



A.D. MDLXII

UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI SASSARI

SCUOLA DI DOTTORATO DI RICERCA IN SCIENZE BIOMEDICHE

Direttore della Scuola: Prof. Franca Deriu

INDIRIZZO IN FARMACOLOGIA DI GENERE

Responsabile di Indirizzo: Prof.ssa Flavia Franconi

XXVI CICLO

**DIFFERENZE DI SESSO-GENERE NELLA
MACROAUTOFAGIA IN DUE MODELLI
SPERIMENTALI**

Direttore:

Prof.ssa Franca Deriu

Tutor:

Prof.ssa Flavia Franconi

Tesi di dottorato di:

Dott. Stefano Occhioni

Anno Accademico 2012 - 2013

INDICE

Obbiettivi della ricerca	6
Introduzione	8
I concetti di Sesso e Genere	8
Il pregiudizio di genere: cenni storici	10
Il riconoscimento delle differenze	13
Macroautofagia	14
Differenze di sesso-genere nella macroautofagia a livello cellulare	19
Macroautofagia e apparato cardiovascolare: cuore e muscolo liscio vasale	19
Materiali e metodi	21
Reperimento e selezione dei cordoni ombelicali	21
Isolamento e coltura delle HUASMC	22
Caratterizzazione delle HUASMC mediante immunofluorescenza	24
Condizioni sperimentali	25
Lisi cellulare e Western Blot	26
Selezione degli Housekeeping per i Western Blot	26
Animali	27
Determinazione della concentrazione della malonildialdeide (MDA)	27
Determinazione della concentrazione dei carbonili delle proteine	28

Microscopia in immunofluorescenza	28
Lisi dei tessuti e western blot per α -Actina, GAPDH, β -tubulina, Beclin-1, mTOR, LC3	29
Analisi statistica	30
Risultati	31
Valutazione del peso degli animali	31
Stress ossidativo nei cuori di ratto: MDA e carbonili	31
Western blot in cuori ottenuti da ratti maschi e femmina	31
Immunofluorescenza su sezioni di cuori ottenuti da ratti maschi e femmina	34
Peso ed età delle partorienti e peso dei neonati	35
Analisi in western blotting della proteina LC3 in condizioni basali, dopo starvation e dopo trattamento con rapamicina	37
Analisi in western blotting delle 2 forme della proteina LC3 in seguito a trattamento con rapamicina	41
Western blotting per Beclina-1, mTOR e PmTOR in condizioni basali, dopo starvation e dopo rapamicina	42
Correlazioni fra il peso del neonato e autofagia basale delle HUASMC	44
Discussione	46
Bibliografia	50

Obiettivi della ricerca

L'obiettivo della presente Tesi di Dottorato è la ricerca di differenze di sesso-genere nella regolazione e nell'entità del processo autofagico su due modelli: uno umano, le cellule della muscolatura liscia dall'arteria del cordone ombelicale o HUASMC (human umbilical artery smooth muscle cells) e uno animale, il cuore di ratti Sprague-Dawley. Benché la provenienza dei due modelli sia molto diversa, operare in questo modo ci consente di spaziare ampiamente nel campo della fisiopatologia cardiovascolare, indagando gli effetti dell'*autodigestione cellulare* sia sul cuore vero e proprio che sulla muscolatura liscia, parte fondamentale dell'apparato cardiovascolare.

La presente Tesi di Dottorato va considerata un lavoro in buona parte descrittivo, che lascia però spazio a riflessioni sul coinvolgimento del processo autofagico nel mantenimento omeostatico e nell'insorgenza di alcune patologie.

In generale, in condizioni fisiologiche, si delinea per l'autofagia un profilo protettivo e omeostatico di grande importanza e influenza. Questo processo è responsabile del mantenimento dell'integrità biologica a diversi livelli: dal livello cellulare al livello dell'organismo nella sua interezza; tuttavia, appare sempre più evidente come la regolazione dell'autofagia sia un processo estremamente delicato e potenzialmente dannoso: un'attivazione troppo intensa o, al contrario, insufficiente porta in entrambi i casi a forme di sofferenza cellulare che possono culminare nella morte della cellula.

In questo lavoro di Tesi vengono riportati i risultati dei nostri studi sull'autofagia nel cuore di ratto e nelle cellule HUASMC: per il primo modello verranno riportati i risultati dei western blot per le proteine beclin-1, per la proteina Mammalian Target of Rapamycin (mTOR), la proteina Light Chain-Associated Protein 3 (LC3) (l'anticorpo utilizzato riconosce entrambe le forme della proteina: la citosolica inattiva e la forma coniugata alla membrana dell'autofagolisosoma), tre proteine housekeeping quali α -Actina, β -tubulina e gliceraldeide 3-fosfato deidrogenasi (GAPDH) e le determinazioni dei livelli di malonildialdeide (MDA) e delle proteine carbonilate (marker di stress ossidativo a livello lipidico e proteico rispettivamente).

I risultati indicano l'esistenza di una differenza di genere nel processo autofagico che risulta più spinto nei cuori maschili a causa, probabilmente, di un meccanismo non dipendente da mTOR. Nei cuori maschili ritroviamo inoltre un maggior stress ossidativo a carico delle proteine cellulari: ciò suggerisce che il maggior livello di stress ossidativo si riflette in una maggiore attivazione del processo autofagico. È stato anche analizzato il livello di espressione della proteina lisosomiale Lisosomal Associated Membrane Protein (LAMP-1).

La metodica di isolamento delle HUASMC qui descritta è stata modificata nel nostro laboratorio. Anche per questo modello sperimentale è stato necessario includere la

caratterizzazione delle proteine housekeeping (problema non di poco conto nella Medicina di Genere [1]). I risultati dello studio sull'autofagia su questo modello cellulare rivelano l'esistenza di alcune differenze legate al sesso sia nell'entità che nella regolazione del suddetto processo. Sono state inoltre incluse alcune interessanti correlazioni fra l'autofagia e alcuni parametri del neonato e della madre.

Introduzione

I concetti di Sesso e Genere

L'approccio alla Medicina di Genere richiede una breve premessa terminologica per illustrare i lemmi specifici della disciplina che, entrati a far parte di un lessico comune e di uso quotidiano, sono massicciamente soggetti a fraintendimenti.

Il termine **sesso** indica la dimensione strettamente correlata alla biologia: esso rimanda ai cromosomi sessuali, alla regolazione genica degli autosomi, ai livelli ormonali di un individuo, alla presenza di genitali esterni, alle differenze nella composizione corporea ecc. Nonostante questa differenza nel sesso si rifletta nei fenotipi “maschio” e “femmina” è comunque doveroso precisare, senza entrare troppo nel dettaglio, che il corredo cromosomico non in tutti i casi produce un fenotipo corrispondente. Nella sindrome di insensibilità agli androgeni (conosciuta precedentemente come sindrome di Morris [2]), ad esempio, si riscontra un ampio spettro di fenotipi che, sebbene risultino cromosomicamente maschili possono risultare anatomicamente e psicologicamente femminili, distinguibili solo da alcuni tratti caratteristici dell'intensità con la quale la sindrome si manifesta: si va da un fenotipo avente genitali maschili pienamente sviluppati ma con caratteri secondari maschili scarsamente sviluppati e impossibilità nel completare la spermatogenesi, a un fenotipo assolutamente femminile ma caratterizzato dalla mancanza delle strutture riproduttive femminili avente, però, uno sviluppo somatico femminile normale, ad eccezione di un canale vaginale solitamente più corto rispetto alla media femminile. In alcuni casi si osserva un vero ermafroditismo: risultano presenti entrambe le gonadi con un genotipo molto variabile [3] (dai cromosomi X soprannumerari alle condizioni di mosaicismo).

I casi di sindrome di insensibilità agli androgeni e i casi di vero ermafroditismo sono due esempi che indicano che non solo il sesso non è sempre il corredo cromosomico di un individuo, ma che in certi casi il sesso stesso non è ben definibile come maschile o femminile; questi dati ci suggeriscono l'esistenza di un vero e proprio *continuum* tra maschile e femminile. Dobbiamo inoltre tenere presente che in alcuni casi il sesso può essere sensibile a fattori ambientali e nello specifico agli interferenti endocrini o (endocrine disruptors, in lingua inglese [4-6]). Gli endocrine disruptors sono molecole artificiali o presenti in natura che interferiscono con la fisiologica funzione ormonale; il legame di queste molecole con i recettori ormonali durante periodi critici (sviluppo prenatale, pubertà) può portare a variazioni fenotipiche importanti riguardanti allo sviluppo delle gonadi, indicando così che anche il sesso non è immutabile e non è una caratteristica dicotomica per l'uomo, avendosi la possibilità che esso possa variare nel corso della vita. L'esposizione intrauterina agli endocrine disruptors può portare, ad esempio, ad alterazioni dello sviluppo delle

gonadi, a demascolinizzazione, defemminilizzazione e alterazioni del comportamento sessuale [7].

Il termine **genere** invece, ha un significato legato all'ambiente alla cultura, ai ruoli e alla società; il genere è l'insieme delle caratteristiche fisiche, mentali, caratteriali, abitudinali, culturali e sociali che differenziano i due sessi. Esempificando ulteriormente, il genere è il sesso visto dall'ambiente. Viene da sé che il genere, essendo così dipendente dalle condizioni di vita, può variare ampiamente al variare di queste. Il genere è, per sua natura, variabile su base etnica, culturale e temporale. Nel mondo occidentale, l'identità di genere, con tutte le sfumature dovute ai fattori culturali e sociali sottostanti, coincide, nella maggior parte dei casi, con l'identità sessuale (da non confondere con l'orientamento sessuale); tuttavia esistono delle eccezioni: i **transgender** si identificano (o sono universalmente identificati, a seconda del luogo di origine e vita) con un sesso-genere che non è quello cromosomico, fisico, ormonale ecc di origine. La forza delle influenze culturali nella costruzione, nell'affermarsi e nel mantenimento dell'identità di genere, si manifesta pienamente nel cosiddetto “**terzo genere**” con figure presenti in svariate parti del globo, le quali appartengono a un genere diverso e separato dai due principali [8]. Esse possono essere uno stato intermedio fra uomo e donna (un caso noto anche nel mondo occidentale), uno stato neutro o un vero e proprio terzo genere; in alcuni casi questi individui godono del riconoscimento legale e dei diritti riservati culturalmente ai soli uomini pur essendo biologicamente donne e la loro presenza, non solo è tollerata, ma è considerata assolutamente normale nelle proprie culture, al pari degli uomini e delle donne (es: gli Hijra del sud-est asiatico i Fa'afafine delle isole Samoa ecc [9]).

Il sesso-genere è quindi il vero “obiettivo” della medicina di genere, dato che le influenze delle due parti del binomio risultano pesare entrambe sullo stato di salute. Dall'altra parte è forse ancora più chiaro come il sesso e alcune caratteristiche tipiche di esso possano favorire o sfavorire l'instaurarsi di patologie.

Data questa piccola doverosa precisazione è chiaro che una Medicina di Genere tende all'appropriatezza terapeutica per tutti i pazienti (o tutti i generi) e non possa sottrarsi dal riconoscere come cruciali e determinanti i fattori culturali e ambientali; d'altronde la definizione di stato di salute dell'OMS “*stato di completo benessere fisico, psichico e sociale e non semplice assenza di malattia* [10]” include chiaramente elementi che dipendono dalle condizioni sociali e culturali dell'uomo (inteso come *Homo sapiens*). L'obiettivo principale della Medicina di Genere è di arrivare a garantire uno stato di salute pieno non solo alle donne, come molti potrebbero pensare, ma ad entrambi i sesso-generi .

Lo scopo della Medicina di Genere, come appena illustrato, è rivolto alla cura e al mantenimento di uno stato di salute per gli uomini e le donne, tuttavia l'origine di questa disciplina è dovuta ad uno squilibrio, ad una scorretta interpretazione e ad una negazione dell'evidenza delle differenze nella concezione della donna, dal punto di

vista non solo medico, biologico e psicologico, ma anche sociale e culturale. La Medicina di Genere è, quindi, l'antidoto scientifico al cosiddetto "pregiudizio di genere".

Il pregiudizio di genere: cenni storici

Aristotele, nella *Politica*, sostiene che la donna è un essere privo di ragione che deve essere comandata. La storia di Agnodice è paradigmatica sul ruolo che la donna aveva nella Grecia antica. Infatti, essa esercitò la professione, travestita da uomo, nella civile Atene del IV secolo a.C., che proibiva gli studi medici e l'esercizio della medicina alle donne. La bravura di Agnodice suscitò molte invidie perciò fu accusata di sedurre le pazienti. Solo dopo il verdetto di colpevolezza, Agnodice si tolse la veste e rivelò la sua identità. Se pensate di essere giunti alla fine della storia vi sbagliate perché l'accusa si trasformò da "*seduzione*" ad "*esercizio abusivo della professione medica*" (Iginio I sec. a. C.).

Agnodice (Iginio I sec. a. C.) fu condotta nuovamente all'Areopago e condannata ancora una volta, allora le più autorevoli donne ateniesi riuscirono a salvare la vita di Agnodice facendo cambiare la legge per cui fu permesso alle donne di esercitare la professione medica sebbene solo su pazienti di sesso femminile. Non meraviglia che il pregiudizio di genere abbia pervaso il mondo occidentale fino a giorni nostri.

La storia ha anche cancellato molte dei nomi delle donne medico per l'egemonia maschile nel trascrivere i manoscritti con qualche rara eccezione come le *mulieres* della Scuola Medica Salernitana, scuola fondata intorno al 1000, fra le quali emerge Trotula della famiglia de Ruggiero che si occupava prevalentemente di ostetricia e che scrisse *De passionibus mulierum e De ornatu*. Un'altra eccezione è la badessa Ildegarda di Bingen, nata nel 1098, famosa fitoterapista ed oracolo; altre eccezioni nel XIV secolo sono Rebecca Guarna, autrice di testi sulle febbri, sulle orine e embrione, e la dottoressa Vidimura, moglie di Pasquale un medico famoso dell'epoca: Alessandra Ziliani da Persiceto che aiutò il famoso Mondino de'Liuzzi nelle dissezioni anatomiche. Nella stessa epoca, a Parigi, era processata e condannata Jacoba Felicia per aver esercitato la professione medica [11]. Riuscirono ad insegnare Costanza Calenda, Dorotea Bocchi e Anna Morandi (1714-1774) che inizialmente aiutò il marito Giovanni Manzolini per poi acquisire una larga fama nel campo dell'anatomia funzionale insegnando all'Università di Milano, all'Accademia di Londra ed all'Archiginnasio di Bologna [12]. Infine, fu anche nominata membro dell'Accademia Clementina e dell'Accademia delle Scienze di Bologna. Sempre a Bologna, insegnò Maria Dalle Donne (1778-1842) che dal 1804 diresse anche la Scuola di Ostetricia per levatrici [13].

Durante la rivoluzione francese fu redatta da *Olympe de Gouges* la “Dichiarazione dei Diritti delle Donne e delle Cittadine” (1791) per integrare la Dichiarazione dei diritti dell'uomo e del cittadino (1789), in cui si denuncia l'ambiguità della definizione di "uomo", quasi sempre inteso come "maschio" che come "essere umano". Tuttavia, la Dichiarazione dei Diritti delle Donne non ebbe lo stesso successo della “Dichiarazione dei diritti dell'uomo e del cittadino” anzi essa fu respinta nella convinzione che le donne si trovassero "naturalmente" in una posizione d'inferiorità. La battaglia per il riconoscimento dei diritti delle donne porta Olympe de Gouges alla ghigliottina per “*essersi dimenticata le virtù che convengono al suo sesso ed essersi immischiata nelle cose della repubblica*”. In Inghilterra, negli stessi anni, un'altra donna, Mary Wollstonecraft, pubblica “*A vindication of the rights of woman*” per chiedere la parità tra i sessi sottolineando che le donne devono ricevere un'educazione.

Ciò nonostante, nel XIX secolo, appare un'altra Agnodice, James Miranda Barry, chirurgo militare nell'esercito britannico che ottenne per un certo periodo anche l'incarico di ispettore generale degli ospedali militari che per esercitare la professione dovette travestirsi da uomo. Quando, dopo la sua morte, l'autopsia rivela che è una donna, il Ministero della Guerra e l'Associazione medica rimangono così sconcertati e imbarazzati tanto che decidono di tener segreta la loro scoperta e il dott. Barry viene sepolto ufficialmente come uomo [14].

Una pietra miliare per il superamento del pregiudizio di genere è la convenzione di Seneca Falls (19-20 Giugno del 1848). La prima convenzione organizzata da donne nel mondo occidentale che produce una dichiarazione per richiedere l'eguaglianza dei diritti e dei doveri fra uomo e donna. Le condizioni molte lentamente cambiano, quindi non deve meravigliare se nella seconda metà del XIX, negli USA proliferano scuole mediche private che laurearono le cosiddette “*lady doctors*” fra cui emergono Mary Putnam Jacobi, che insegnerà Farmacologia e Terapia (materia medica) al nuovo *Women's Medical College Infirmary for Women and Children* e che diventerà portavoce del movimento medico femminile diventando, anche se per un solo voto, il primo membro di sesso femminile della New York Academy of Medicine. Sempre in quel periodo, 1898, una donna Dorothy Reed Mendenhall descrive le cellule tipiche della malattia di Hodgkin che prendono il nome di Reed-Sternberg.

Paradossalmente, dall'altra parte dell'Atlantico, intorno agli anni 80 del secolo XIX, il grande chirurgo di Berlino Gustav Von Bergmann, affermando di non essere misogino, non accettava studentesse ai suoi corsi, sostenendo che le disposizioni dello statuto universitario contemplavano soltanto “*la istruzione della gioventù maschile*”. Questo dopo che nel 1869, John Stuart Mill, aveva scritto, riprendendo anche le idee della moglie Harriett Taylor, nel “*The Subjection of Women*” [15] che il diritto non poteva rendere diseguali ciò che la natura aveva fatto uguali. Poco anni dopo, Friedrich Engels scriveva “*L'origine della famiglia, della proprietà privata e dello Stato*” (1884) [16] dove evidenzia che la famiglia (divenuta stabile e

monogamica in parallelo con l'introduzione della proprietà privata) è il sistema di controllo dell'uomo sulla donna. Solo dopo la seconda guerra mondiale, nel 1948 arriva la *Dichiarazione Universale dei Diritti dell'Uomo* che vieta ogni forma di discriminazione sulla base del sesso [17].

Nel 1979, sotto la spinta della seconda del pensiero femminista, il cosiddetto "*femminismo della differenza*", ha luogo la *Convenzione sull'eliminazione di ogni discriminazione verso le donne* (CEDAW) che impegna gli Stati a garantire la parità dei diritti tra uomini. Solo dopo questa conferenza, intorno al 1990-1995, nasce negli Stati Uniti la medicina di genere. Arrivano poi le raccomandazioni da parte di molte organizzazioni internazionali come l'Unione Europea (2000), il Parlamento Europeo, l'Organizzazione Mondiale della Sanità ecc.

Questa lunga premessa era necessaria, per evidenziare quanto sia stato difficile arrivare ad affermare il concetto che non vi devono essere discriminazioni basate sul sesso e genere e che le differenze possono costituire invece un'ulteriore ricchezza. Purtroppo, questo pregiudizio ha portato ad una situazione che ancora oggi origina dei gap di solito più svantaggiosi per le donne; tuttavia in alcuni casi lo svantaggio è maschile (emicrania, osteoporosi, carcinoma mammario ecc).

Il pregiudizio di genere non ha reso possibile arrivare alla conclusione che uomini e donne non sono uguali e che le malattie che non riguardano gli organi riproduttivi differiscono profondamente fra uomo e donna. La diretta conseguenza di questo atteggiamento culturale e scientifico è la medicina androcentrica, una medicina basata su un individuo maschio, bianco e avente una costituzione fisica definibile come media; da questo punto di partenza si è proseguito estendendo le cure che ne sono derivate alle donne, senza contare che molte delle differenze esistenti fra i due sessi le avrebbero potute rendere, nel migliore dei casi, meno funzionali. Nel prossimo capitolo verranno introdotte brevemente alcune di queste differenze.

Il riconoscimento delle differenze

Le differenze di Sesso-Genere (DSG), in ambito biologico, sono molteplici e coinvolgono diversi tessuti e diversi organi. Il mancato riconoscimento delle differenze biologiche ha portato e porta, ad esempio, ad un minor grado di appropriatezza della cura, in quanto già le differenze fisiche fra uomo e donna si riflettono pesantemente sulla farmacocinetica di alcuni farmaci [18]. Visto che la presente tesi di dottorato si occuperà di alcuni aspetti del sistema cardiovascolare, riportiamo solamente alcune delle molteplici differenze relative a questo apparato.

L'apparato cardiovascolare è nettamente duale; le malattie cardiovascolari sono la maggiore causa di morte per entrambi i sessi in tutte le società occidentali ma un maggior numero di donne muore per queste patologie rispetto agli uomini [19]. Esistono importanti differenze nella frequenza e nei meccanismi alla base di queste malattie e anche alcuni fattori di rischio pesano diversamente nei due sessi: diabete e ipertensione ad esempio sono più dannosi per le donne che per gli uomini [20]. Citiamo di seguito solo alcune delle numerose patologie cardiovascolari che mostrano significative differenze di sesso-genere; un elenco più lungo richiederebbe, infatti, molto più spazio. Un'ampia trattazione si può ritrovare in [21].

- L'insufficienza cardiaca è essenzialmente dimorfa. Infatti, nelle donne è più frequente il mantenimento della funzione sistolica rispetto ai maschi [22], anche se esse mostrano una mortalità superiore (probabilmente a causa della superiore aspettativa di vita [19]).
- La prevalenza di fibrillazione atriale è inferiore nelle donne [23].
- Le donne sviluppano malattia coronarica 10 anni dopo gli uomini e possono presentare una sintomatologia diversa, esiti diversi, avendosi una maggiore mortalità delle donne rispetto agli uomini [24, 25].

Le cause di queste differenze vanno ricercate nella diversa attività di alcuni pathway molecolari; fra essi hanno una notevole importanza i pathway legati alla funzione degli estrogeni [24, 25], alla via PI3K/AKT [26], la via dell'ossido nitrico [27], la via delle MAPK [28] e le vie di trasduzione del segnale legate alle citochine pro-infiammatorie [29] [30]. Sono state descritte importanti differenze anche a carico del sistema delle metalloproteasi [31].

Macroautofagia

Con il termine macroautofagia si indica un processo di degradazione di un'ampia varietà di costituenti cellulari che la cellula generalmente mantiene costitutivamente attivo per evitare l'accumulo di componenti danneggiati potenzialmente dannosi e per sostenere il proprio fabbisogno metabolico; la macroautofagia, di qui in avanti nominata solamente autofagia, è un'essenziale fonte di metaboliti energetici, derivanti dal catabolismo dei componenti substrati di questo processo [32-35]. L'autofagia è quindi un processo volto a mantenere l'omeostasi cellulare riciclando continuamente proteine e organelli che verranno riciclati o utilizzati come substrati per reazioni cataboliche in condizioni di digiuno. Un aspetto importante dell'autofagia riguarda appunto il ruolo di questo processo nelle situazioni di digiuno cellulare: l'apparato autofagico è, infatti, implicato nella degradazione di glicogeno (glicogenofagia) [36] e delle gocce lipidiche (lipofagia) [37]. L'autofagia è generalmente sempre attiva nelle cellule, proprio per la sua funzione di guardiano della qualità (autofagia basale), tuttavia l'intensità del processo può aumentare notevolmente in particolari condizioni quali [38]:

- Carenza dei nutrienti e aumento del rapporto AMP/ATP
- Carenza di fattori di crescita/insulina
- Stress del reticolo endoplasmatico
- Stress ossidativo
- Ipossia
- Infezioni da parte di patogeni

Disfunzioni del processo autofagico contribuiscono all'instaurarsi e alla progressione di alcune malattie: disfunzioni di questo processo si riscontrano nelle patologie cardiovascolari, nei tumori, nelle patologie neurodegenerative, nelle infezioni microbiche, in alcune malattie autoimmuni ecc [39].

I passi salienti del processo autofagico consistono nella formazione di una struttura a doppia membrana che origina probabilmente dal reticolo endoplasmatico (anche se sono stati descritti coinvolgimenti dei mitocondri, dell'apparato di Golgi e della membrana plasmatica [32]) chiamata autofagosoma; questa struttura si chiude su porzioni citoplasmatiche contenenti proteine e organelli. Una volta che l'autofagosoma è maturo e contiene proteine e organelli cellulari si fonderà con un lisosoma e avverrà la digestione del materiale internalizzato.

Il controllo del processo autofagico è regolato a diversi livelli gerarchici in parte indipendenti fra essi; uno dei principali regolatori del processo autofagico è il complesso mTORC1 [40, 41]. Questo complesso è composto da 5 subunità (Fig.1): mTOR (mammalian target of rapamycin), Raptor (regulatory-associated protein of mTOR), mLST8 (mammalian lethal with Sec13 protein 8), PRAS40 (proline-rich

AKT substrate 40 kDa) e Deptor (DEP-domain-containing mTOR-interacting protein) [42].

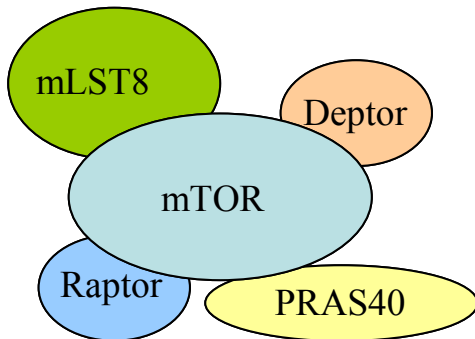


Fig.1 Il complesso mTORC1

La proteina mTOR è una serina/treonina protein chinasi che viene inibita dalla rapamicina tramite l'interazione con la proteina FKBP12 [40, 43]. Il ruolo di mTOR nel complesso mTORC1 è centrale in quanto essa fosforila diverse proteine e diversi complessi che svolgono una moltitudine di processi cellulari [44]; mTORC1 infatti è un *hub* fondamentale di svariati signaling [40]. In particolare, mTOR occupa una posizione centrale nel pathway autofagico [45] (Fig. 2). Su questa protein kinasi, che regola l'inibizione e l'induzione dell'autofagia convergono la via PI3K/AKT che è responsabile dell'attivazione di mTOR mediante processi di fosforilazione sulla serina 2448. mTOR fosforilata attiva il complesso ULK-1, il quale una volta attivato si localizza sul reticolo endoplasmatico rugoso [46]. Quest'ultimo complesso è composto da quattro proteine: ULK1 (Unc-51-like kinase 1), FIP200 (the focal adhesion kinase family-interacting protein of 200 kD) ATG13 e ATG101 (Autophagy related gene 13, 101) [47]; ULK-1 in condizioni di induzione di autofagia fosforila un altro complesso multiproteico, il complesso fosfatidylinositol 3-kinase (PtdIns3K) di classe III; questo complesso è il responsabile della formazione della struttura pre-autofagosomale ed è composto da diverse proteine: Vps34 (vacuolar protein sorting), Vps 15 (una serina/treonina protein chinasi), Barkor (o mAtg14) e Beclin-1 [48]. Quest'ultima è ritenuta di grande importanza per la formazione dell'autofagolisosoma, nonostante ciò sono descritte vie autofagiche che non dipendono da questa proteina [49, 50]

Questo complesso multiproteico genera fosfatidil 3-fosfato che serve da aggancio per alcuni complessi proteici responsabili della formazione iniziale delle membrana dell'autofagosoma e del suo allungamento; fra essi si ritrovano dei complessi proteici con proprietà di coniugazione simile all'ubiquitina (ubiquitin-like –Ubl- conjugation

systems); le proteine costitutive di questi complessi sono note come ATG proteins (autophagy related genes). I due complessi ATG più importanti sono costituiti dal complesso Atg12-Atg5-Atg16 e dal complesso LC3-PE [51, 52]. Il secondo complesso è particolarmente importante per la formazione dell'autofagosoma e per il rilevamento dell'attività autofagica mediante metodiche biochimiche ed è costituito dalla proteina LC3; questa subisce un primo taglio idrolitico da parte della proteasi ATG4 [53] e successivamente subisce prima una coniugazione con ATG7 e ATG3 e dopo una coniugazione con fosfatidiletanolamina (PE) che le consente l'ancoraggio alla membrana dell'autofagosoma ormai maturo (Fig 3) [54, 55]. Una volta completata la formazione dell'autofagosoma, la fusione con il lisosoma avviene grazie alle proteine LAMP-2 (Lysosomal associated protein 2) e alla Small GTPase R [42].

Il complesso mTORC1 non è l'unico responsabile della regolazione e induzione del processo autofagico; partecipano infatti anche:

- Il pathway delle eIF2 α chinasi [56]
- Il pathway delle PERK (protein kinase R-like endoplasmic reticulum kinase) [56]
- Il pathway delle MAPK (P38, ERK 1/2) [57]
- Le c-Jun N-Terminal Kinases [58]
- Il pathway della PKC [59]
- Il calcio intracellulare [60, 61]
- Lo stress ossidativo [53, 62-64]

Gli ultimi due meccanismi hanno una grande importanza: il primo opera attraverso la mobilitazione del calcio dal reticolo endoplasmatico tramite l'inositolo 3-fosfato e la successiva interazione con CaMKK β e AMPK. Il secondo meccanismo invece coinvolge direttamente la proteina Atg4, responsabile del taglio iniziale di LC3 e anche del suo successivo recupero. L'ossidazione (perossido d'idrogeno dipendente) di un residuo di cisteina (cys81) posto nelle vicinanze del sito catalitico di Atg4, determina l'attivazione della via di LC3.

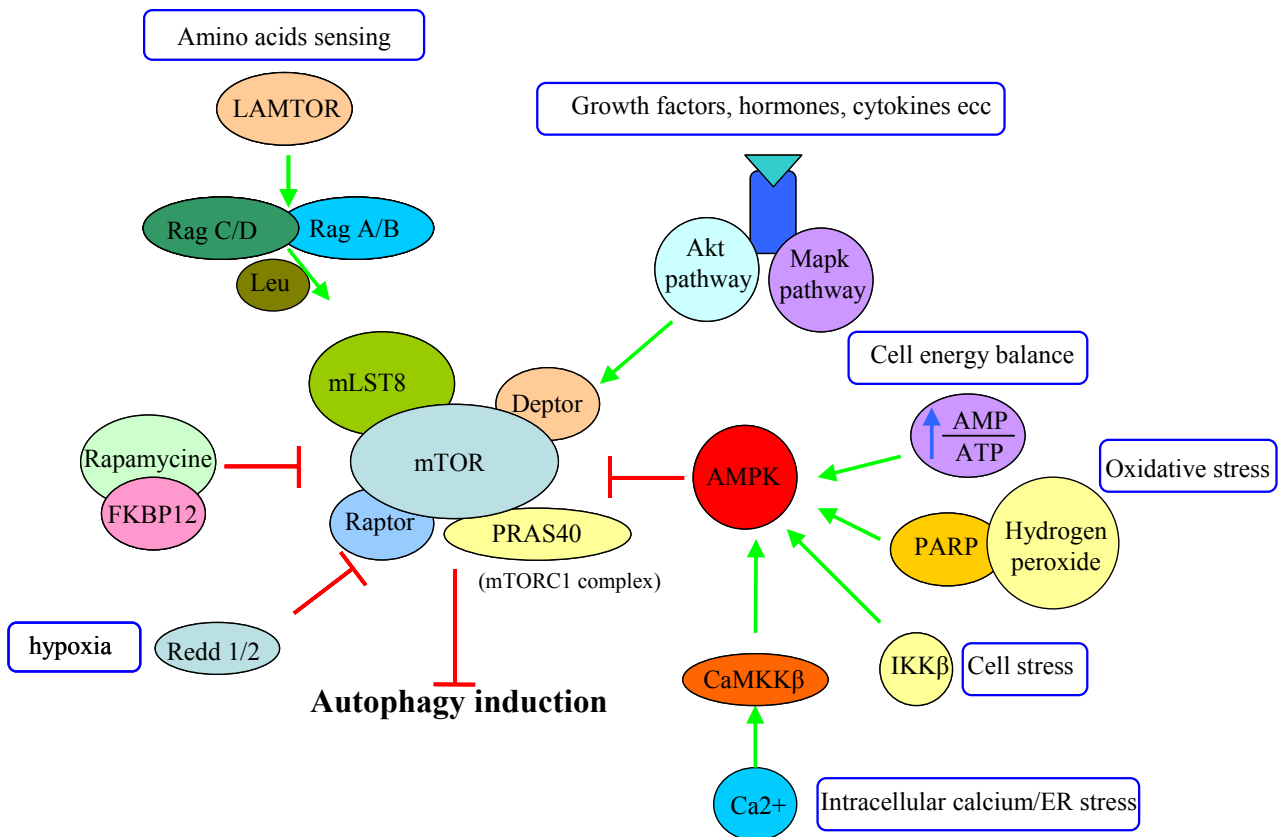


Fig.2 I principali segnali upstream ad mTORC1. I fattori racchiusi nei rettangoli dal bordo azzurro rappresentano i diversi fattori intra ed extra cellulari che regolano l'attività del complesso. I segnali provenienti da sistemi di sensing del bilancio energetico e della disponibilità di amminoacidi rivestono una grande importanza nella regolazione di mTORC1. Per semplicità alcune vie metaboliche non sono state riportate nella loro interezza.

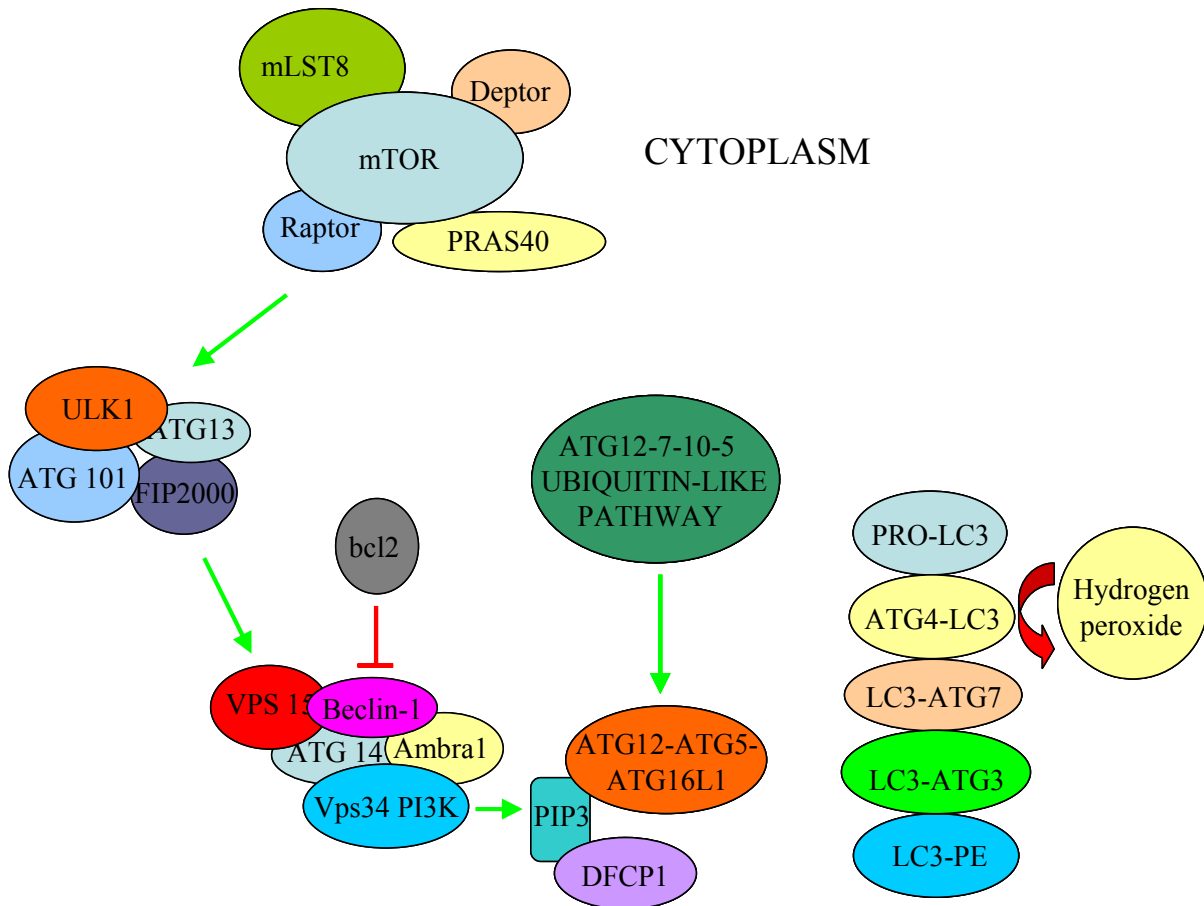


Fig.3 Complessi multiproteici coinvolti nell'induzione (mTORC1), formazione (ULK-1 complex, Beclin-1/Vps34 PI3K) allungamento e chiusura dell'autofagosoma (Atg, LC3). La localizzazione di mTORC1 è citoplasmatica, gli altri complessi, una volta attivati si localizzano sul reticolo endoplasmatico.

Differenze di sesso-genere nella macroautofagia a livello cellulare

Pochi studi hanno indagato le differenze di sesso-genere nella macroautofagia [39]. Uno studio, effettuato sulle cellule muscolari lisce isolate dalle aorte di ratto, mostra che, in seguito ad irraggiamento con raggi UV, le cellule ottenute da animali maschi vanno incontro ad apoptosi mentre le cellule donate da animali di sesso femminile vanno incontro a processi autofagici [65]. Gli autori ipotizzano che la maggiore autofagia rilevata nelle femmine costituisca un meccanismo di protezione verso la morte cellulare per apoptosi. Nelle colture cellulari di neuroni di ratto si rileva invece il fenomeno opposto: i neuroni maschili, in condizioni di starvation vanno incontro a una maggiore autofagia che culmina con la morte cellulare; anche in questo caso, gli autori concludono ipotizzando che le cellule femminili sopravvivano meglio delle maschili [66]. Simili risultati sono stati ottenuti su colture di fibroblasti embrionali, con l'unica differenza che l'inibizione dell'autofagia mediante siRNA causa un aumento della mortalità cellulare anziché una diminuzione; gli autori concludono che la regolazione del processo autofagico è sesso e organo specifica [66], confermando quanto riscontrato dal nostro gruppo [1].

Macroautofagia e apparato cardiovascolare: cuore e muscolo liscio vasale

Il processo autofagico è stato rilevato nel cuore già dai primi anni dopo la sua scoperta: nel 1970 Sybers et al. [67] rilevarono la presenza di autofagolisosomi nei cuori di ratto tenuti su griglie di metallo immerse in terreno e notarono che la presenza di questi ultimi aumentava se i cuori venivano mantenuti in condizione di deprivazione di ossigeno e glucosio.

Si discute sul ruolo dell'autofagia a livello del cuore dove sembra avere un ruolo in varie forme di stress, partecipando all'omeostasi dell'organo e favorendo il riciclo delle sue strutture [68]. Tuttavia, un'eccessiva autofagia potrebbe essere dannosa per il cuore in corso di riperfusione [69] e di rimodellamento [70]. Al momento attuale i dati disponibili non permettono di comprendere se i processi autofagici rivestano un ruolo protettivo o dannoso a livello cardiaco [71]. Quello che appare certo è che l'autofagia è promossa da molteplici patologie cardiache [72]; tuttavia, nel cuore sano essa è fondamentale per rimuovere le proteine aberranti [73] e organuli cellulari quali i mitocondri; taluni autori suggeriscono che questo sia un meccanismo adattivo in corso di ischemia/riperfusione [74] anche se l'inibizione della autofagia in corso di riperfusione porta ad una riduzione dell'area infartuale ed apoptosi dei cardiomiociti con meccanismi che coinvolgono la beclina-1 (74). Ad esempio, la distruzione eterozigote del gene che codifica Beclin-1 riduce l'autofagia cardiaca e il rimodellamento patologico mentre una sua overespressione lo aumenta [70]. Gli stessi effetti si ritrovano in topi portatori di un transgene di mTOR inattivo a livello cardiaco [75]. Infine, l'autofagia cardiaca risulta estremamente importante anche per

evitare i danni causati da una stimolazione β adrenergica troppo intensa e da ischemia [76].

Le cellule muscolari lisce dei vasi arteriosi (VSMC vascular smooth muscle cells) rivestono un ruolo di grande importanza nella genesi e nella progressione clinica di alcune patologie. Nell'aterosclerosi ciò avviene tramite molteplici meccanismi [77-87]. Il danno aterosclerotico delle VSMC è legato alla loro natura intrinsecamente plastica: queste cellule possono passare da un fenotipo detto *contrattile*, caratterizzato dall'espressione di geni implicati nella contrazione, ad un fenotipo detto *sintetico* che è più orientato verso la replicazione, la deposizione di materiale extracellulare e la migrazione [88] [89].

In particolare, le cellule muscolari partecipano alla progressione del danno aterosclerotico attraverso la migrazione e la proliferazione nella tonaca intima. In questa sede partecipano attivamente all'accumulo di LDL ossidate e altri componenti (microparticelle derivate da cellule apoptotiche o piastrine, particelle di ferro, globuli rossi degenerati, colesterolo libero ecc) diventando anch'esse cellule schiumose [79-82]. L'autofagia delle cellule muscolari ha un ruolo ampiamente protettivo in diverse condizioni fisiologiche e patologiche e le implicazioni di questo processo a livello di tessuto e di organo sono ancora in fase di studio: è provato che essa garantisce la stabilità del fenotipo contrattile, la stabilità meccanica della placca ateromatosa e la clearance di svariate molecole implicate nella genesi del danno aterosclerotico [90-95]. Così come nel cuore, anche per le cellule muscolari lisce dei vasi, l'autofagia è un meccanismo fondamentale per l'omeostasi [96].

MATERIALI E METODI

Reperimento e selezione dei cordoni ombelicali

I cordoni ombelicali sono stati forniti dalla Clinica di Ostetricia e Ginecologia dell'Azienda Ospedaliero-Universitaria di Sassari. Di tutte le partorienti venivano raccolti i dati riportati in tabella 1. Sono stati inclusi solo i cordoni ottenuti da nascite a termine e per via vaginale da donne di razza caucasica sane non fumatrici, non obese e non soggette a trattamenti farmacologici, con la sola esclusione di composti a base di ferro ed acido folico. La presenza di diabete gestazionale e di altre patologie in corso era motivo di esclusione nello studio. Inoltre, il peso del neonato doveva essere compreso nel range di riferimento ottenuto utilizzando le Ines Charts (www.inescharts.com); queste riportano i range di peso per neonati maschi (range kg 2,557- 4,191) e femmine (range kg 2,430-4,046) nati dalla 37esima settimana compiuta alla 42esima.

Le donatrici hanno fornito un consenso informato, in accordo alla dichiarazione di Helsinki.

Prelievo N°:	Data e ora nascita:.....
Sesso neonato:	Fumatrice:.....
Peso neonato:	Peso madre:.....
Tipo gravidanza:	Madre obesa:.....
Tipo parto:	Diabete Gestazionale:.....
Età madre:	Farmaci:.....
Razza madre:	Patologie in corso:.....

Tab.1 Questionario somministrato al momento dell'arruolamento

Isolamento e coltura delle HUASMC

La procedura di isolamento delle HUASMC [97] è stata da noi parzialmente modificata. In breve il cordone è stato aperto longitudinalmente con delle forbici chirurgiche, seguendo il lume della vena; questa operazione rende più facile la successiva estrazione delle arterie dalla gelatina di Wharton. Le arterie, una volta dissezionate, sono state adagiate in una capsula di Petri contenente PBS sterile (Sigma-Aldrich, Saint Louis, USA) ed il tessuto connettivo circostante viene delicatamente rimosso così come il sangue coagulato presente all'interno delle arterie. Successivamente, queste sono state incubate in una soluzione contenente 80U/ml di collagenasi di *Clostridium histoliticum* (Sigma-Aldrich, Saint Louis, USA) in DMEM medium con Glutamax (Gibco).

L'incubazione è stata portata avanti a 37° C in un bagnetto termostato per un'ora, agitando occasionalmente le arterie nella soluzione di collagenasi. Successivamente le arterie e il medium di incubazione sono stati trasferiti in una capsula di Petri nella quale si aggiunge del PBS sterile. Le arterie sono state ulteriormente dissezionate in modo da rimuovere la componente connettivale, lasciando intatta la tonaca intima. I frammenti di arteria e il medium di incubazione sono stati poi trasferiti in una provetta da 50ml di volume e, quando necessario, è stato aggiunto altro PBS fino ad occupare quasi tutto il volume disponibile. La provetta è stata tenuta in agitazione per pochi secondi in modo da favorire il distacco delle cellule muscolari. I frammenti di arteria sono stati separati dal medium liquido mediante sedimentazione e successivamente scartati. La sospensione cellulare è stata successivamente aliquotata in due provette alle quali si aggiunge PBS in quantità tale da arrivare a 50 ml di volume. Dopo questo passaggio è seguita una centrifugazione a 2500 rpm per 15 min, e subito dopo il surnatante è stato aspirato e scartato; il pellet, invece, è stato risospeso in 15 ml di medium DMEM con glutamax contenente il 20% di FBS, (Sigma-Aldrich, Saint Louis, USA) e una soluzione all'1% di antibiotico/antimicotico (Sigma-Aldrich, Saint Louis, USA), per essere poi seminato in flask sul fondo delle quali è stato preparato un coating di gelatina (Sigma-Aldrich, Saint Louis, USA; 1% in PBS, lasciata per 10' e rimossa). Le flask sono mantenute in incubatore per 6 giorni a 37°C in atmosfera addizionata di anidride carbonica al 5%. Passato questo periodo di tempo le flask sono state delicatamente pulite con del PBS e il medium è stato cambiato. Quest'ultimo è stato cambiato ogni due giorni fino al raggiungimento della confluenza, dopo la quale le cellule vengono tripsinizzate e seminate su superfici adeguate.

Al microscopio le cellule appaiono lunghe e sottili con un rigonfiamento centrale in corrispondenza del nucleo (Fig 4 e 5); dopo il primo lavaggio e cambio di terreno solitamente si presentano per lo più sparse con qualche piccolo raggruppamento contenente cellule organizzate in fasci. Durante i giorni successivi le cellule proliferano e si espandono su tutta la superficie della flask disponendosi in una

configurazione caratterizzata dalla presenza di molteplici fasci costituiti da un gran numero di cellule disposte in parallelo. Questi fasci spesso decorrono paralleli tra loro, intervallati solo da piccoli strati non organizzati. L'analisi in immunofluorescenza rivela positività per l'alfa-actina del muscolo liscio, e ci consente di attestare la natura contrattile del fenotipo cellulare (Fig. 6).



Fig.4 Fotografie al microscopio ottico di cellule HUASMC maschili e femminili a diversi giorni di coltura. Si nota la disposizione in fasci assunta a 14 e 16 giorni.

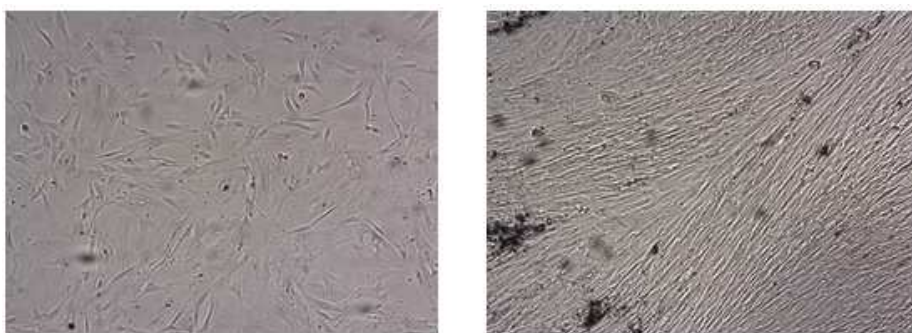


Fig.5 Fotografie al microscopio ottico di cellule HUASMC diverso grado di confluenza. Nel pannello di sinistra si osserva la forma allungata delle cellule e si coglie il rigonfiamento centrale causato dal nucleo. Nel pannello di destra si osserva l'organizzazione in fasci.

Caratterizzazione delle HUASMC mediante immunofluorescenza

Le cellule sono state seminate ad una densità di 35000/cm² in chamber slide e lasciate aderire overnight. Successivamente sono state lavate due volte con PBS e fissate con paraformaldeide (PFA) al 4% in PBS per 15 minuti a temperatura ambiente. Dopo un ulteriore lavaggio, le cellule sono state fissate in metanolo per un minuto, sempre a temperatura ambiente. Questo passaggio facilita la permeabilizzazione. Le cellule sono state ulteriormente lavate con PBS e successivamente trattate con una blocking solution costituita da PBS con BSA al 4% e 0.1% Triton X-100 per 10 minuti; successivamente le cellule sono state incubate con un anticorpo, specifico per l'alfa-actina del muscolo liscio (cell signaling USA) diluito 1:400 in soluzione di blocco, per un'ora, a temperatura ambiente. Dopo due lavaggi con PBS si è proceduto all'incubazione al buio per 30 min con l'anticorpo secondario (1:100). Infine, il layer cellulare è stato lavato con PBS e incubato con DAPI (Sigma-Aldrich, USA) 1µg/ml per colorare i nuclei cellulari. Dopo un lavaggio finale sono state rimosse le pareti della chamber slide ed è stato disposto un vetrino coprioggetto. La figura 6 mostra l'immunocaratterizzazione delle HUASMC maschili e femminili.

I filamenti di smooth muscle α -Actin sono ben visibili in verde e confermano la natura muscolare e il fenotipo contrattile delle cellule: la proteina alpha smooth muscle α -Actin è, infatti, un marker utilizzato per la caratterizzazione delle cellule contrattili [88]. I nuclei sono colorati in blu con DAPI; si nota nelle immagini al microscopio ottico la configurazione in fasci delle cellule: Si tratta di cellule ad alto grado di confluenza che compattandosi richiamano la microanatomia del muscolo liscio. In base alla morfologia e all'immunofluorescenza riteniamo che il nostro metodo consenta l'isolamento di cellule muscolari lisce che mantengono immutato il loro fenotipo di tipo contrattile.

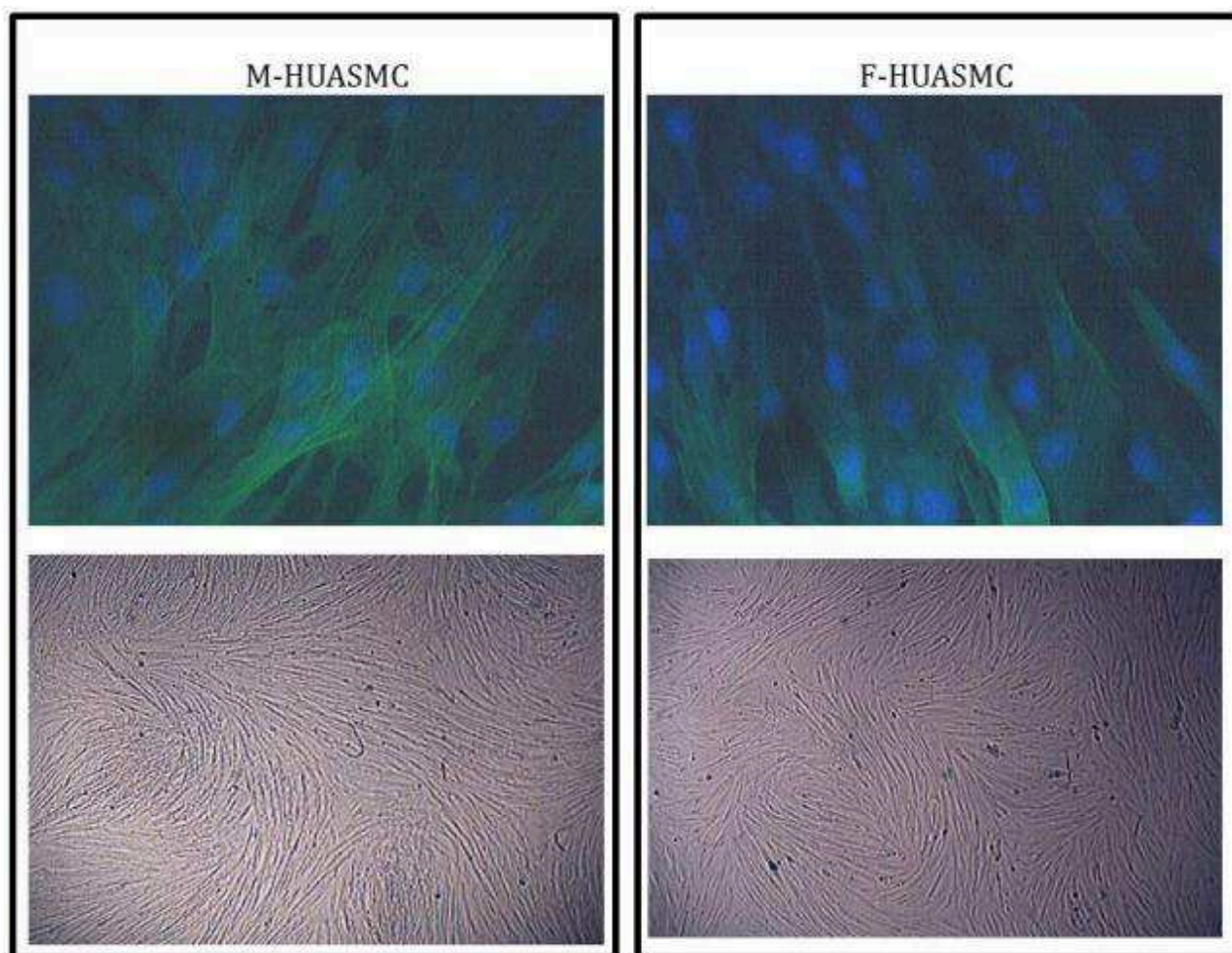


Fig. 6 Un tipico esempio di immunocaratterizzazione di un campione di HUASMC ottenute da cordoni di neonati di sesso maschile e femminile (sopra)

Condizioni sperimentali

Gli esperimenti sono stati condotti su cellule da passaggio 1 a passaggio 3. Gli esperimenti sono stati condotti in condizioni basali al fine di studiare l'entità e la regolazione del processo autofagico delle HUASMC e le eventuali differenze di genere. Inoltre sono stati condotti anche esperimenti nei quali l'autofagia veniva stimolata mediante serum starvation per 24h e da rapamicina, un potente inibitore di mTORC1 e induttore di autofagia [40, 43]. L'incubazione con rapamicina è stata portata avanti per 24h alle concentrazioni di 10, 100 e 250 nmol/l in normale terreno di coltura DMEM 20% FBS, 1% antibiotico/antimicotico.

Lisi cellulare e Western Blot

Le cellule, raggiunto il time-point stabilito, sono state lavate due volte con PBS e lisate con un buffer di lisi specifico (Cell Signaling, Beverly, Massachusetts, USA) al quale è stato aggiunto PMSF ad una concentrazione finale di 1nmol/l. La concentrazione proteica è stata determinata mediante il kit BCA protein assay della Thermo Scientific (Waltham, Massachusetts, USA).

I lisati cellulari sono stati conservati a -80°C e usati entro due settimane. 50 μg di proteine sono stati caricati per ogni western blot e trasferiti su membrane di PVDF, successivamente bloccate con skim milk powder al 5% o con bovin serum albumin (BSA) al 5% in TBST (150 mM NaCl, 20 mM Tris-HCl, pH 7.2). Le membrane sono state incubate overnight con anticorpi primari diluiti nei buffer sopraccitati. Gli anticorpi utilizzati sono stati i seguenti: (α -Actin (1:1000), β -tubulin (1:1000), GAPDH (1:1000), mTOR (1:1000), PmTOR S2448 (la fosforilazione dipendente dalla via di AKT) (1:1000), Beclin-1 (1:1000) e LC3 (1:500) che riconosce entrambe le forme, LC3I and LC3II. Tutti gli anticorpi sono stati ottenuti da Cell Signaling (DBA Italia, Italy) ad eccezione di LC3 (Eppendorf Italia). Terminata l'incubazione le membrane sono state lavate 3 volte con TBST e incubate con un anticorpo secondario coniugato con perossidasi (1h, RT, 1:2000; Cell Signaling Technology, DBA Italia, Italy). La rilevazione è stata compiuta utilizzando un sistema BioRad ChemiDoc (BioRad, Italia) utilizzando il software in dotazione con lo strumento (Image Lab 4.0).

Selezione degli Housekeeping per i Western Blot

Come già evidenziato per il tessuto cardiaco di ratto si è proceduto alla selezione dell'adeguata proteina housekeeping per la normalizzazione dei western blot valutando i livelli di α -Actina, β -tubulina e GAPDH. I risultati sono mostrati nella figura sottostante (Fig. 7). Non essendoci differenze d'espressione tra le 3 housekeeping abbiamo selezionato la proteina α -Actina per le operazioni di normalizzazione.

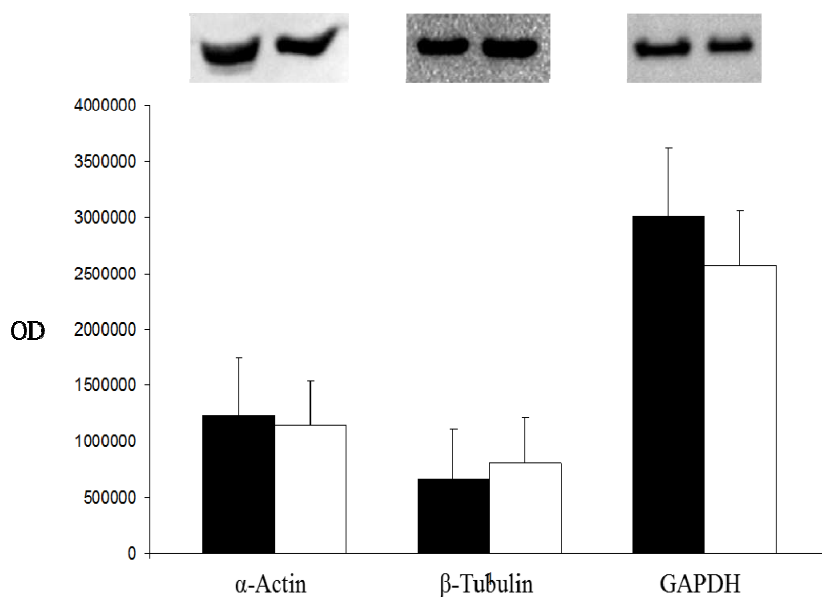


Fig.7 In alto un tipico Western blot per le housekeeping protein α -Actina, β -tubulina e GAPDH.

I valori sono espressi come medie \pm SD di almeno 10 campioni di cellule HUASMC ottenute da cordoni di neonati maschi (barra nera) e almeno 10 campioni ottenuti da cordoni di neonati femmine (barra bianca).

Animali

Ratti Sprague-Dawley maschi e femmina sono stati acquistati dalla Harlan Italia e tenuti in 2-3 per gabbia con cicli luce-buio di 12h, con disponibilità di acqua o cibo *ad libitum*. Tutte le procedure sono state effettuate in accordo con la legge italiana DL 116, 1992 e col Nationale Institute of health principles of laboratory animal care (NIH 80-33, revised 1996). I ratti sono stati sacrificati mediante decapitazione e le cavità addominale e toracica sono state aperte per prelevare reni, cuore e fegato. Questi ultimi sono stati lavati con PBS, e parti di ogni organo sono state utilizzate per applicazioni di western blot o di immunofluorescenza; per la prima applicazione gli organi sono stati pesati, omogenati in PBS e congelati a -80°C . Per l'immunofluorescenza le parti di organo sono state fissate in formalina e incluse in paraffina.

Determinazione della concentrazione della MDA

La concentrazione di MDA è stata misurata secondo il metodo di Esterbauer and Cheeseman [98], con qualche modifica. 200 μl di omogenato di tessuto sono stati addizionati ad un uguale volume di acido acetico/acqua 1:3. In seguito sono stati

aggiunti 150 μ l di sodio dodecilsolfato (SDS) al 10% al fine di precipitare le proteine e 200 μ l di Tris-HCl 50 mM. La soluzione è stata incubata per 10' a temperatura ambiente e in seguito sono stati aggiunti 500 μ l di acido tiobarbiturico (0.75% in acido acetico e NaOH 1N 1:1). La miscela è stata lasciata in incubazione per 60' a 95°C, passato questo tempo la reazione è stata spenta mettendola in ghiaccio per 10'; dopo sono stati aggiunti 400 μ l di acido acetico/acqua 1:3 e la miscela è stata centrifugata a 13.000 rpm per 20' ad una temperatura di 4°C. Il surnatante è stato utilizzato per la determinazione dell'assorbanza a 532nm e la concentrazione è stata calcolata utilizzando la retta di taratura ottenuta da 4 standard di MDA (5, 10, 25, 50 μ M).

Determinazione della concentrazione dei carbonili delle proteine

La concentrazione dei gruppi carbonilici delle proteine è stata determinata utilizzando il metodo descritto da Fagan [99], al quale sono state apportate alcune modifiche. 10 μ l di omogenato di tessuto sono stati lavati con acetone-HCl 30:1 e dopo centrifugazione il pellet è stato risospeso in 100 μ l di PBS e 900 μ l di 2,4-dinitrofenilidrazina (DNPH) (10 mM in HCl 2 N). L'incubazione in questa miscela è stata portata avanti per 60' a temperatura ambiente al buio, agitando occasionalmente la vial. I bianchi sono stati incubati con HCl 2N. Le proteine sono state precipitate con acido tricloroacetico al 20%, centrifugate 10' a 15.000 rpm a 4°C e successivamente risospese in acido tricloroacetico al 10%. In seguito sono state lavate con acetato di etile/etanolo 1:1 per rimuovere tutta la dinitrofenilidrazina non legata. Il pellet è stato risospeso in guanidina cloridrato 6M in HCl 2N ed è stata determinata l'assorbanza a 370nm. La concentrazione dei gruppi carbonilici è stata calcolata utilizzando il coefficiente di estinzione molare della DNPH ($\epsilon = 22000$) dopo aver sottratto l'assorbanza del bianco. La concentrazione dei carbonili è stata normalizzata sulla concentrazione proteica misurata come descritto in precedenza.

Microscopia in immunofluorescenza

Analisi in microscopia ad immunofluorescenza sono state effettuate sui cuori, reni e fegati; in particolare sono stati utilizzati due anticorpi, LAMP-1 e LC3. La prima è una proteina molto abbondante nei lisosomi [100], ed è coinvolta nel mantenimento dell'integrità strutturale di questo organello, la seconda è una delle proteine coinvolte nell'ultima fase della maturazione dell'autofagolisosoma (vedi intro). Sezioni di organo spesse 5 μ m sono state deparaffinizzate mediante lavaggi in xilene e reidratate tramite una serie di passaggi in etanolo. Dopo un finale lavaggio in acqua bidistillata le sezioni sono state incubate con gli anticorpi anti-LC3 (Eppendorf Italia, Milano, Italia) e anti-LAMP-1 (Santa Cruz Biotechnology, California, USA). Dopo alcune serie di lavaggi le sezioni sono state incubate con i propri anticorpi

secondari coniugati con TRITC e FITC (Sigma–Aldrich, Milano, Italia) per 30' a 37°C. I nuclei sono stati colorati con Hoechst 33258 (Sigma–Aldrich, Milano, Italia). Le sezioni sono state esaminate con un microscopio Olympus BX51 con fotocamera CDC (Carl Zeiss, Oberkochen, Germania).

Lisi dei tessuti e western blot per α -Actina, GAPDH, β -tubulina, Beclin-1, mTOR, LC3.

I frammenti di organo, prelevati dopo il sacrificio dell'animale, sono stati ripuliti, lavati con PBS e alcune parti sono state omogenate in PBS mediante l'utilizzo di un omogeneizzatore IKA Ultra-Turrax T10 Basci (IKA, Germania). La concentrazione proteica degli omogenati è stata determinata utilizzando il kit BCA protein assay della Thermo Scientific (Thermo Scientific, USA); i campioni sono stati immediatamente congelati e usati entro un mese. 80 μ g di proteine sono stati caricati per ogni western blot e trasferiti su membrane di PVDF, successivamente bloccate con slim milk powder al 5% o con BSA al 5% in TBST (150 mM NaCl, 20 mM Tris-HCl, pH 7.2). Le membrane sono state incubate overnight con anticorpi primari diluiti nei buffer sopraccitati. Gli anticorpi utilizzati sono i seguenti: α -Actina (1:1000), β -tubulina (1:1000), GAPDH (1:1000), mTOR (1:1000), Beclin-1 (1:1000) e LC3 (1:500) che riconosce entrambe le forme, LC3I and LC3II. Tutti gli anticorpi sono stati ottenuti da Cell Signaling (DBA Italia, Italy) ad eccezione di LC3 (Eppendorf Italia). Terminata l'incubazione le membrane sono state lavate 3 volte con TBST e incubate con un anticorpo secondario coniugato con perossidasi (1h, RT, 1:2000; Cell Signaling Technology, DBA Italia, Italy). La rilevazione è stata compiuta utilizzando un sistema BioRad ChemiDoc (BioRad, USA) utilizzando il software in dotazione con lo strumento (Image Lab 4.0).

La corretta selezione di proteine housekeeping è essenziale per la normalizzazione dei dati dei western blot; tuttavia negli studi di genere è importante accertarsi che i livelli di espressione delle stesse proteine housekeeping non differiscano nei due sessi poiché spesso proteine comunemente utilizzate per questo scopo mostrano livelli di espressione molto differenti a seconda dell'organo in esame [1]. Perciò abbiamo valutato alcune di tali proteine (α -Actina, GAPDH, β -tubulina).

I risultati ottenuti nei lisati cardiaci sono riportati in tabella 2. E' evidente che a livello cardiaco solo la beta β -tubulina differisce tra i generi, mentre le altre due non presentano differenze significative pertanto abbiamo selezionato la α -actina per normalizzare i risultati dei western blot.

Housekeeping Protein	Densità Ottica (UA)	Livello di significatività
α -Actin	maschi 7126,80 \pm 4067,70 femmine 6093,05 \pm 2209,79	N.S.
β -tubulin	maschi 1,46 \pm 0,16 femmine 1,28 \pm 0,14)	0,032
GAPDH	maschi 7673,64 \pm 1517,80 femmine 8339,42 \pm 3652,56	N.S.

Tabella.2 Densitometria per le proteine housekeeping α -Actina, β -tubulina e GAPDH. I valori sono espressi come media \pm SD di 8 esperimenti indipendenti.

Analisi statistica

Campioni maschili e femminili sono stati confrontati con il test-t di Student o con il Mann-Whitney rank sum test nel caso la distribuzione dei campioni non fosse stata compatibile con la distribuzione normale. Quest'ultima è stata calcolata con i test di Kolmogorov-Smirnov e Shapiro-Wilk. Per i confronti fra più di due gruppi è stato usato l'anova one-way test o il Kruskal-Wallis One Way Analysis of Variance on Ranks qualora i campioni non fossero distribuiti normalmente; in quest'ultimo caso i confronti fra i gruppi sono stati effettuati con il Dunn's test. Le correlazioni sono state effettuate utilizzando il test di Pearson per i dati distribuiti normalmente o il test di Spearman per dati non distribuiti normalmente. Valori di probabilità uguali o inferiori al 5% sono stati considerati significativi.

Risultati

Valutazione del peso degli animali

Data la difficoltà nell'ottenere ratti dello stesso peso si è preferito lavorare su animali della stessa età; il giorno precedente al sacrificio i ratti sono stati pesati e come atteso è stata riscontrata una differenza nel peso (media maschi= 223,3 ± 18,8 g, femmine= 190,0 ± 10,8g; P<0,001).

Stress ossidativo nei cuori di ratto: MDA e carbonili

La determinazione della concentrazione di MDA, un indice della perossidazione lipidica, nei cuori di ratto rivela che non esistono differenze significative legate al genere (Tab.3), invece i gruppi carbonili, un indice dell'ossidazione delle proteine risultano significativamente diversi nei cuori ottenuti da ratti maschi e femmine (P<0,011). In particolare, i livelli dei gruppi carbonilici nelle proteine nel cuore dei ratti maschi sono quasi doppio rispetto a quelli misurati nelle femmine.

Parametro	Cuore di ratto maschio	Cuore di ratto femmina
MDA(nmol/mg proteine-Dev.st)	0,36±0,09	0,37±0,08
<i>CARBONILI</i> (nmol/mg proteine-Range)	3,9 (5,1-3,2)	1,70 (3,2-0,7)*

*Tab.3 Concentrazioni di MDA (nmol/mg proteine) e carbonili (nmol/mg proteine) nei cuori maschili e femminili. I valori sono espressi come media ± SD per quanto riguarda l'MDA e come mediana e range (tra parentesi) per quanto riguarda i carbonili; i dati si riferiscono ai risultati di 8 esperimenti indipendenti condotti in duplicato. *P=0,011*

Western blot in cuori ottenuti da ratti maschi e femmina

La tabella 4 riporta i valori di densità ottica di LC3I e II per entrambi i sessi ed è evidente che non si riscontrano differenze nell'espressione di LC3I e II. Ciononostante si osserva un maggior rapporto LC3II/I nei cuori maschili (Tab.4, ultima colonna a destra), indice di un maggiore flusso autofagico. La variazione del rapporto LC3II/I si associa, nei maschi, ad una maggiore espressione della proteina Beclina-1 (Tab. 5); i dati relativi al rapporto LC3II/I e su beclina-1 suggeriscono una

maggiore entità del processo autofagico nel cuore maschile rispetto a quello femminile.

Sesso	LC3I/ α -Actin	LC3II/ α -Actin	LC3II/I Ratio
Maschi	0,10 \pm 0,08	0,15 \pm 0,11	1,73 \pm 0,60
Femmine	0,14 \pm 0,05	0,13 \pm 0,05	0,90 \pm 0,37*

*Tab.4 Analisi dei western blot sulle proteine LC3I e LC3II e del rapporto LC3II/I . I valori sono espressi come media \pm DS di 8 cuori ottenuti da 8 maschi ratti e 8 ratti femmine. * $P < 0.01$*

Sesso	Beclin-1/ α -Actin (densità ottica)
Maschi	0,31 \pm 0,28
Femmine	0,17 \pm 0,09*

*Tab.5 Analisi dei western blot sulla proteina Beclin-1 in condizioni basali. I valori sono espressi come media \pm DS, Esperimenti effettuati su 8 cuori ottenuti da 8 ratti maschi e 8 ratti femmine. * $P < 0.01$*

La proteina regolatrice mTOR è più espressa nei cuori maschili (Tab.6) mentre l'espressione della proteina lisosomiale LAMP-1 non risulta differire nei sessi (Tab.7).

Sesso	mTOR/ α -Actin (densità ottica)
Maschi	0,42 \pm 0,34
Femmine	0,35 \pm 0,13*

*Tab.6 Analisi western blot della proteina mTOR I valori sono espressi come media \pm DS di 8 campioni di cuori per ciascun sesso. * $P < 0,05$*

Sesso	Lamp-1/ α -Actin (densità ottica)
Maschi	2,89 \pm 1,46
Femmine	2,78 \pm 1,39

Tab.7 Analisi western blot della proteina Lamp-1. I valori sono espressi come media \pm DS di 8 campioni di cuori per ciascun sesso.

Immunofluorescenza su sezioni di cuori ottenuti da ratti maschi e femmina

La figura 8 mostra l'immunofluorescenza delle sezioni di cuore colorate per LAMP - 1 in rosso e per LC3 in verde ed il merging fra i due, giallo, indicante la colocalizzazione delle due proteine nella struttura autofagolisomica. Nel merge per il cuore maschile si osservano molte più strutture autofagolisomiche (punti gialli) rispetto al merge del cuore femminile, in accordo con la maggiore autofagia da noi riscontrata. Nei cuori femminili sono visibili i singoli spot gialli indicanti gli autofagolisosomi in posizione per lo più perinucleare, mentre nei maschili la densità di queste strutture è tale che tutto il citoplasma appaia giallo e quindi ricco di vescicole di degradazione autofagica.

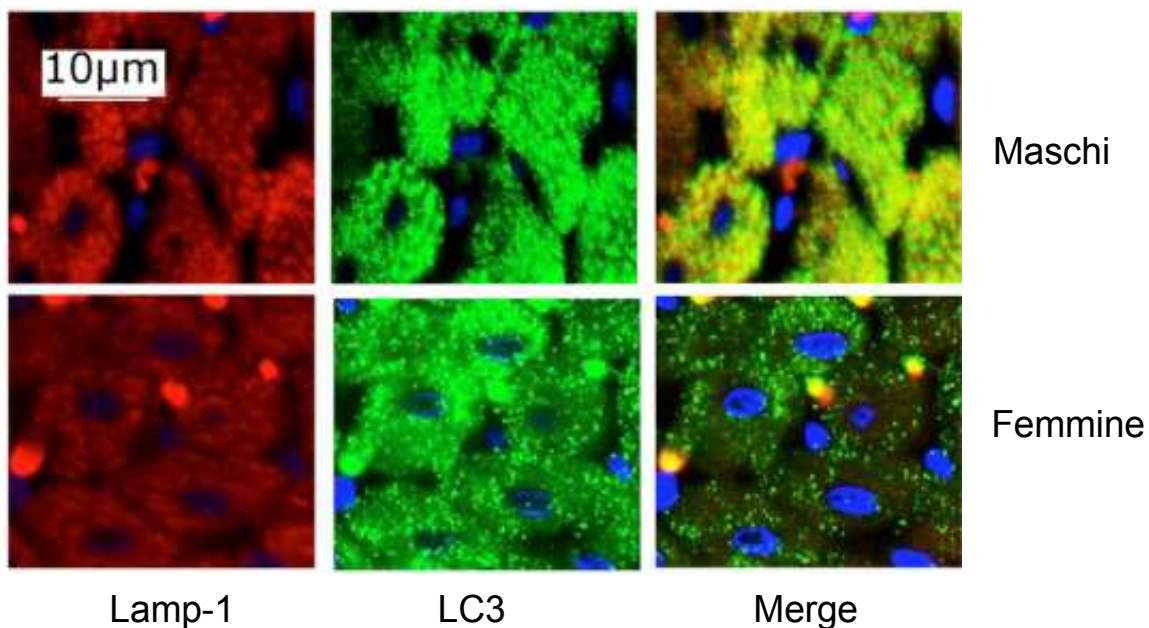


Fig.8 Tipico esperimento di Immunofluorescenza per LAMP -1 e LC3 in sezione di cuore ottenute da cuori di maschi e di femmine; nell'ultimo pannello si riporta il merge dei due colori, indicante la colocalizzazione delle due proteine (autofagolisosoma).

Peso ed età delle partorienti e peso dei neonati

Il secondo modello sperimentale da noi utilizzato è quello relativo alle cellule HUASMC maschili e femminili.

Sesso	Età madre (Anni)	Peso madre (kg)	Peso neonato (kg)
Maschi	31±9,17	67±9,34	3,36 ±0,42
Femmine	31 ±6,35	72±10,04	3,19 ±0,35

Tab.8 Età e peso delle madri e peso dei neonati; i valori sono espressi come media ± DS di 27 neonati maschi e 27 neonate femmine.

Le madri di neonati maschi e femmina hanno età e pesi comparabili (Tab.8). Sebbene i neonati femmina pesino meno dei maschi, la differenza non risulta essere significativa. L'analisi della correlazione fra i pesi delle madri e pesi dei neonati evidenzia una correlazione positiva statisticamente significativa ($P < 0,005$) per i neonati maschi (Fig. 9), mentre tale correlazione non è presente per le femmine, almeno a un livello di significatività valido (Fig.10).

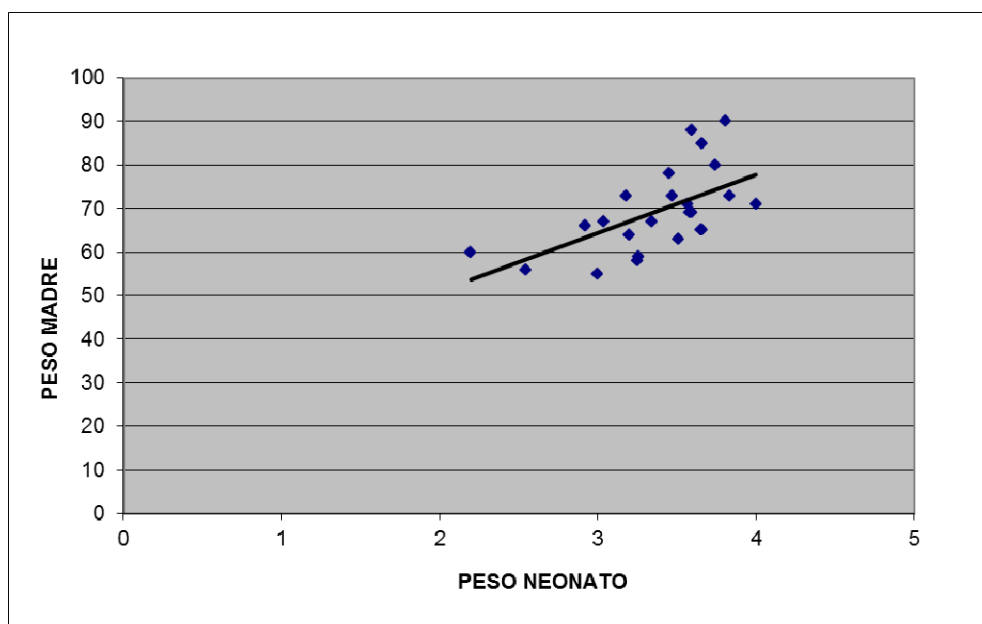


Fig. 9 Correlazione fra peso del neonato maschio e peso della madre; dati espressi in kg. N=27. $P < 0,005$

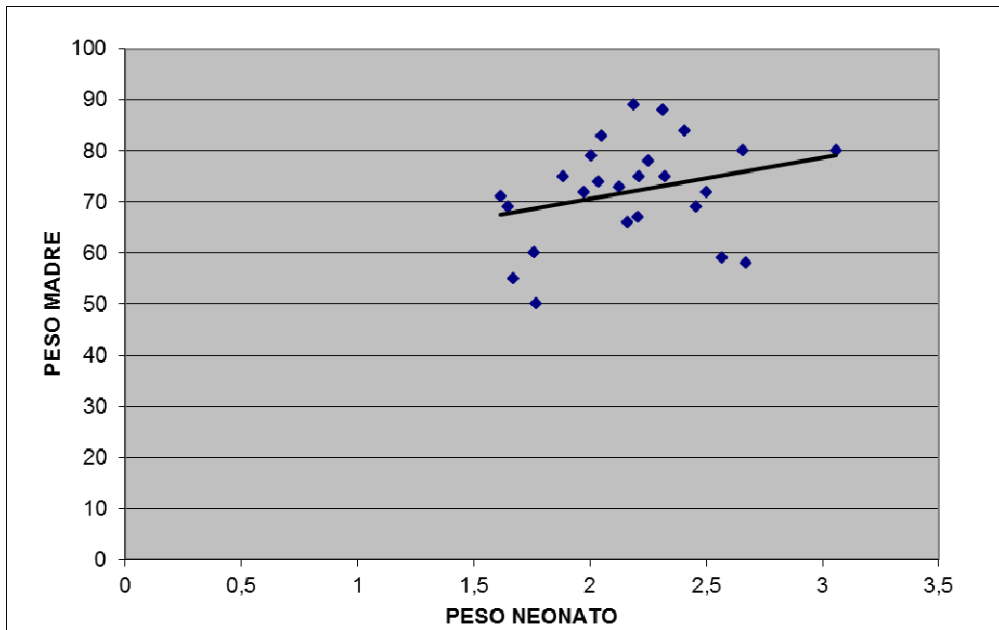


Fig. 10 Correlazione fra peso (kg) del neonato femmina e peso della madre (kg).
 $N=25$

Analisi in western blotting della proteina LC3 in condizioni basali, dopo starvation e dopo trattamento con rapamicina

Le figure 11 e 12 mostrano i risultati delle analisi in western blotting sulla proteina LC3 normalizzati per actina.

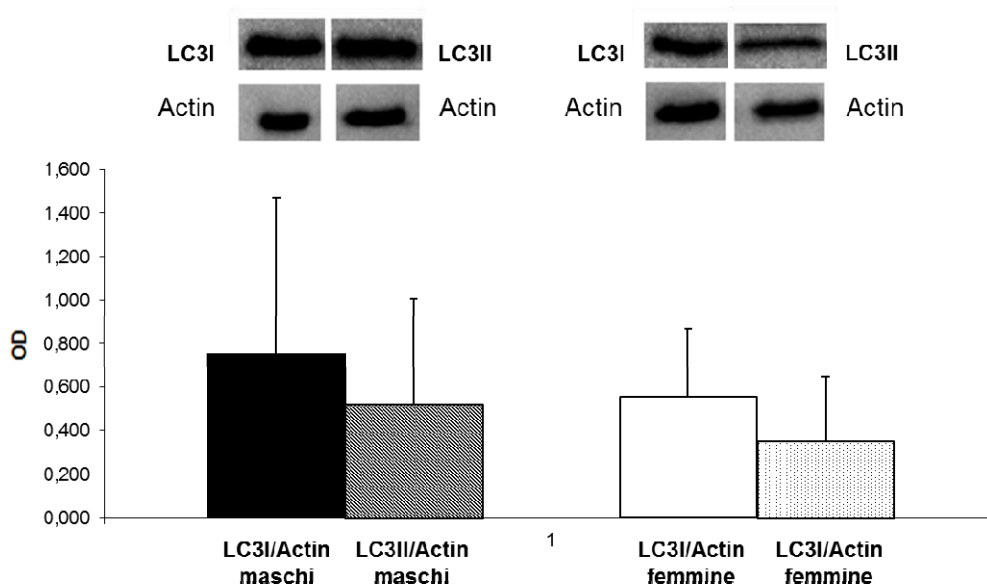


Fig.11 Analisi in western blotting dell'espressione delle proteine LC3I e LC3II in condizioni basali. Nella parte superiore sono riportate delle tipiche bande di LC3I e II e quelle di α -Actina usate per normalizzare.

I valori sono espressi come medie \pm DS di 10 campioni di cellule HUASMC ottenute da cordoni di neonati maschi (barra nera) e 10 campioni ottenuti da cordoni di neonati femmine (barra bianca).

La forma II e la forma I di LC3 non divergono significativamente nelle cellule XX e nelle cellule XY; Il rapporto tra le due forme, indice di attività autofagica, risulta invece più alto nelle cellule XX.

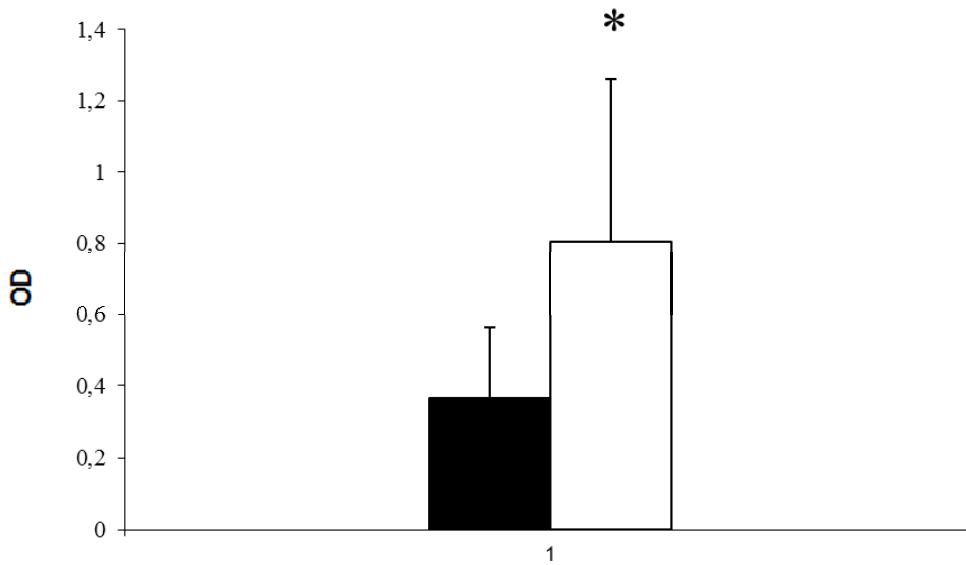
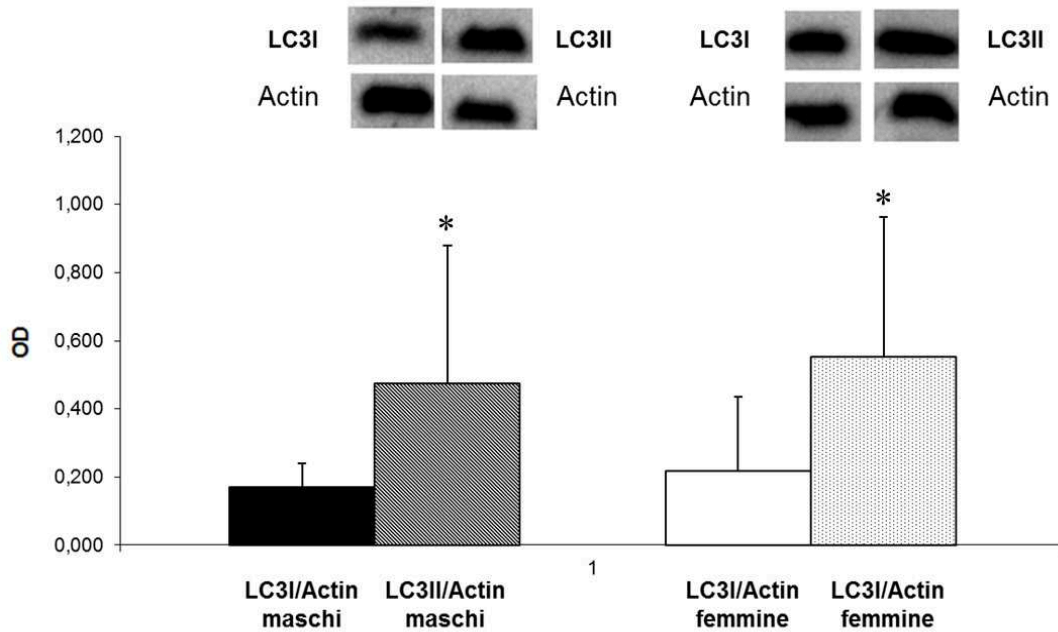


Fig.12 Rapporto fra la forma II e I di LC3 in condizioni basali. I valori sono espressi come medie \pm DS di 10 campioni di cellule HUASMC ottenute da cordoni di neonati maschi (barra nera) e 10 campioni ottenuti da cordoni di neonati femmine (barra bianca).

**= $P < 0,05$.*

Come aspettato, la serum starvation per 24h induce un aumento notevole della forma II (Fig.13) e del rapporto LC3II/I (Fig.14), indice di attività autofagica, sia nelle cellule XX che nelle cellule XY. Tuttavia in questo caso non si riscontrano differenze statisticamente significative nell'espressione delle due proteine sebbene il rapporto sia più alto nelle femmine (figura non mostrata).



*Fig.13 Analisi in western blotting dell'espressione delle proteine LC3I e LC3II in condizione di serum starvation per 24h. Nella parte superiore sono riportate delle tipiche bande di LC3I e II e le relative α -Actine usate per normalizzare. I valori sono espressi come medie \pm DS di 10 campioni di cellule HUASMC ottenute da cordoni di neonati maschi (barra nera) e 10 campioni ottenuti da cordoni di neonati femmine (barra bianca). * = $P < 0,05$.*

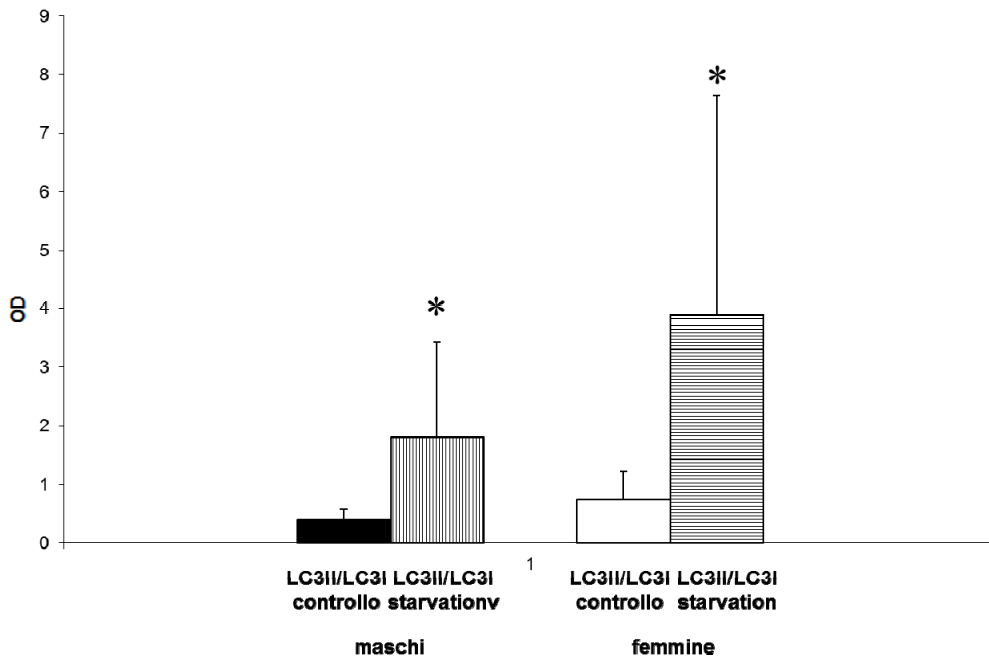


Fig. 14 Confronto fra il rapporto LC3II/I in controllo e in starvation per le HUASMC maschili e femminili. I valori sono espressi come medie \pm DS di 10 campioni di cellule HUASMC ottenute da cordoni di neonati maschi (barra nera) e 10 campioni ottenuti da cordoni di neonati femmine (barra bianca). $P < 0,05$

Analisi in western blotting delle 2 forme della proteina LC3 in seguito a trattamento con rapamicina

Al fine, per stimolare l'autofagia, le cellule maschili e femminili sono state incubate per 24h con l'inibitore di mTOR rapamicina alla concentrazione di 10, 100 e 250 nmol/L. Il rapporto fra la forma lipidata e solubile di LC3 risulta sempre più alto rispetto al basale (nell'immagine è mostrato il grafico relativo agli esperimenti condotti con la concentrazione 250 nM, Fig. 15, i grafici relativi alle altre concentrazioni non sono mostrati). Nei campioni maschili la differenza fra i campioni in condizione basale e dopo incubazione con rapamicina è sempre abbondantemente significativa. Nelle femmine non si raggiunge la significatività statistica, pur mantenendo il medesimo andamento che si ritrova nei maschi.

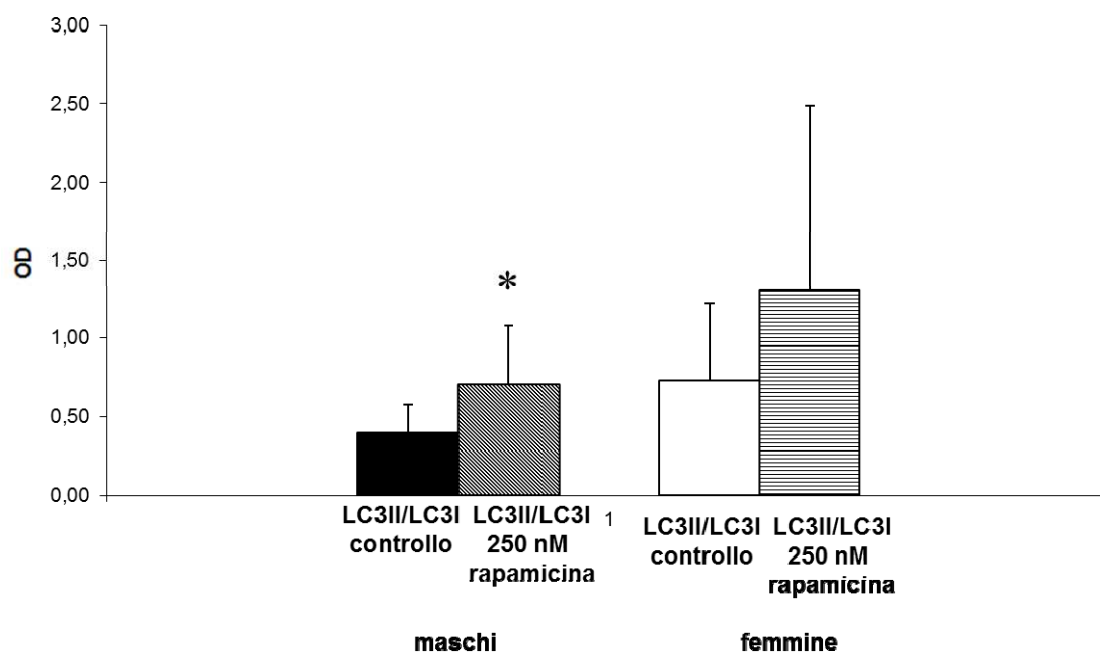


Fig.15 Rapporto fra LC3II e LC3I in condizione di controllo e in seguito a stimolazione con rapamicina 250nM. I valori sono espressi come medie \pm DS di 10 campioni di cellule HUASMC ottenute da cordoni di neonati maschi (barra nera) e 10 campioni ottenuti da cordoni di neonati femmine (barra bianca).

Western blotting per Beclina-1, mTOR e PmTOR in condizioni basali, dopo starvation e dopo rapamicina

La proteina Beclina-1 non mostra differenze di espressione legate al sesso-genere (Fig.16) né in condizioni basali, né dopo starvation né dopo trattamento con rapamicina sia nelle cellule XX che XY.

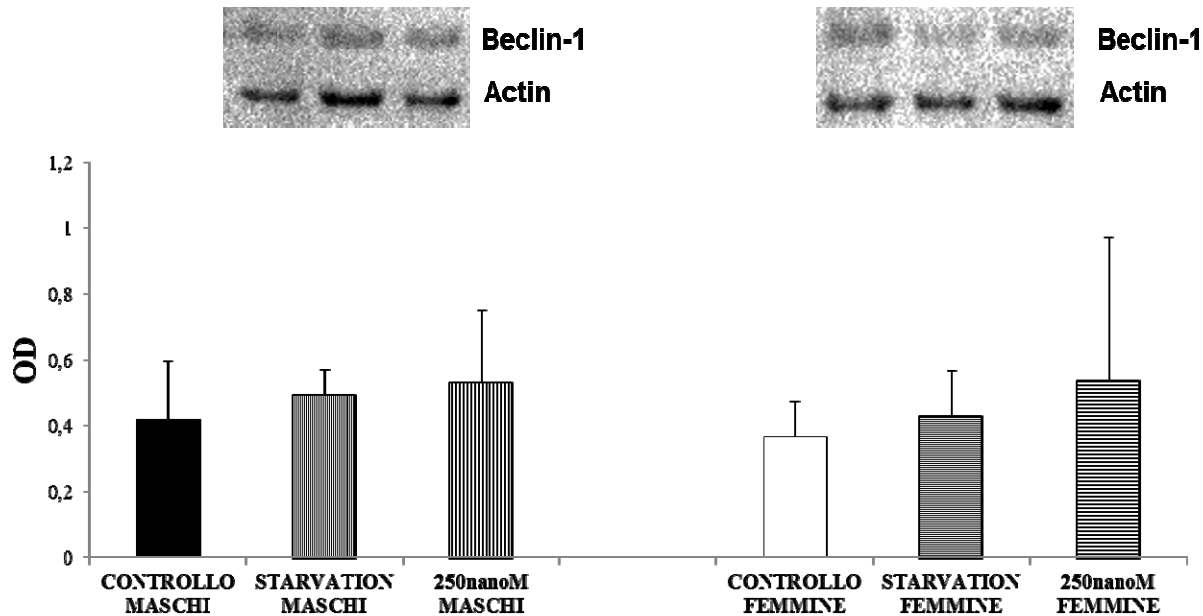


Fig.16 Tipico Western blot per Beclin-1 in condizioni basali, in serum starvation e in seguito a incubazione con rapamicina 250nmol/l. Nella parte superiore sono riportate delle tipiche bande di Beclin-1 e α -Actina.

I valori sono espressi come medie \pm DS di 7 campioni di cellule HUASMC ottenute da cordoni di neonati maschi (barra nera) e 10 campioni ottenuti da cordoni di neonati femmine (barra bianca).

L'espressione della proteina mTOR, benché risulti maggiore nei maschi, non differisce statisticamente fra i due gruppi (Fig.17). L'espressione della proteina mTOR fosforilata sulla serina 2448, indice di attività chinastica, non differisce rispetto al sesso, né in condizione basale né in seguito a starvation (Fig.18). Si osserva comunque una marcata diminuzione di espressione in seguito a serum starvation.

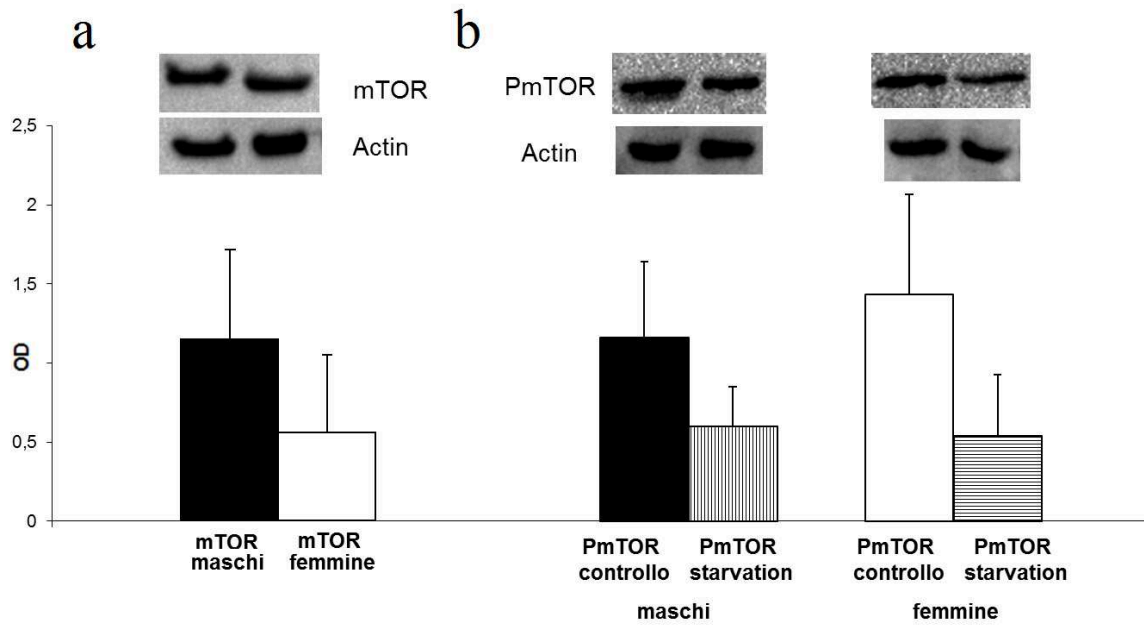


Fig.17 Western blotting per mTOR in condizioni basali (pannello a) e PmTOR in condizioni basali e in condizione di serum starvation (pannello b). Nella parte superiore dell'immagine si riportano delle tipiche bande di mTOR, PmTOR e α -Actina. I valori sono espressi come medie \pm DS di 5 campioni di cellule HUASMC ottenute da cordoni di neonati maschi e 5 campioni ottenuti da cordoni di neonati femmine.

Correlazioni fra il peso del neonato e autofagia basale delle HUASMC

Sono state analizzate le correlazioni fra età e peso della madre e peso del neonato con il grado di autofagia basale, misurato con il rapporto LC3II/I. Non si riscontrano correlazioni significative fra età e peso della madre con il grado di autofagia delle HUASMC. L'autofagia basale correla invece con il peso alla nascita del neonato e ciò avviene in maniera sesso specifica. In particolare, si ha una correlazione positiva tra il peso dei neonati maschi e il rapporto LC3II/I mentre la correlazione tra il peso del neonato femmina e il rapporto LC3II/I è negativa (Fig.20, Fig.21). Inoltre sono state analizzate le correlazioni fra il peso del neonato e il rapporto LC3II/I in seguito a starvation ma, pur mantenendo lo stesso andamento che si riscontra nel basale (positivo per i maschi e negativo per le femmine) non si raggiunge la significatività statistica, probabilmente per una minor potenza statistica data da una numerosità campionaria inferiore (dato non mostrato)

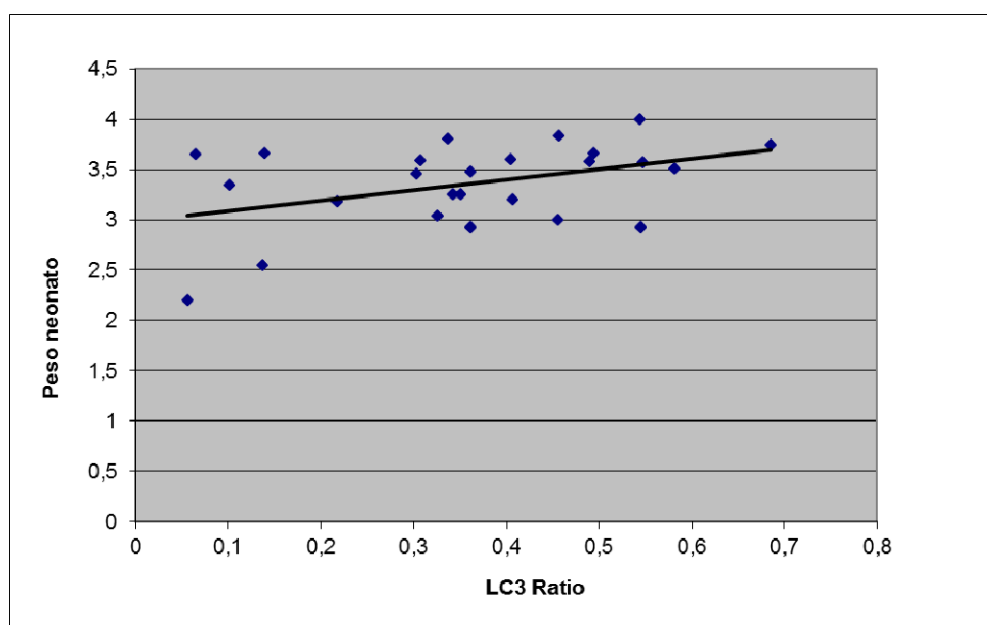
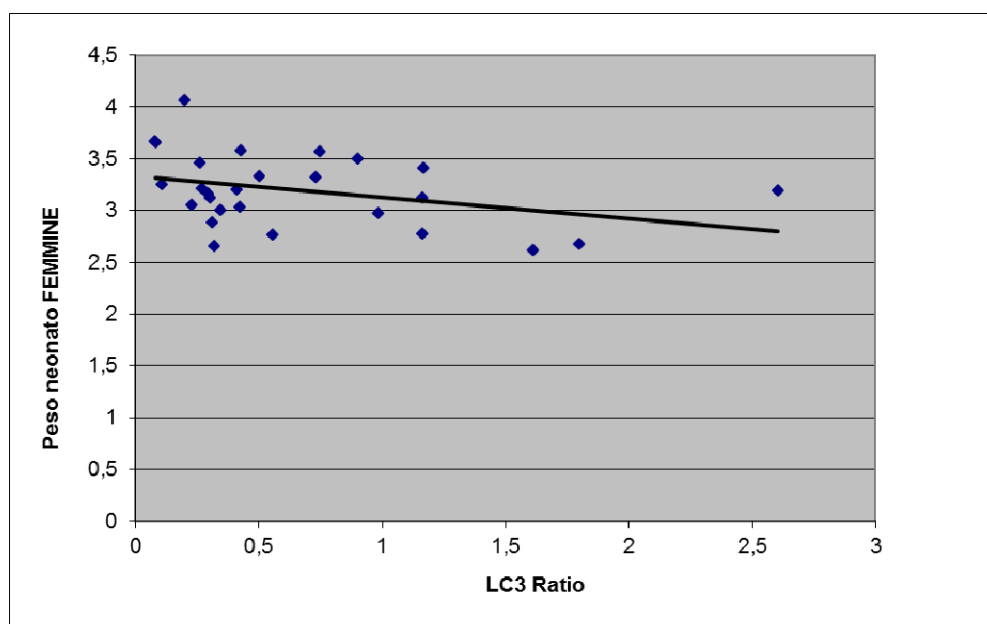


Fig.20 Correlazione fra peso del neonato maschio e ratio LC3II/I; N=25. La correlazione positiva evidenziata dalla retta di regressione è statisticamente significativa con un valore di probabilità di 0,036.



*Fig.21 Correlazione fra peso del neonato femmina e ratio LC3II/I;N=27
La correlazione negativa evidenziata dalla retta di regressione è statisticamente significativa con un valore di probabilità di 0,041.*

Discussione

Uno dei problemi metodologici più importanti negli studi di genere è il problema della normalizzazione dei dati [1]. In particolare, per quanto riguarda la selezione delle proteine housekeeping, bisogna verificare se esse vengono espresse in misura simile nel tessuto o nelle cellule in esame. Nel caso specifico, α -Actina e GAPDH risultano non essere diverse sia nel cuore che nella cellula muscolare liscia vasale mentre la proteina β -tubulina, ampiamente utilizzata come housekeeping protein in moltissimi laboratori, differisce significativamente fra cuori maschili e femminili, ma non nelle cellule HUASMC. Questo risultato evidenzia l'importanza e la portata delle differenze di sesso-genere a livello cellulare indicando anche che nel disegno sperimentale deve essere inclusa la valutazione delle possibili differenze di genere dei fattori di normalizzazione. Alcuni dati ottenuti dal nostro gruppo di ricerca su altri tessuti (fegato e rene proveniente dallo stesso animale indicano) suggeriscono che le differenze di genere relativamente alle housekeeping protein possano essere organo-specifiche [1]. Per quanto riguarda il diverso comportamento della β -tubulina nel cuore di ratto non siamo in grado di dire se ciò dipenda dall'organo o dalla specie (ratto verso uomo).

Vista le differenze di provenienza dei due modelli (ratto ed uomo) e le diversità tra le cellule cardiache e quelle muscolari lisce è opportuno separare la discussione.

Dai risultati si evince che, relativamente alle proteine, il cuore di ratto maschio presenta uno stato redox basale più incline all'ossidazione rispetto al cuore del ratto femmina. Questo risultato è in linea con i dati precedentemente ottenuti su ratti più anziani [56] e proprio l'età potrebbe essere responsabile di questa non univocità dei dati.

Il complesso cross-talk fra stress ossidativo e autofagia basale è ben noto e documentato [53, 101]. In questa tesi evidenziamo che l'ossidazione delle proteine sembra indurre autofagia. In effetti, nel cuore maschile si osserva un livello di ossidazione proteica più alto rispetto alle femmine, una maggiore espressione di Beclina-1, un marker della formazione dell'autofagosoma, e un più elevato ratio LC3II/I, il quale è considerato uno dei marker più attendibili di autofagia [102]. L'alto rapporto LC3II/I può implicare una minore produzione di proteina o un maggiore turnover degli autofagolisosomi. Le indagini in immunofluorescenza mostrano, nei maschi, un maggior numero di punti verdi, corrispondenti alla colocalizzazione delle proteine LC3 e Lamp-1, cioè all'autofagolisosoma. In aggiunta, i western blotting sulla proteina LC3I non mostrano differenze fra maschi e femmine. Questi dati sono in linea con i risultati ottenuti su cellule e tessuti di origine mesodermica e neurodermica come le cellule muscolari lisce ottenute dalle arterie di ratto, fibroblasti di ratto e cellule neuronali di ratto sottoposte a starvation [65, 66, 103].

Inoltre, il cuore dei ratti maschi mostra un livello di espressione di mTOR più elevato rispetto al cuore femminili. L'alto livello di espressione di questo regolatore negativo dell'autofagia [41] potrebbe essere dovuto a un meccanismo adattativo in risposta agli alti livelli di ossidazione delle proteine. Questo meccanismo adattativo eviterebbe alle cellule di andare incontro a danni dovuti ad un'eccessiva autofagia, la quale può portare alla morte delle cellule e danno tissutale [104]. I nostri dati suggeriscono inoltre che le differenze riscontrate nella risposta autofagica possano essere indipendenti da mTOR. Il segnale di mTOR può essere by-passato, come riportato in un lavoro su cellule muscolari ed epatociti [105].

Considerando il ruolo dell'autofagia nei processi omeostatici a livello cellulare, le differenze osservate a livello del cuore potrebbero costituire una delle basi delle differenze osservate nella fisiologia e nella patologia del sistema cardiovascolare.

Un ultimo dato importante da sottolineare è che l'anticorpo utilizzato per lo studio non riconosce la forma attiva fosforilata sulla serina 2448 (via di AKT [106]) ma lega indiscriminatamente le proteine attive e quelle inattive (defosforilate) e ciò non permette di arrivare a conclusioni più specifiche. La proteina LAMP-1, una delle più abbondanti proteine lisosomiali, non è sostanzialmente diversa tra i cuori ottenuti dai due sessi e ciò suggerisce che, a livello cardiaco, non esistono differenze nella numerosità o dimensione dei lisosomi a differenza di quanto avviene nel fegato [1].

In conclusione, il cuore maschile mostra una maggiore attività autofagica, beclina-1 dipendente e forse indipendente da mTOR, causata probabilmente da un assetto redox più incline verso l'ossidazione, come testimoniato dalle proteine carbonilate.

In riguardo al lavoro sulle HUASMC abbiamo rilevato una differenza di sesso-genere nella regolazione e nell'entità del processo autofagico; come illustrato nella figura 12 il rapporto LC3II/I, un indice di autofagia è più alto nelle cellule femminili rispetto alle maschili. Si osserva un più alto rapporto LC3II/I nelle cellule femminili anche in condizioni di serum starvation, tuttavia il livello di significatività della statistica non è significativo. Questo risultato non è in linea con quanto rilevato da altri gruppi di ricerca e discusso precedentemente [63-64].

L'analisi in western blotting della proteina mTOR fosforilata sulla serina 2448 non rivela differenze fra i maschi e femmine in nessuna condizione. Dal momento che non si rilevano differenze nel livello di fosforilazione di mTOR in condizioni di controllo concludiamo che la maggiore autofagia riscontrata nelle femmine è indipendente dalla regolazione di mTOR. Non si rilevano differenze legate al sesso nemmeno nei livelli di espressione della proteina Beclin-1 in nessuna condizione; dal momento che in condizioni basali nelle cellule femminili si riscontra una maggiore autofagia ipotizziamo che questo processo sia Beclin-1 indipendente;

In conclusione, per quanto riguarda l'autofagia sono state riscontrate differenze legate al sesso sia nell'entità che nella regolazione del processo; Dai dati del nostro lavoro risulta che le femmine abbiano un livello di autofagia basale superiore ai maschi.

È importante notare che le madri dei neonati maschi e dei neonati femmina non differiscono per quanto riguarda il peso e l'età; anche il peso dei neonati non diverge significativamente tra i due sessi sebbene quello delle femmine sia minore rispetto a quello dei maschi. Ciò è in linea con i dati della letteratura che indicano che le bambine alla nascita hanno un peso inferiore rispetto ai bambini [107]. Quando andiamo a correlare il peso della mamma con quello del neonato emerge che una correlazione positiva statisticamente significativa fra il peso dei neonati maschi e quello della madre. In particolare, si riscontra un incremento di 26 gr nel peso del neonato per ogni kg di peso della madre suggerendo che il peso della madre influenza la traiettoria di sviluppo nel neonato maschio. Tale relazione non è statisticamente significativa quando si correla il peso della madre con il neonato femmina. I precedenti risultati sono in linea con i dati della letteratura [108, 109]. Ciò ci porta ad ipotizzare visto che il peso alla nascita è influenzato da fattori ambientali (riferito all'ambiente intrauterino) e da fattori genetici che questi sono diversi a seconda del sesso del neonato. Dall'altra è noto che il gene *sry* presente sul cromosoma Y [110], non solo è fondamentale per la determinazione e la differenziazione sessuale ma gioca anche un ruolo nel metabolismo [111-116]. Questo diverso comportamento delle correlazioni tra peso materno e peso infantile potrebbe essere rilevante perché sia un basso peso alla nascita che un alto peso hanno ripercussioni importanti sulla salute del futuro adulto [117, 118]. Ad esempio, un basso peso alla nascita è associato ad un aumentato rischio di sviluppare diabete e malattie cardiovascolari mentre un alto peso alla nascita è associato ad un rischio di sviluppare una condizione di sovrappeso, adiposità, diabete e ipertensione fin da giovane età [119]. Dal momento che fra madre e neonato maschio esiste una forte correlazione nei pesi, un accurato controllo del peso della madre sarebbe un fattore di protezione più importante per il neonato maschio rispetto a quello della femmina.

Visto il ruolo che la starvation ha nell'indurre i processi autofagici [32], come abbiamo anche confermato in questo studio, abbiamo controllato se un indice di autofagia come il rapporto LC3II su LC3I correla con l'età ed il peso materno. Queste analisi non evidenziano nessuna correlazione in entrambi i sessi indicando uno scarso peso di questi fattori materni sull'autofagia delle cellule HUASMC. Invece, sono state trovate correlazioni statisticamente significative tra peso del neonato e autofagia e interessatamente ciò avviene in maniera sesso specifica. In particolare il peso del neonato correla positivamente con l'autofagia delle cellule HUASMC, mentre il peso delle neonate correla negativamente. Questo dato evidenzia che il peso (nei range che sono considerati nella norma) del neonato è un importante regolatore dei processi autofagici in condizioni basali delle cellule HUASMC. In altre parole un aumento di peso nel neonato porta ad un aumento dei processi autofagici, mentre nella femmina porta ad una diminuzione dell'autofagia. Come è stato ampiamente discusso nell'introduzione l'autofagia è un meccanismo di sopravvivenza cellulare in seguito a diversi stress compreso il digiuno. Questo è vero anche nella vita prenatale [120]. Ad

esempio l'autofagia può essere carente a livello placentare in corso di pre eclampsia e può risentire della fluttuazione nella disponibilità dei nutrienti. Quindi queste diverse correlazioni trovate tra peso del neonato femmina e del neonato maschio e l'autofagia basale delle cellule HUASMC suggeriscono che l'autofagia è controllata diversamente nei maschi e nelle femmine. Ciò è molto rilevante perché avviene in assenza di significative differenze nei processi autofagi nelle cellule XX a XY anche se il rapporto LC3II/LC3I appare più alto nelle femmine. Ciò potrebbe essere dovuto al fatto che i processi adattativi legati al peso del neonato hanno una spinta inversa nel neonato maschio e nel neonato femmina.

Purtroppo, al momento attuale, nelle correlazioni fra il peso del neonato e il rapporto LC3II/I, un indice di autofagia, misurato dopo starvation pur mantenendo lo stesso andamento che si riscontra nel basale (positivo per i maschi e negativo per le femmine) non si raggiunge la significatività statistica probabilmente per una minore potenza statistica data da una numerosità campionaria inferiore. Precedentemente era stato evidenziato (senza considerare il sesso del neonato) una correlazione negativa tra gli indici di autofagia misurati a livello placentare ed il peso del neonato [121].

In linea generale, le cellule HUAMSC sono un modello di studio che presenta diversi vantaggi: i cordoni ombelicali sono sempre disponibili e la procedura di isolamento delle cellule è relativamente semplice, veloce e poco costosa ed ha inoltre il vantaggio di non essere prelevato da campioni patologici. Inoltre, esse sembrano essere anche un buon modello per studiare le differenze di genere poiché esprimono i geni per i recettori degli estrogeni e degli androgeni in maniera sesso specifica. Le cellule maschili, infatti, esprimono i geni dei recettori degli estrogeni alfa e beta in misura maggiore rispetto alle cellule femminili [122] e anche il recettore degli androgeni sembra essere maggiormente espresso nelle cellule maschili, sebbene tale differenza non raggiunga la significatività [122].

In conclusione, coi dati a nostra disposizione, possiamo affermare che esistono differenze di sesso-genere nella regolazione dell'autofagia nel cuore di ratto e che esiste una relazione fra autofagia e l'ossidazione delle proteine. Per quanto riguarda il lavoro sulle cellule HUASMC si rilevano differenze legate al sesso-genere nell'entità del processo autofagico: le cellule femminili mostrano un più alto livello di autofagia rispetto ai maschi e questo processo sembra non dipendere da mTOR; Al momento è ipotizzabile che la maggiore autofagia riscontrata nelle femmine sia indipendente anche da Beclin-1. Un dato interessante che è stato riscontrato è costituito dall'esistenza di differenze di genere tra cellule maschili e femminili per quanto riguarda la correlazione fra autofagia e peso del neonato. Lavori successivi su questo promettente modello di studio permetteranno di valutare l'esistenza di eventuali implicazioni fisiopatologiche di questo fenomeno.

Bibliografia

1. Campesi, I., et al., *Protein oxidation seems to be linked to constitutive autophagy: a sex study*. *Life Sci.* 93(4): p. 145-52.
2. Hiort, O., *Clinical and molecular aspects of androgen insensitivity*. *Endocr Dev.* 24: p. 33-40.
3. Dreger, A.D., *A history of intersexuality: from the age of gonads to the age of consent*. *J Clin Ethics*, 1998. 9(4): p. 345-55.
4. Frye, C.A., et al., *Endocrine disruptors: a review of some sources, effects, and mechanisms of actions on behaviour and neuroendocrine systems*. *J Neuroendocrinol.* 24(1): p. 144-59.
5. Mouritsen, A., et al., *Hypothesis: exposure to endocrine-disrupting chemicals may interfere with timing of puberty*. *Int J Androl.* 33(2): p. 346-59.
6. Gioiosa, L., et al., *Developmental exposure to low-dose estrogenic endocrine disruptors alters sex differences in exploration and emotional responses in mice*. *Horm Behav*, 2007. 52(3): p. 307-16.
7. Gore, A.C., *Neuroendocrine targets of endocrine disruptors*. *Hormones (Athens)*. 9(1): p. 16-27.
8. Roscoe, W., *Changing Ones: Third and Fourth Genders in Native North America*. 2000: Palgrave Macmillan.
9. Agrawal, A., *Gendered Bodies: The Case of the 'Third Gender' in India*. *Contributions to Indian Sociology*, 1997. 31: p. 273-297.
10. ORGANIZATION, W.H., in *The Preamble of the Constitution of the World Health Organization*, B.o.t.W.H. Organization, Editor. 1946: New York.
11. Melillo, L., in *Congresso della società italiana di storia della medicina*. 2004: Nettuno 23-25 Settembre 2004.
12. Bonner, T.N., *Women healers and physicians: climbing a long hill*. *Medical History*, 1998. 42(2): p. 269-270.
13. Bonito-Oliva, R., *La cura delle donne*. 2004.
14. Bonadonna, G., *Donne in Medicina*. 1991: Rizzoli.
15. Mill, J.S., *The Subjection of Women*. 1869.
16. Engels, F., *L'origine della famiglia, della proprietà privata e dello Stato*. 1884.
17. ONU, *Dichiarazione Universale dei Diritti dell'Uomo* 1948.
18. Franconi, F., et al., *Gender differences in drug responses*. *Pharmacol Res*, 2007. 55(2): p. 81-95.
19. Rosamond, W., et al., *Heart disease and stroke statistics--2008 update: a report from the American Heart Association Statistics Committee and Stroke Statistics Subcommittee*. *Circulation*, 2008. 117(4): p. e25-146.
20. Regitz-Zagrosek, V., et al., *Sex and gender differences in myocardial hypertrophy and heart failure*. *Circ J.* 74(7): p. 1265-73.
21. Various, a., *Sex and Gender Differences in Pharmacology*. *Handbook of Experimental Pharmacology*, ed. Springer. Vol. 214. 2012: Springer.

22. Cardiology, W.G.o.H.F.o.t.E.S.o. *The EuroHeart Failure Survey programme—a survey on the quality of care among patients with heart failure in Europe*. 2002.
23. Benjamin, E.J., et al., *Independent risk factors for atrial fibrillation in a population-based cohort. The Framingham Heart Study*. *Jama*, 1994. 271(11): p. 840-4.
24. Zenovich, A.G., et al., *Sex-based differences in vascular repair with bone marrow cell therapy: relevance of regulatory and Th2-type cytokines*. *Transplant Proc*, 2008. 40(2): p. 641-3.
25. Nelson, W.D., et al., *Sex-dependent attenuation of plaque growth after treatment with bone marrow mononuclear cells*. *Circ Res*, 2007. 101(12): p. 1319-27.
26. Bae, S. and L. Zhang, *Gender differences in cardioprotection against ischemia/reperfusion injury in adult rat hearts: focus on Akt and protein kinase C signaling*. *J Pharmacol Exp Ther*, 2005. 315(3): p. 1125-35.
27. Cross, H.R., E. Murphy, and C. Steenbergen, *Ca(2+) loading and adrenergic stimulation reveal male/female differences in susceptibility to ischemia-reperfusion injury*. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 2002. 283(2): p. H481-9.
28. Wang, M., et al., *Sex differences in the myocardial inflammatory response to ischemia-reperfusion injury*. *Am J Physiol Endocrinol Metab*, 2005. 288(2): p. E321-6.
29. Wang, C., et al., *Gender-specificity of delayed preconditioning by isoflurane in rabbits: potential role of endothelial nitric oxide synthase*. *Anesth Analg*, 2006. 103(2): p. 274-80, table of contents.
30. Fang, L., et al., *Differences in inflammation, MMP activation and collagen damage account for gender difference in murine cardiac rupture following myocardial infarction*. *J Mol Cell Cardiol*, 2007. 43(5): p. 535-44.
31. Cavasin, M.A., et al., *Gender differences in cardiac function during early remodeling after acute myocardial infarction in mice*. *Life Sci*, 2004. 75(18): p. 2181-92.
32. Rabinowitz, J.D. and E. White, *Autophagy and metabolism*. *Science*. 330(6009): p. 1344-8.
33. Oczypok, E.A., T.D. Oury, and C.T. Chu, *It's a cell-eat-cell world: autophagy and phagocytosis*. *Am J Pathol*. 182(3): p. 612-22.
34. Mizushima, N. and M. Komatsu, *Autophagy: renovation of cells and tissues*. *Cell*. 147(4): p. 728-41.
35. Yang, Y.P., et al., *Molecular mechanism and regulation of autophagy*. *Acta Pharmacol Sin*, 2005. 26(12): p. 1421-34.
36. Kotoulas, O.B., S.A. Kalamidas, and D.J. Kondomerkos, *Glycogen autophagy in glucose homeostasis*. *Pathol Res Pract*, 2006. 202(9): p. 631-8.
37. Christian, P., J. Sacco, and K. Adeli, *Autophagy: Emerging roles in lipid homeostasis and metabolic control*. *Biochim Biophys Acta*. 1831(4): p. 819-24.
38. He, C. and D.J. Klionsky, *Regulation mechanisms and signaling pathways of autophagy*. *Annu Rev Genet*, 2009. 43: p. 67-93.
39. Lista, P., et al., *On the role of autophagy in human diseases: a gender perspective*. *J Cell Mol Med*. 15(7): p. 1443-57.
40. Dowling, R.J., et al., *Dissecting the role of mTOR: lessons from mTOR inhibitors*. *Biochim Biophys Acta*. 1804(3): p. 433-9.
41. Jung, C.H., et al., *mTOR regulation of autophagy*. *FEBS Lett*. 584(7): p. 1287-95.
42. Laplante, M. and D.M. Sabatini, *mTOR signaling in growth control and disease*. *Cell*. 149(2): p. 274-93.
43. Ballou, L.M. and R.Z. Lin, *Rapamycin and mTOR kinase inhibitors*. *J Chem Biol*, 2008. 1(1-4): p. 27-36.

44. Hay, N. and N. Sonenberg, *Upstream and downstream of mTOR*. Genes Dev, 2004. 18(16): p. 1926-45.
45. Yang, Z. and X.F. Ming, *mTOR signalling: the molecular interface connecting metabolic stress, aging and cardiovascular diseases*. Obes Rev. 13 Suppl 2: p. 58-68.
46. Kim, J., et al., *AMPK and mTOR regulate autophagy through direct phosphorylation of Ulk1*. Nat Cell Biol. 13(2): p. 132-41.
47. Alers, S., et al., *Role of AMPK-mTOR-Ulk1/2 in the regulation of autophagy: cross talk, shortcuts, and feedbacks*. Mol Cell Biol. 32(1): p. 2-11.
48. Kang, R., et al., *The Beclin 1 network regulates autophagy and apoptosis*. Cell Death Differ. 18(4): p. 571-80.
49. Grishchuk, Y., et al., *Beclin 1-independent autophagy contributes to apoptosis in cortical neurons*. Autophagy. 7(10): p. 1115-31.
50. Scarlatti, F., et al., *Role of non-canonical Beclin 1-independent autophagy in cell death induced by resveratrol in human breast cancer cells*. Cell Death Differ, 2008. 15(8): p. 1318-29.
51. Suzuki, K., et al., *The pre-autophagosomal structure organized by concerted functions of APG genes is essential for autophagosome formation*. Embo J, 2001. 20(21): p. 5971-81.
52. Suzuki, K., et al., *Hierarchy of Atg proteins in pre-autophagosomal structure organization*. Genes Cells, 2007. 12(2): p. 209-18.
53. Scherz-Shouval, R., et al., *Reactive oxygen species are essential for autophagy and specifically regulate the activity of Atg4*. Embo J, 2007. 26(7): p. 1749-60.
54. Kabeya, Y., et al., *LC3, a mammalian homologue of yeast Apg8p, is localized in autophagosomal membranes after processing*. Embo J, 2000. 19(21): p. 5720-8.
55. Tanida, I., T. Ueno, and E. Kominami, *LC3 conjugation system in mammalian autophagy*. Int J Biochem Cell Biol, 2004. 36(12): p. 2503-18.
56. Kouroku, Y., et al., *ER stress (PERK/eIF2alpha phosphorylation) mediates the polyglutamine-induced LC3 conversion, an essential step for autophagy formation*. Cell Death Differ, 2007. 14(2): p. 230-9.
57. Furuta, S., et al., *Ras is involved in the negative control of autophagy through the class I PI3-kinase*. Oncogene, 2004. 23(22): p. 3898-904.
58. Ogata, M., et al., *Autophagy is activated for cell survival after endoplasmic reticulum stress*. Mol Cell Biol, 2006. 26(24): p. 9220-31.
59. Sakaki, K., J. Wu, and R.J. Kaufman, *Protein kinase Ctheta is required for autophagy in response to stress in the endoplasmic reticulum*. J Biol Chem, 2008. 283(22): p. 15370-80.
60. Cardenas, C. and J.K. Foskett, *Mitochondrial Ca(2+) signals in autophagy*. Cell Calcium. 52(1): p. 44-51.
61. Hoyer-Hansen, M., et al., *Control of macroautophagy by calcium, calmodulin-dependent kinase kinase-beta, and Bcl-2*. Mol Cell, 2007. 25(2): p. 193-205.
62. Chen, Y., et al., *Mitochondrial electron-transport-chain inhibitors of complexes I and II induce autophagic cell death mediated by reactive oxygen species*. J Cell Sci, 2007. 120(Pt 23): p. 4155-66.
63. Chen, Y., et al., *Oxidative stress induces autophagic cell death independent of apoptosis in transformed and cancer cells*. Cell Death Differ, 2008. 15(1): p. 171-82.
64. Huang, Q., et al., *A novel function of poly(ADP-ribose) polymerase-1 in modulation of autophagy and necrosis under oxidative stress*. Cell Death Differ, 2009. 16(2): p. 264-77.
65. Straface, E., et al., *Cell sex determines anoikis resistance in vascular smooth muscle cells*. FEBS Lett, 2009. 583(21): p. 3448-54.

66. Du, L., et al., *Starving neurons show sex difference in autophagy*. J Biol Chem, 2009. 284(4): p. 2383-96.
67. Sybers, H.D., J. Ingwall, and M. DeLuca, *Autophagy in cardiac myocytes*. Recent Adv Stud Cardiac Struct Metab, 1976. 12: p. 453-63.
68. Nishida, K., et al., *The role of autophagy in the heart*. Cell Death Differ, 2009. 16(1): p. 31-8.
69. Gustafsson, A.B. and R.A. Gottlieb, *Autophagy in ischemic heart disease*. Circ Res, 2009. 104(2): p. 150-8.
70. Zhu, H., et al., *Cardiac autophagy is a maladaptive response to hemodynamic stress*. J Clin Invest, 2007. 117(7): p. 1782-93.
71. Shaw, J. and L.A. Kirshenbaum, *Molecular regulation of autophagy and apoptosis during ischemic and non-ischemic cardiomyopathy*. Autophagy, 2008. 4(4): p. 427-34.
72. Rothermel, B.A. and J.A. Hill, *Myocyte autophagy in heart disease: friend or foe?* Autophagy, 2007. 3(6): p. 632-4.
73. Tannous, P., et al., *Intracellular protein aggregation is a proximal trigger of cardiomyocyte autophagy*. Circulation, 2008. 117(24): p. 3070-8.
74. Halestrap, A.P., S.J. Clarke, and S.A. Javadov, *Mitochondrial permeability transition pore opening during myocardial reperfusion--a target for cardioprotection*. Cardiovasc Res, 2004. 61(3): p. 372-85.
75. Gao, X.M., et al., *Inhibition of mTOR reduces chronic pressure-overload cardiac hypertrophy and fibrosis*. J Hypertens, 2006. 24(8): p. 1663-70.
76. Nakai, A., et al., *The role of autophagy in cardiomyocytes in the basal state and in response to hemodynamic stress*. Nat Med, 2007. 13(5): p. 619-24.
77. Rudijanto, A., *The role of vascular smooth muscle cells on the pathogenesis of atherosclerosis*. Acta Med Indones, 2007. 39(2): p. 86-93.
78. Dzau, V.J., R.C. Braun-Dullaeus, and D.G. Sedding, *Vascular proliferation and atherosclerosis: new perspectives and therapeutic strategies*. Nat Med, 2002. 8(11): p. 1249-56.
79. Muir, E.M. and D.E. Bowyer, *Dependence of fluid-phase pinocytosis in arterial smooth-muscle cells on temperature, cellular ATP concentration and the cytoskeletal system*. Biochem J, 1983. 216(2): p. 467-73.
80. Sprague, E.A., et al., *Stimulation of albumin endocytosis by cationized ferritin in cultured aortic smooth muscle cells*. Am J Pathol, 1985. 121(3): p. 433-43.
81. Mitra, S., et al., *Oxidized low-density lipoprotein and atherosclerosis implications in antioxidant therapy*. Am J Med Sci. 342(2): p. 135-42.
82. Moore, K.J. and M.W. Freeman, *Scavenger receptors in atherosclerosis: beyond lipid uptake*. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 2006. 26(8): p. 1702-11.
83. Schachter, M., *Vascular smooth muscle cell migration, atherosclerosis, and calcium channel blockers*. Int J Cardiol, 1997. 62 Suppl 2: p. S85-90.
84. Libby, P., et al., *Molecular biology of atherosclerosis*. Int J Cardiol, 1997. 62 Suppl 2: p. S23-9.
85. Doran, A.C., N. Meller, and C.A. McNamara, *Role of smooth muscle cells in the initiation and early progression of atherosclerosis*. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 2008. 28(5): p. 812-9.
86. Cai, Q., L. Lanting, and R. Natarajan, *Growth factors induce monocyte binding to vascular smooth muscle cells: implications for monocyte retention in atherosclerosis*. Am J Physiol Cell Physiol, 2004. 287(3): p. C707-14.

87. Michel, J.B., et al., *Intraplaque haemorrhages as the trigger of plaque vulnerability*. Eur Heart J. 32(16): p. 1977-85, 1985a, 1985b, 1985c.
88. Rensen, S.S., P.A. Doevendans, and G.J. van Eys, *Regulation and characteristics of vascular smooth muscle cell phenotypic diversity*. Neth Heart J, 2007. 15(3): p. 100-8.
89. Thyberg, J., et al., *Phenotypic modulation of smooth muscle cells after arterial injury is associated with changes in the distribution of laminin and fibronectin*. J Histochem Cytochem, 1997. 45(6): p. 837-46.
90. Jia, G., G. Cheng, and D.K. Agrawal, *Autophagy of vascular smooth muscle cells in atherosclerotic lesions*. Autophagy, 2007. 3(1): p. 63-4.
91. Schrijvers, D.M., G.R. De Meyer, and W. Martinet, *Autophagy in atherosclerosis: a potential drug target for plaque stabilization*. Arterioscler Thromb Vasc Biol. 31(12): p. 2787-91.
92. Bradford G Hill, P.H., Aruni Bhatnagar, Joshua K. Salabei, *Mitogen-Mediated Autophagy Regulates Vascular Smooth Muscle Cell Phenotype*. 2011.
93. Ding, Z., et al., *Regulation of autophagy and apoptosis in response to ox-LDL in vascular smooth muscle cells, and the modulatory effects of the microRNA hsa-let-7g*. Int J Cardiol.
94. Martinet, W., et al., *7-ketocholesterol induces protein ubiquitination, myelin figure formation, and light chain 3 processing in vascular smooth muscle cells*. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 2004. 24(12): p. 2296-301.
95. Hu, P., et al., *ERK and Akt signaling pathways are involved in advanced glycation end product-induced autophagy in rat vascular smooth muscle cells*. Int J Mol Med. 29(4): p. 613-8.
96. Salabei, J.K. and B.G. Hill, *Implications of autophagy for vascular smooth muscle cell function and plasticity*. Free Radic Biol Med. 65C: p. 693-703.
97. Kadner, A., et al., *Human umbilical cord cells for cardiovascular tissue engineering: a comparative study*. Eur J Cardiothorac Surg, 2004. 25(4): p. 635-41.
98. Esterbauer, H. and K.H. Cheeseman, *Determination of aldehydic lipid peroxidation products: malonaldehyde and 4-hydroxynonenal*. Methods Enzymol, 1990. 186: p. 407-21.
99. Fagan, J.M., B.G. Slezcka, and I. Sohar, *Quantitation of oxidative damage to tissue proteins*. Int J Biochem Cell Biol, 1999. 31(7): p. 751-7.
100. Eskelinen, E.L., Y. Tanaka, and P. Saftig, *At the acidic edge: emerging functions for lysosomal membrane proteins*. Trends Cell Biol, 2003. 13(3): p. 137-45.
101. Lee, J., S. Giordano, and J. Zhang, *Autophagy, mitochondria and oxidative stress: cross-talk and redox signalling*. Biochem J. 441(2): p. 523-40.
102. Ma, X.H., et al., *Measurements of tumor cell autophagy predict invasiveness, resistance to chemotherapy, and survival in melanoma*. Clin Cancer Res. 17(10): p. 3478-89.
103. Cospers, P.F. and L.A. Leinwand, *Cancer causes cardiac atrophy and autophagy in a sexually dimorphic manner*. Cancer Res. 71(5): p. 1710-20.
104. Gurusamy, N. and D.K. Das, *Is autophagy a double-edged sword for the heart?* Acta Physiol Hung, 2009. 96(3): p. 267-76.
105. Criollo, A., et al., *Regulation of autophagy by the inositol trisphosphate receptor*. Cell Death Differ, 2007. 14(5): p. 1029-39.
106. Nave, B.T., et al., *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, 1999. 344 Pt 2: p. 427-31.

107. Bertino, E., et al., *Neonatal anthropometric charts: the Italian neonatal study compared with other European studies*. J Pediatr Gastroenterol Nutr. 51(3): p. 353-61.
108. Cuestas, E., et al., *[Is there any correlation between mothers birth weight with the first child birth weight?]*. Rev Fac Cien Med Univ Nac Cordoba, 2007. 64(3): p. 68-72.
109. Stamnes Koepf, U.M., et al., *Maternal pre-pregnant body mass index, maternal weight change and offspring birthweight*. Acta Obstet Gynecol Scand. 91(2): p. 243-9.
110. Kanai, Y., et al., *From SRY to SOX9: mammalian testis differentiation*. J Biochem, 2005. 138(1): p. 13-9.
111. Czech, D.P., et al., *The human testis-determining factor SRY localizes in midbrain dopamine neurons and regulates multiple components of catecholamine synthesis and metabolism*. J Neurochem. 122(2): p. 260-71.
112. Ely, D., et al., *Review of the Y chromosome, Sry and hypertension*. Steroids. 75(11): p. 747-53.
113. Dewing, P., et al., *Direct regulation of adult brain function by the male-specific factor SRY*. Curr Biol, 2006. 16(4): p. 415-20.
114. D'Souza, U.M., A. Kel, and F. Sluyter, *From transcriptional regulation to aggressive behavior*. Behav Genet, 2003. 33(5): p. 549-62.
115. Yuan, X., et al., *SRY interacts with and negatively regulates androgen receptor transcriptional activity*. J Biol Chem, 2001. 276(49): p. 46647-54.
116. Turner, M.E., et al., *Sry, more than testis determination?* Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol. 301(3): p. R561-71.
117. Araujo, C.L., et al., *Size at birth and height in early adolescence: a prospective birth cohort study*. Cad Saude Publica, 2008. 24(4): p. 871-8.
118. Araujo, C.L., et al., *Effect of birth size and proportionality on BMI and skinfold thickness in early adolescence: prospective birth cohort study*. Eur J Clin Nutr, 2009. 63(5): p. 634-9.
119. Wei, J.N., et al., *Birth weight correlates differently with cardiovascular risk factors in youth*. Obesity (Silver Spring), 2007. 15(6): p. 1609-16.
120. Goldman-Wohl, D., et al., *Expression profiling of autophagy associated genes in placentas of preeclampsia*. Placenta. 34(10): p. 959-62.
121. Chen, G.Q., et al., *[Effects and mechanisms of autophagy of trophoblast cells in severe preeclampsia]*. Xi Bao Yu Fen Zi Mian Yi Xue Za Zhi. 28(3): p. 294-6.
122. Fois, M., *"GENDER DIFFERENCES IN HUMAN SMOOTH MUSCLE CELLS AND RAT LIVER"* in *Dip. Scienze Biomediche*. 2012, Università degli Studi di Sassari: Sassari.