., P. Matarrese et al. 2009; Aras M. A. and E. Aizenman 2010). Infatti esso è importante nella necrosi, nell'apoptosi e nell'autofagia (Zhu C., F. Xu et al. 2006; Malorni W., E. Straface et al. 2008; Hariharan N., P. Zhai et al. 2010). Inoltre è noto che il destino cellulare è genere dipendente almeno in alcuni tipi cellulari come le VSMC. Infatti le VSMC maschili hanno un maggior stress ossidativo che porta all'apoptosi mentre nelle cellule femminili lo stress ossidativo porta ad una senescenza prematura (Malorni W., E. Straface et al. 2008). Inoltre, è stata notata una differente risposta autofagica (Straface E., R. Vona et al. 2009; Li B.X., C.Y. Li et al. 2009).

Nelle nostre condizioni sperimentali si nota che le cellule femminili esprimono maggiormente più AKT, che è anche più attiva, rispetto alle cellule maschili. Una maggiore espressione di AKT è presente anche nei cardiomiociti femminili rispetto a quelle maschili (Camper-Kirby, Welch et al. 2001; Ceylan-Isik A. F., K. H. LaCour et al. 2006; Wang F., Q. He et al. 2010).

Dall'altra parte le cellule maschili sembrano essere più autofagiche e ciò potrebbe dipendere dal fatto che producano una maggiore quantità di perossido d'idrogeno. Ambedue i tipi cellulari, in condizioni basali, non presentano significativi processi apoptotici se misurati mediante caspase 9. Tuttavia è possibile attivare l'apoptosi mediante staurosporina.

Le cellule endoteliali giocano un ruolo importante nel sistema cardiovascolare sia in condizioni fisiologiche che in condizioni patologiche, essendo le malattie ischemiche fra le prime cause di morte sia per gli uomini che per le donne, abbiamo voluto studiare se la starvation che in qualche modo può essere assimilato all'ischemia (carenza di substrati), aveva un effetto diverso sui due tipi cellulari andando a studiare i marker della autofagia.

L'autofagia, da sempre ritenuta un processo di morte cellulare, è oggi considerata come una possibile ed utile strategia di sopravvivenza. È caratterizzata dalla capacità delle cellule di inglobare e digerire materiale e organelli intracellulari e funziona perciò da meccanismo di turnover per eliminare organelli danneggiati, patogeni intracellulari e porzioni superflue di citoplasma, così come proteine vecchie, aberranti o aggregate (Mizushima N. and D. J. Klionsky 2007; Burman C. and N. Ktistakis 2010). Questo processo è importante per l'omeostasi cellulare, e viene promosso soprattutto in risposta a differenti stressors come il digiuno. Ad esempio, per quel che riguarda il cuore, l'autofagia può funzionare come un percorso di pro-sopravvivenza durante la privazione nutritiva o danno ischemico e altre forme di stress cellulare (Decker R. S., M. L. Decker et al. 1980; Mizushima N., A. Yamamoto et al. 2004; Hamacher-Brady A., N. Brady et al. 2006; Martinet W., M. W. M. Knaapen et al. 2007; Nakai A., O. Yamaguchi et al. 2007) Nel nostro sistema abbiamo misurato la Beclina che fa parte di un complesso PI3K

che è ritenuto avere un ruolo importante durante le fasi iniziali della formazione dell'autofagosoma e LC3I-LC3II. La coniugazione della proteina LC3 con molecole lipidiche porta alla formazione, dalla sua forma solubile (LC3I) presente nel citosol, a quella insolubile (LC3II) associata alla vescicola autofagica (Lleo A., P. Invernizzi et al. 2007; Maiuri M. C., E. Zalckvar et al. 2007; Mizushima N. 2007; Tinari A., A. M. Giammarioli et al. 2008).

Nelle nostre cellule dopo il digiuno la beclina e la frazione LC3I, diminuiscono in entrambi i tipi cellulari, mentre si ha un aumento della frazione LC3II maggiore nelle cellule maschili rispetto alle femminili. Questo fenomeno è confermato anche dal rapporto fra le due frazioni proteiche LC3II e LC3I che indica un'attiva formazione autofagica. Infatti le cellule maschili mostrano un'attività autofagica triplicata rispetto alle cellule femminili. Un risultato simile è stato osservato anche da Du e collaboratori (Du L., R. W. Hickey et al. 2009) su neuroni segregati da ratti maschi e femmine. Infatti il digiuno provoca una diminuzione della respirazione mitocondriale e un aumento della formazione dei fagosomi in maniera accentuata nei neuroni maschili rispetto a quelli femminili. Differenze di genere simili, nella risposta al digiuno, sono state anche osservate nei fibroblasti (Du L., R. W. Hickey et al. 2009). Tuttavia in questo tipo cellulare l'inibizione dell'autofagia provoca un aumento della morte cellulare indicando che il ruolo dell'autofagia durante il digiuno non è solo sesso-genere dipendente ma anche tessuto dipendente.

In condizioni di digiuno l'espressione di AKT, come atteso, mostra una diminuzione statisticamente significativa nelle cellule femminili rispetto alle medesime cellule in condizioni basali raggiungendo un livello pari a quello espresso nei lisati delle cellule maschili mentre l'attività dell'AKT è completamente down-regolata. Questo dato è in linea con la letteratura dove si afferma che la bassa attività di AKT a livello costitutivo o la down regulation può indurre resistenza allo stress nutritivo attraverso la riduzione del tasso di sintesi proteica (Codogno P. and A. J. Meijer 2005; Bruno P., A. Calastretti et al. 2007). Infatti il livello dell'attività di AKT può modulare il meccanismo di sintesi e

degradazione proteica e come conseguenza contribuire alla sopravvivenza cellulare durante il digiuno (Codogno P. and A. J. Meijer 2005; Bruno P., A. Calastretti et al. 2007).

Se consideriamo mTOR si ha una diminuzione dell'espressione, anche se non statisticamente significativa, in entrambi i tipi cellulari. Infatti la privazione di nutrienti provoca un'inibizione del segnale di TOR e di conseguenza un'attivazione dell'autofagia (Cheng S. W. Y., L. G. D. Fryer et al. 2004; Lleo A., P. Invernizzi et al. 2007). Il nostro risultato è in linea con i dati presenti in letteratura dove si afferma che mTOR sia una fra le prime proteine ad essere preferenzialmente degradata quando la cellula si trova in condizioni ambientali non favorevoli (Cheng S. W. Y., L. G. D. Fryer et al. 2004; Bruno P., A. Calastretti et al. 2007).

## CONCLUSIONI

Quando i nutrienti intracellulari sono limitati come durante il digiuno, le cellule eucariotiche possono attivare una via di sopravvivenza attraverso la formazione di vacuoli autofagici e la degradazione delle proteine per fornire il pool di amminoacidi essenziali per la sopravvivenza (Codogno P. and A. J. Meijer 2005; Lum J. J., D. E. Bauer et al. 2005). E' un dato di fatto che un metabolismo intracellulare dei nutrienti, funzionale ed efficiente, rappresenta un pre-requisito per tutti i processi cellulari, come ad esempio per la proliferazione cellulare o per il danno cellulare.

L'analisi delle caratteristiche metaboliche e del microambiente della cellula, considerata la principale unità minima che compone i diversi tessuti, è stata oggetto di numerosi studi. Ciò, è dovuto al fatto che eventuali modificazioni del milieu extra ed intra-cellulare, così come variazioni nella disponibilità di micronutrienti, vengono considerati fattori chiave nel mantenimento dell'omeostasi cellulare che, a sua volta, regola l'omeostasi dei tessuti. Alterazioni di micronutrienti o del loro utilizzo da parte delle cellule, la mancanza di specifiche sostanze nutritive o l'eccesso di altre, o lo squilibrio dello stato redox della cellula, causano modificazioni del destino della cellula, ad esempio nei tassi di proliferazione o nella morte. Ognuno di questi cambiamenti nel destino cellulare è dannoso per l'organismo, dato che quasi tutte le patologie umane sono associate a valori aumentati o diminuiti di questi due parametri chiave. D'altra parte, la letteratura attualmente presente sottolinea che le malattie umane spesso mostrano differenze significative tra i sessi. Un esempio è dato dalle malattie immunitarie, cardiovascolari, neurodegenerative e infettive, nonché da diverse forme di cancro (Paggi M. G., R. Vona et al. 2010; Ruggieri A., C. Barbati et al. 2010). Molte se non tutte queste malattie riflettono o sono dovute ad alterazioni nel metabolismo cellulare e/o ad alterazioni dei bisogni nutrizionali. Essi sono infatti il risultato di un complesso quadro di eventi che richiede un equilibrio

continuo di segnali intracellulari che decidono per la sopravvivenza o la morte delle cellule.

La letteratura ci dice che gli ormoni possono influenzare fortemente il destino delle cellule, ad esempio, modulando i recettori ormonali e incidendo su tutti i processi cellulari (Harris M.M., J. Stevens et al. 2000; Gustafsson J.A. 2003), ma anche che, nonostante gli ormoni, cellule XX e XY, hanno diverse esigenze metaboliche. Inoltre, sotto stress, le cellule XY e XX subiscono risposte diverse, essendo, nel nostro caso, le cellule XY in grado di una più efficiente risposta adattativa. Complessivamente i nostri risultati confermano che l'autofagia, così come tutti quei processi metabolici coinvolti nell'omeostasi cellulare, sono sia sesso-genere dipendente che tessuto dipendente, e ciò potrebbe richiedere un riesame dei meccanismi molecolari coinvolti in alcune malattie umane in una prospettiva di genere dove la questione nutrizionale rappresenta indubbiamente la più complessa, ma, anche, la sfida più affascinante degli studi di biologia cellulare nel prossimo futuro.

## RINGRAZIAMENTI

Ringrazio la Prof.ssa Flavia Franconi per la sua guida e per la costante fiducia accordatami, ed tutto il gruppo di lavoro per l'affiatamento e il sostegno reciproco.

Un grazie particolare va a tutta la mia famiglia e in particolare a Barbara per il suo costante sostegno e incoraggiamento e il suo attivo interesse all'argomento di studio.

## BIBLIOGRAFIA

- Aras M. A. and E. Aizenman (2010). "Redox regulation of intracellular zinc: Molecular signaling in the life and death of neurons." Antioxidants & Redox Signaling **0**(ja): null.
- Arnautova I., J. George, et al. (2009). "The endothelial cell tube formation assay on basement membrane turns 20: state of the science and the art." Angiogenesis **12**(3): 267.
- Asher I., B. Kaplan, et al. (1995). "Mood and hormonal changes during late pregnancy and puerperium." Clin Exp Obstet Gynecol **22**(4): 321-5.
- Asselbergs F. W., S. M. Williams, et al. (2007). "Gender-specific correlations of plasminogen activator inhibitor-1 and tissue plasminogen activator levels with cardiovascular disease-related traits." Journal of Thrombosis and Haemostasis **5**(2): 313.
- Asselbergs F.W., S.M. Williams, et al. (2006). "The gender-specific role of polymorphisms from the fibrinolytic, renin-angiotensin, and bradykinin systems in determining plasma t-PA and PAI-1 levels." Thromb Haemost. **96**(4): 471-7.
- Assmann G and H. Schulte (1992). "The importance of triglycerides: results from the Prospective Cardiovascular Münster (PROCAM) Study." Eur J Epidemiol. **8**(1): 99-103.
- Augustin H.G., D. H. Kozian, et al. (1994). "Differentiation of endothelial cells: analysis of the constitutive and activated endothelial cell phenotypes." Bioassays **16**(12): 901-6.
- Avruch J., K. Hara, et al. (2006). "Insulin and amino-acid regulation of mTOR signaling and kinase activity through the Rheb GTPase." Oncogene **25**(48): 6361.
- Bairey Merz C. N., L. J. Shaw, et al. (2006). "Insights From the NHLBI-Sponsored Women's Ischemia Syndrome Evaluation (WISE) Study: Part II: Gender Differences in Presentation, Diagnosis, and Outcome With

- Regard to Gender-Based Pathophysiology of Atherosclerosis and Macrovascular and Microvascular Coronary Disease." Journal of the American College of Cardiology **47**(3, Supplement 1): S21.
- Barilli A., R. Visigalli, et al. (2008). "In human endothelial cells rapamycin causes mTORC2 inhibition and impairs cell viability and function." Cardiovasc Res **78**(3): 563-71.
- Bedard K. and K. H. Krause (2007). "The NOX Family of ROS-Generating NADPH Oxidases: Physiology and Pathophysiology." Physiol. Rev. **87**(1): 245-313.
- Bentley J. P., F. W. Asselbergs, et al. (2010). "Cardiovascular Risk Associated with Interactions among Polymorphisms in Genes from the Renin-Angiotensin, Bradykinin, and Fibrinolytic Systems." PLoS ONE **5**(9): e12757.
- Bhakar A. L., J. L. Howell, et al. (2003). "Apoptosis Induced by p75NTR Overexpression Requires Jun Kinase-Dependent Phosphorylation of Bad." J. Neurosci. **23**(36): 11373-11381.
- Bhalla R. C., K. F. Toth, et al. (1997). "Estrogen reduces proliferation and agonist-induced calcium increase in coronary artery smooth muscle cells." Am J Physiol Heart Circ Physiol **272**(4): H1996-2003.
- Bilsel A. S., H. Moini, et al. (2000). "17 $\beta$ -Estradiol modulates endothelin-1 expression and release in human endothelial cells." Cardiovascular Research **46**(3): 579.
- Brazil D. P. and B. A. Hemmings (2001). "Ten years of protein kinase B signalling: a hard Akt to follow." Trends in Biochemical Sciences **26**(11): 657.
- Brodbeck D., P. Cron, et al. (1999). "A Human Protein Kinase B $\hat{1}$ <sup>3</sup> with Regulatory Phosphorylation Sites in the Activation Loop and in the C-terminal Hydrophobic Domain." Journal of Biological Chemistry **274**(14): 9133.
- Brown N. J., M. Agirbasli, et al. (1999). "Comparative Effect of Angiotensin-Converting Enzyme Inhibition and Angiotensin II Type 1 Receptor

- Antagonism on Plasma Fibrinolytic Balance in Humans." Hypertension **34**(2): 285-290.
- Bruno P., A. Calastretti, et al. (2007). "Cell survival under nutrient stress is dependent on metabolic conditions regulated by Akt and not by autophagic vacuoles." Cellular Signalling **19**(10): 2118.
- Buckwalter J. G., F. Z. Stanczyk, et al. (1999). "Pregnancy, the postpartum, and steroid hormones: effects on cognition and mood." Psychoneuroendocrinology **24**(1): 69.
- Burman C. and N. Ktistakis (2010). "Autophagosome formation in mammalian cells." Seminars in Immunopathology: 1.
- Calò L. and A. Semplicini (1998). L' endotelio vascolare. Aspetti morfofunzionali, fisiopatologici e terapeutici, Piccin-Nuova Libreria.
- Camper-Kirby, D., S. Welch, et al. (2001). "Myocardial Akt Activation and Gender: Increased Nuclear Activity in Females Versus Males." Circ Res **88**(10): 1020-1027.
- Ceylan-Isik A. F., K. H. LaCour, et al. (2006). "Gender disparity of streptozotocin-induced intrinsic contractile dysfunction in murine ventricular myocytes: role of chronic activation of AKT." Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology **33**(1-2): 102.
- Chandrasekar, B., K. Vemula, et al. (2004). "Activation of Intrinsic and Extrinsic Proapoptotic Signaling Pathways in Interleukin-18-mediated Human Cardiac Endothelial Cell Death." Journal of Biological Chemistry **279**(19): 20221.
- Chen J.H., C. N. Hales, et al. (2007). "DNA damage, cellular senescence and organismal ageing: causal or correlative?" Nucleic Acids Research **35**(22): 7417.
- Cheng J. Q., A. K. Godwin, et al. (1992). "AKT2, a putative oncogene encoding a member of a subfamily of protein-serine/threonine kinases, is amplified in human ovarian carcinomas." Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America **89**(19): 9267.

- Cheng S. W. Y., L. G. D. Fryer, et al. (2004). "Thr2446 Is a Novel Mammalian Target of Rapamycin (mTOR) Phosphorylation Site Regulated by Nutrient Status." Journal of Biological Chemistry **279**(16): 15719.
- Chimento A., R. Sirianni, et al. (2010). "Gper and ESRs are expressed in rat round spermatids and mediate oestrogen-dependent rapid pathways modulating expression of cyclin B1 and Bax." International Journal of Andrology: no.
- Codogno P. and A. J. Meijer (2005). "Autophagy and signaling: their role in cell survival and cell death." Cell Death Differ **12**(S2): 1509.
- Collet J. P., G. Montalescot, et al. (2003). "Acute Release of Plasminogen Activator Inhibitor-1 in ST-Segment Elevation Myocardial Infarction Predicts Mortality." Circulation **108**(4): 391-394.
- Cook-Mills J. M., M. Marchese, et al. (2010). "VCAM-1 Expression and Signaling during Disease: Regulation by Reactive Oxygen Species and Antioxidants." Antioxidants & Redox Signaling **0**(ja): null.
- Criollo A., J. M. Vicencio, et al. (2007). "The inositol trisphosphate receptor in the control of autophagy." Autophagy **3**(4): 350-3.
- Crotzer V. L. and J. S. Blum (2008). "Cytosol to Lysosome Transport of Intracellular Antigens During Immune Surveillance." Traffic **9**(1): 10.
- De Virgilio C. and R. Loewith (2006). "The TOR signalling network from yeast to man." The International Journal of Biochemistry & Cell Biology **38**(9): 1476.
- Decker R. S., M. L. Decker, et al. (1980). "Lysosomal vacuolar apparatus of cardiac myocytes in heart of starved and refed rabbits." Journal of Molecular and Cellular Cardiology **12**(11): 1175.
- Deecher D., P. Swiggard, et al. (2003). "Characterization of a membrane-associated estrogen receptor in a rat hypothalamic cell line (D12)." Endocrine **22**(3): 211.

- Dijkstra A. F., P. Verdonk, et al. (2008). "Gender bias in medical textbooks: examples from coronary heart disease, depression, alcohol abuse and pharmacology." Medical Education **42**(10): 1021.
- Doolan C: M. and B. J. Harvey (2003). "A G[alpha]s protein-coupled membrane receptor, distinct from the classical oestrogen receptor, transduces rapid effects of oestradiol on [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> in female rat distal colon." Molecular and Cellular Endocrinology **199**(1-2): 87.
- Du L., R. W. Hickey, et al. (2009). "Starving neurons show sex difference in autophagy." J Biol Chem **284**(4): 2383-96.
- Duckles S. and V. Miller (2010). "Hormonal modulation of endothelial NO production." Pflügers Archiv European Journal of Physiology **459**(6): 841.
- Durán W. N., J. W. Breslin, et al. (2010). "The NO cascade, eNOS location, and microvascular permeability." Cardiovascular Research **87**(2): 254.
- Ferrannini E., A. Natali, et al. (1997). "Insulin Resistance, Hyperinsulinemia, and Blood Pressure: Role of Age and Obesity." Hypertension **30**(5): 1144-1149.
- Florian M., Y. Lu, et al. (2004). "Estrogen induced changes in Akt-dependent activation of endothelial nitric oxide synthase and vasodilation." Steroids **69**(10): 637.
- Fortemaison N., F. Miot, et al. (2005). "Regulation of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> generation in thyroid cells does not involve Rac1 activation." Eur J Endocrinol **152**(1): 127-133.
- Fortuno A., G. San Jose, et al. (2005). "Oxidative stress and vascular remodelling." Experimental Physiology **90**(4): 457.
- Franconi F. and L. I. Ferro (2010). Genere e Salute. O.N.Da La salute della donna un approccio di genere. Franconi F. Milano, Franco Angeli.
- Galluzzi L, Vicencio JM, et al. (2008). "To die or not to die: that is the autophagic question." Curr Mol Med. **8**(2): 78-91.

- Galluzzi L., M. C. Maiuri, et al. (2007). "Cell death modalities: classification and pathophysiological implications." Cell Death Differ **14**(7): 1237.
- Garofalo R. S., S. J. Orena, et al. (2003). "Severe diabetes, age-dependent loss of adipose tissue, and mild growth deficiency in mice lacking Akt2/PKB $\beta$ ." The Journal of Clinical Investigation **112**(2): 197.
- Gavin K. M., D. R. Seals, et al. (2009). "Vascular Endothelial Estrogen Receptor {alpha} Is Modulated by Estrogen Status and Related to Endothelial Function and Endothelial Nitric Oxide Synthase in Healthy Women." J Clin Endocrinol Metab **94**(9): 3513-3520.
- Geary G. G., A. M. McNeill, et al. (2001). "Genome and Hormones: Gender Differences in Physiology: Selected Contribution: Cerebrovascular NOS and cyclooxygenase are unaffected by estrogen in mice lacking estrogen receptor-alpha." J Appl Physiol **91**(5): 2391-2399.
- Genestra M. (2007). "Oxyl radicals, redox-sensitive signalling cascades and antioxidants." Cellular Signalling **19**(9): 1807.
- Gesensway D. (2001). "Reasons for sex-specific and gender-specific study of health topics." Annals of Internal Medicine, **135**(10): 935-938.
- Gramling M. W. and F. C. Church (2010). "Plasminogen activator inhibitor-1 is an aggregate response factor with pleiotropic effects on cell signaling in vascular disease and the tumor microenvironment." Thrombosis Research **125**(5): 377.
- Grant K. and P. Ballem (2000). A women's health research institute in the Canadian Institutes of Health Research. Ottawa, Working Group on the CIHR, Gender and Women's Health Research.
- Greaves L., O. Hankivsky, et al. (1999). CIHR 2000: Sex, gender and women's health. Vancouver, British Columbia Centre of Excellence in Women's Health.
- Griffin M., H.W. Lee, et al. (2000). "Gender-related differences in proliferative response of cardiac fibroblasts to hypoxia." Molecular and Cellular Biochemistry **215**(1): 21.

- Groeger G., C. Quiney, et al. (2009). "Hydrogen Peroxide as a Cell-Survival Signaling Molecule." Antioxidants & Redox Signaling **11**(11): 2655-2671.
- Gustafsson J.A. (2003). "What pharmacologists can learn from recent advances in estrogen signalling." Trends in Pharmacological Sciences **24**(9): 479.
- Hall J. M., J.F. Couse, et al. (2001). "The Multifaceted Mechanisms of Estradiol and Estrogen Receptor Signaling." Journal of Biological Chemistry **276**(40): 36869.
- Hamacher-Brady A., N. Brady, et al. (2006). "The Interplay between Pro-Death and Pro-Survival Signaling Pathways in Myocardial Ischemia/Reperfusion Injury: Apoptosis Meets Autophagy." Cardiovascular Drugs and Therapy **20**(6): 445.
- Hanada M., J. Feng, et al. (2004). "Structure, regulation and function of PKB/AKT--a major therapeutic target." Biochim Biophys Acta **1697**(1-2): 3-16.
- Hariharan N., P. Zhai, et al. (2010). "Oxidative Stress Stimulates Autophagic Flux during Ischemia/Reperfusion." Antioxidants & Redox Signaling.
- Harris M.M., J. Stevens, et al. (2000). "Associations of fat distribution and obesity with hypertension in a bi-ethnic population: the ARIC study. Atherosclerosis Risk in Communities Study." Obes Res. **8**(7): 516-24.
- Hastings R., M. Qureshi, et al. (2004). "Telomere attrition and accumulation of senescent cells in cultured human endothelial cells." Cell Proliferation **37**(4): 317.
- He C., H. Song, et al. (2006). "Recruitment of Atg9 to the preautophagosomal structure by Atg11 is essential for selective autophagy in budding yeast." The Journal of Cell Biology **175**(6): 925.
- Healy B. (1991). "The Yentl Syndrome." New England Journal of Medicine **325**(4): 274-276.
- Heldring N., A. Pike, et al. (2007). "Estrogen receptors: how do they signal and what are their targets." Physiol Rev **87**(3): 905-31.

- Helliwell S. B., I. Howald, et al. (1998). "TOR2 Is Part of Two Related Signaling Pathways Coordinating Cell Growth in *Saccharomyces cerevisiae*." Genetics **148**(1): 99-112.
- Hermenegildo C., P. J. Oviedo, et al. (2005). "Progestogens stimulate prostacyclin production by human endothelial cells." Human Reproduction **20**(6): 1554.
- Herrmann J., A. Abarbanell, et al. (2010). "Gender Dimorphisms in Progenitor and Stem Cell Function in Cardiovascular Disease." Journal of Cardiovascular Translational Research **3**(2): 103.
- Hisamoto K., M. Ohmichi, et al. (2001). "Estrogen Induces the Akt-dependent Activation of Endothelial Nitric-oxide Synthase in Vascular Endothelial Cells." Journal of Biological Chemistry **276**(5): 3459.
- Høyer-Hansen M., L. Bastholm, et al. (2007). "Control of Macroautophagy by Calcium, Calmodulin-Dependent Kinase Kinase-[beta], and Bcl-2." Molecular Cell **25**(2): 193.
- Jacinto E., V. Facchinetti, et al. (2006). "SIN1/MIP1 Maintains rictor-mTOR Complex Integrity and Regulates Akt Phosphorylation and Substrate Specificity." Cell **127**(1): 125.
- Jensen I., C.H. Rinaldo, et al. (1998). "Human umbilical vein endothelial cells lack expression of the estrogen receptor." Endothelium **6**: 9-21.
- Jeong W., T. S. Chang, et al. (2004). "Roles of TRP14, a Thioredoxin-related Protein in Tumor Necrosis Factor- $\alpha$  Signaling Pathways." Journal of Biological Chemistry **279**(5): 3151.
- Jiang C., Z. Wang, et al. (2001). "Caspases as Key Executors of Methyl Selenium-induced Apoptosis (Anoikis) of DU-145 Prostate Cancer Cells." Cancer Research **61**(7): 3062.
- Jonsdottir L.S., N. Sigfusson, et al. (2002). "Do lipids, blood pressure, diabetes, and smoking confer equal risk of myocardial infarction in women as in men? The Reykjavik Study." J Cardiovasc Risk **9**: 67-76.

- Kabeya Y., N. Mizushima, et al. (2000). "LC3, a mammalian homologue of yeast Apg8p, is localized in autophagosome membranes after processing." EMBO J **19**(21): 5720.
- Kabeya Y., N. Mizushima, et al. (2004). "LC3, GABARAP and GATE16 localize to autophagosomal membrane depending on form-II formation." J Cell Sci **117**(13): 2805-2812.
- Kane M. O., E. Anselm, et al. (2009). "Role of gender and estrogen receptors in the rat aorta endothelium-dependent relaxation to red wine polyphenols." Vascular Pharmacology **51**(2-3): 140.
- Kang H. Y., D. Shim, et al. (2006). "Protein kinase B inhibits endostatin-induced apoptosis in HUVECs." J Biochem Mol Biol **39**(1): 97-104.
- Kawagoe J., M. Ohmichi, et al. (2007). "Mechanism of the divergent effects of estrogen on the cell proliferation of human umbilical endothelial versus aortic smooth muscle cells." Endocrinology **148**(12): 6092-9.
- Kim K.M., S. B. Chun, et al. (2001). "Differential regulation of NO availability from macrophages and endothelial cells by the garlic component S-allyl cysteine." Free Radical Biology and Medicine **30**(7): 747.
- Klebanoff S. J. (2005). "Myeloperoxidase: friend and foe." Journal of Leukocyte Biology **77**(5): 598.
- Klein L., C. Münz, et al. (2010). "Autophagy-mediated antigen processing in CD4+ T cell tolerance and immunity." FEBS Letters **584**(7): 1405.
- Kleinert H., T. Wallerath, et al. (1998). "Estrogens Increase Transcription of the Human Endothelial NO Synthase Gene: Analysis of the Transcription Factors Involved." Hypertension **31**(2): 582.
- Klionsky D. J., A. J. Meijer, et al. (2005). "Autophagy and p70S6 kinase." Autophagy **1**(1): 59-60; discussion 60-1.
- Klionsky, D. J. and S. D. Emr (1990). "A new class of lysosomal/vacuolar protein sorting signals." Journal of Biological Chemistry **265**(10): 5349.
- Kolodgie F.D., A. Jacob, et al. (1996). "Estradiol attenuates directed migration of vascular smooth muscle cells in vitro." Am J Pathol **148**: 969–976.

- Krasinski K., I. Spyridopoulos, et al. (1997). "Estradiol Accelerates Functional Endothelial Recovery After Arterial Injury." Circulation **95**(7): 1768-1772.
- Kuhn H. and B. J. Thiele (1999). "The diversity of the lipoxygenase family: Many sequence data but little information on biological significance." FEBS Letters **449**(1): 7.
- Kuiper G. G., E. Enmark, et al. (1996). "Cloning of a novel receptor expressed in rat prostate and ovary." Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America **93**(12): 5925.
- Kushner Peter J., D.A. Agard, et al. (2000). "Estrogen receptor pathways to AP-1." The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology **74**(5): 311.
- Laughlin M. H., W. V. Welshons, et al. (2003). "Gender, exercise training, and eNOS expression in porcine skeletal muscle arteries." J Appl Physiol **95**(1): 250-264.
- Levin E. R. (2001). "Cell localization, physiology, and nongenomic actions of estrogen receptors." J Appl Physiol **91**(4): 1860-7.
- Li B.X., C.Y. Li, et al. (2009). "The expression of beclin 1 is associated with favorable prognosis in stage IIIB colon cancers." Autophagy. **5**(3): 303-6.
- Li L., M. P. Haynes, et al. (2003). "Plasma membrane localization and function of the estrogen receptor  $\beta$  variant (ER46) in human endothelial cells." Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America **100**(8): 4807.
- Liang X. H., L. K. Kleeman, et al. (1998). "Protection against Fatal Sindbis Virus Encephalitis by Beclin, a Novel Bcl-2-Interacting Protein." J. Virol. **72**(11): 8586-8596.
- Libby P., M. Aikawa, et al. (2006). "Vascular endothelium and atherosclerosis." Handb Exp Pharmacol. **176**(2): 285-306.
- Limaye V. and M. Vadas (2007). The vascular endothelium: structure and function. Mechanisms of Vascular Disease. F. R. and M.Thompson.

- London, Matthew Thompson, St George's Hospital Medical School: 1-10.
- Lleo A., P. Invernizzi, et al. (2007). "Autophagy: highlighting a novel player in the autoimmunity scenario." J Autoimmun **29**(2-3): 61-8.
- Loewith R., E. Jacinto, et al. (2002). "Two TOR Complexes, Only One of which Is Rapamycin Sensitive, Have Distinct Roles in Cell Growth Control." Molecular Cell **10**(3): 457.
- Lum J. J., D. E. Bauer, et al. (2005). "Growth Factor Regulation of Autophagy and Cell Survival in the Absence of Apoptosis." Cell **120**(2): 237.
- Luscher T.F. and P.M. Vanhoutte (1990). The Endothelium: Modulator of Cardiovascular Function. Boca Raton, FL, CRC Press.
- Maiuri M. C., E. Zalckvar, et al. (2007). "Self-eating and self-killing: crosstalk between autophagy and apoptosis." Nat Rev Mol Cell Biol **8**(9): 741.
- Malle E., P. G. Furtmüller, et al. (2007). "Myeloperoxidase: a target for new drug development?" British Journal of Pharmacology **152**(6): 838.
- Malorni W., E. Straface, et al. (2008). "Redox state and gender differences in vascular smooth muscle cells." FEBS Lett **582**(5): 635-42.
- Malorni W., I. Campesi, et al. (2007). "Redox features of the cell: a gender perspective." Antioxid Redox Signal **9**(11): 1779-801.
- Mannucci P. M., L. Bernardinelli, et al. (2005). "Tissue plasminogen activator antigen is strongly associated with myocardial infarction in young women." Journal of Thrombosis and Haemostasis **3**(2): 280.
- Marte B. M. and J. Downward (1997). "PKB/Akt: connecting phosphoinositide 3-kinase to cell survival and beyond." Trends Biochem Sci **22**(9): 355-8.
- Martin D. E. and M. N. Hall (2005). "The expanding TOR signaling network." Current Opinion in Cell Biology **17**(2): 158.
- Martinet W., M. W. M. Knaapen, et al. (2007). "Autophagy in cardiovascular disease." Trends in Molecular Medicine **13**(11): 482.
- Maselli A., P. Matarrese, et al. (2009). "Cell sex: a new look at cell fate studies." The FASEB Journal **23**(4): 978.

- McNeill A. M., N. Kim, et al. (1999). "Chronic Estrogen Treatment Increases Levels of Endothelial Nitric Oxide Synthase Protein in Rat Cerebral Microvessels • Editorial Comment." Stroke **30**(10): 2186-2190.
- Miller A. A., T. M. De Silva, et al. (2007). "Effect of gender and sex hormones on vascular oxidative stress." Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology **34**(10): 1037.
- Minai K., T. Matsumoto, et al. (2001). "Bradykinin stimulates the release of tissue plasminogen activator in human coronary circulation: effects of angiotensin-converting enzyme inhibitors." Journal of the American College of Cardiology **37**(6): 1565.
- Mizushima N., A. Yamamoto, et al. (2004). "In Vivo Analysis of Autophagy in Response to Nutrient Starvation Using Transgenic Mice Expressing a Fluorescent Autophagosome Marker." Mol. Biol. Cell **15**(3): 1101-1111.
- Mizushima N. (2007). "Autophagy: process and function." Genes Dev **21**(22): 2861-73.
- Mizushima N., B. Levine, et al. (2008). "Autophagy fights disease through cellular self-digestion." Nature **451**(7182): 1069.
- Mizushima N. and D. J. Klionsky (2007). "Protein Turnover Via Autophagy: Implications for Metabolism\*." Annual Review of Nutrition **27**(1): 19.
- Moore J. H., M. E Smolkin, et al. (2002). "The relationship between plasma t-PA and PAI-1 levels is dependent on epistatic effects of the ACE I/D and PAI-1 4G/5G polymorphisms." Clinical Genetics **62**(1): 53.
- Morales D. E., K. A. McGowan, et al. (1995). "Estrogen Promotes Angiogenic Activity in Human Umbilical Vein Endothelial Cells In Vitro and in a Murine Model." Circulation **91**(3): 755-763.
- Morange P. E., N. Saut, et al. (2007). "Association of Plasminogen Activator Inhibitor (PAI)-1 (SERPINE1) SNPs With Myocardial Infarction, Plasma PAI-1, and Metabolic Parameters: The HIFMECH Study." Arterioscler Thromb Vasc Biol **27**(10): 2250-2257.

- Moriarty K., K. H. Kim, et al. (2006). "Estrogen Receptor-Mediated Rapid Signaling." Endocrinology **147**(12): 5557-5563.
- Mosselman S., J. Polman, et al. (1996). "Identification of a novel human estrogen receptor (ERb)." FEBS Lett. **392**: 49–53.
- Nakai A., O. Yamaguchi, et al. (2007). "The role of autophagy in cardiomyocytes in the basal state and in response to hemodynamic stress." Nat Med **13**(5): 619.
- Nakamura Y., T. Suzuki, et al. (2004). "Estrogen receptors in atherosclerotic human aorta: inhibition of human vascular smooth muscle cell proliferation by estrogens." Molecular and Cellular Endocrinology **219**(1-2): 17.
- Nakatsu M. N., R. C. A. Sainson, et al. (2003). "Angiogenic sprouting and capillary lumen formation modeled by human umbilical vein endothelial cells (HUVEC) in fibrin gels: the role of fibroblasts and Angiopoietin-1[star, open]." Microvascular Research **66**(2): 102.
- Navé B. T., M. Ouwens, et al. (1999). "Mammalian target of rapamycin is a direct target for protein kinase B: identification of a convergence point for opposing effects of insulin and amino-acid deficiency on protein translation." Biochem. J. **344**(2): 427-431.
- Ning N., G. Lin, et al. (2010). "Effects of Estrogen, Raloxifene, and Levormeloxifene on the Expression of Rho-kinase Signaling Molecules in Urethral Smooth Muscle Cells." Urology In Press, Corrected Proof.
- Oberstein A., P. D. Jeffrey, et al. (2007). "Crystal Structure of the Bcl-XL-Beclin 1 Peptide Complex." Journal of Biological Chemistry **282**(17): 13123.
- Oviedo P. J., C. Hermenegildo, et al. (2005). "Raloxifene promotes prostacyclin release in human endothelial cells through a mechanism that involves cyclooxygenase-1 and -2." Fertility and Sterility **83**(6): 1822.
- Paech K., P. Webb, et al. (1997). "Differential ligand activation of estrogen receptors ERalpha and ERbeta at AP1 sites." Science **277**(5331): 1508-10.

- Paggi M. G., R. Vona, et al. (2010). "Gender-related disparities in non-small cell lung cancer." Cancer Letters **298**(1): 1.
- Papaharalambus C. A. and K. K. Griendling (2007). "Basic Mechanisms of Oxidative Stress and Reactive Oxygen Species in Cardiovascular Injury." Trends in Cardiovascular Medicine **17**(2): 48.
- Paravicini T. M. and R. M. Touyz (2006). "Redox signaling in hypertension." Cardiovascular Research **71**(2): 247.
- Partonen T. (1994). "Prolactin in winter depression." Medical Hypotheses **43**(3): 163.
- Pattingre S., A. Tassa, et al. (2005). "Bcl-2 Antiapoptotic Proteins Inhibit Beclin 1-Dependent Autophagy." Cell **122**(6): 927.
- Paul C., S. Simon, et al. (2010). "Dynamic processes that reflect anti-apoptotic strategies set up by HspB1 (Hsp27)." Exp Cell Res **316**(9): 1535-52.
- Pérez-López F.R., L. Larrad-Mur, et al. (2010). "Review: Gender Differences in Cardiovascular Disease: Hormonal and Biochemical Influences." Reproductive Sciences **17**(6): 511.
- Peterson S., V. Peto, et al. (2005). European cardiovascular disease statistics. London, British Heart Foundation.
- Piras P. and F. Franconi (2009). Salute e Diritti nella prospettiva di genere. Cagliari, AIPSA edizioni.
- Powers T., I. Dilova, et al. (2004). "Yeast TOR signaling: a mechanism for metabolic regulation." Curr. Top. Microbiol. Immunol **279**: 39–51.
- Ray R., N.M. Novotny, et al. (2008). "Sex steroids and stem cell function." Mol Med **14**(7-8): 493-501.
- Razandi M., A. Pedram, et al. (2004). "Plasma membrane estrogen receptors exist and functions as dimers." Mol Endocrinol **18**(12): 2854-65.
- Reaven G. (1999). "Syndrome X: 10 years after." Drugs. **58**(1): 19-20.
- Reaven G. M. (1993). "Role of Insulin Resistance in Human Disease (Syndrome X): An Expanded Definition." Annual Review of Medicine **44**(1): 121-131.

- Regier D. S., D. G. Greene, et al. (2000). "Phosphorylation of p22 phox Is Mediated by Phospholipase D-dependent and -independent Mechanisms." Journal of Biological Chemistry **275**(37): 28406.
- Regitz-Zagrosek V. (2006). "Therapeutic implications of the gender-specific aspects of cardiovascular disease." Nat Rev Drug Discov **5**(5): 425.
- Rhee S.G. (2006). "H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, a Necessary Evil for Cell Signaling." Science **312**(5782): 1882.
- Ribeiro F., A.J. Alves, et al. (2009). "Endothelial function and atherosclerosis: circulatory markers with clinical usefulness." Rev Port Cardiol. **28**(10): 1121-51.
- Risberg G., E. Johansson, et al. (2009). "A theoretical model for analysing gender bias in medicine." International Journal for Equity in Health **8**(1): 28.
- Rosano G.M.C. (2010). Malattie cardiovascolari: prevenzione con approccio di genere. O.N.Da La salute della donna un approccio di genere. Franconi F. Milano, Franco Angeli.
- Ruggieri A., C. Barbati, et al. (2010). "Cellular and molecular mechanisms involved in hepatocellular carcinoma gender disparity." International Journal of Cancer **127**(3): 499.
- Saliques S., M. Zeller, et al. (2010). "Telomere length and cardiovascular disease." Archives of Cardiovascular Diseases **103**(8-9): 454.
- Schoenhard J., F. Asselbergs, et al. (2008). "Male–female differences in the genetic regulation of t-PA and PAI-1 levels in a Ghanaian population." Human Genetics **124**(5): 479.
- Shaw R. J. and L. C. Cantley (2006). "Ras, PI(3)K and mTOR signalling controls tumour cell growth." Nature **441**(7092): 424.
- Siervo M., L. Capuano, et al. (2010). "Physiology and in vivo measurements of nitric oxide in man." Clin Ter. **161**(2): 173-83.
- Silverman E. S. and J. M. Drazen (1999). "The Biology of 5-Lipoxygenase: Function, Structure, and Regulatory Mechanisms." Proceedings of the Association of American Physicians **111**(6): 525.

- Stanfel M. N., L. S. Shamieh, et al. (2009). "The TOR pathway comes of age." Biochim Biophys Acta **1790**(10): 1067-74.
- Straface E., R. Vona, et al. (2009). "Cell sex determines anoikis resistance in vascular smooth muscle cells." FEBS Lett **583**(21): 3448-54.
- Strawbridge, A. B. and J. S. Blum (2007). "Autophagy in MHC class II antigen processing." Current Opinion in Immunology **19**(1): 87.
- Sun S. Y., P. Yue, et al. (2002). "The Synthetic Retinoid CD437 Selectively Induces Apoptosis in Human Lung Cancer Cells while Sparing Normal Human Lung Epithelial Cells." Cancer Research **62**(8): 2430.
- Taddei S., L. Ghiadoni, et al. (2003). "Mechanisms of endothelial dysfunction: clinical significance and preventive non-pharmacological therapeutic strategies." Curr Pharm Des **9**: 2385–2402.
- Tatsumi H., J. Kitawaki, et al. (2002). "Lack of stimulatory effect of dienogest on the expression of intercellular adhesion molecule-1 and vascular cell adhesion molecule-1 by endothelial cell as compared with other synthetic progestins." Maturitas **42**(4): 287.
- Tinari A., A. M. Giammarioli, et al. (2008). Chapter One Analyzing Morphological and Ultrastructural Features in Cell Death. Methods in Enzymology, Academic Press. **Volume 442**: 1.
- Tostes R. C., D. Nigro, et al. (2003). "Effects of estrogen on the vascular system." Brazilian Journal of Medical and Biological Research **36**: 1143.
- Toth B., G. Saadat, et al. (2008). "Human umbilical vascular endothelial cells express estrogen receptor beta (ER $\beta$ ) and progesterone receptor A (PR-A), but not ER $\alpha$  and PR-B." Histochemistry and Cell Biology **130**(2): 399.
- Touyz R. M. and E. L. Schiffrin (2004). "Reactive oxygen species in vascular biology: implications in hypertension." Histochemistry and Cell Biology **122**(4): 339.

- Tremblay G.B., A. Tremblay, et al. (1997). "Cloning chromosomal localization, and functional analysis of the murine estrogen receptor b." Mol. Endocrinol **11**: 353–365.
- Valentino V., F. Bernardi, et al. (2006). "Ormoni, psiche e modulazione dell'umore: quando il ginecologo conta." Giorn. It. Ost. Gin **28**(4).
- Vasan R.S., M.G. Larson, et al. (2001). "Impact of High-Normal Blood Pressure on the Risk of Cardiovascular Disease." New England Journal of Medicine **345**(18): 1291-1297.
- Versari D., E. Daghini, et al. (2009). "Endothelial dysfunction as a target for prevention of cardiovascular disease." Diabetes Care **32 Suppl 2**: S314-21.
- Vicencio J. M., L. Galluzzi, et al. (2008). "Senescence, Apoptosis or Autophagy?" Gerontology **54**(2): 92.
- Walter P., S. Green, et al. (1985). "Cloning of the human estrogen receptor cDNA." Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America **82**(23): 7889.
- Wang F., Q. He, et al. (2010). "Female Adult Mouse Cardiomyocytes Are Protected Against Oxidative Stress." Hypertension **55**(5): 1172-1178.
- Wang Z., X. Zhang, et al. (2005). "Identification, cloning, and expression of human estrogen receptor-[alpha]36, a novel variant of human estrogen receptor-[alpha]66." Biochemical and Biophysical Research Communications **336**(4): 1023.
- Wullschleger S., R. Loewith, et al. (2006). "TOR Signaling in Growth and Metabolism." Cell **124**(3): 471.
- Yang Z. Z., O. Tschopp, et al. (2003). "Protein Kinase B/Akt1 Regulates Placental Development and Fetal Growth." Journal of Biological Chemistry **278**(34): 32124.
- Yu W., B. G. Sanders, et al. (2003). "RRR-Î±-Tocopheryl Succinate-induced Apoptosis of Human Breast Cancer Cells Involves Bax Translocation to Mitochondria." Cancer Research **63**(10): 2483.

- Zeng Z., D. Sarbassov dos, et al. (2007). "Rapamycin derivatives reduce mTORC2 signaling and inhibit AKT activation in AML." Blood **109**(8): 3509-12.
- Zhu C., F. Xu, et al. (2006). "Different apoptotic mechanisms are activated in male and female brains after neonatal hypoxia–ischaemia." Journal of Neurochemistry **96**(4): 1016.
- Zunic G., M. Colic, et al. (2009). "Nitrite to nitrate molar ratio is inversely proportional to oxidative cell damages and granulocytic apoptosis at the wound site following cutaneous injury in rats." Nitric Oxide **20**(4): 264.