



UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI SASSARI

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

“Il destino delle cellule muscolari lisce vasali è controllato
dal genere”

Coordinatore: Prof. EUSEBIO TOLU

Tutore: Prof.ssa FLAVIA FRANCONI

Tesi di Dottorato di: Dr.ssa SILVIA CANU

ANNO ACCADEMICO 2008-2009

SOMMARIO

INTRODUZIONE	3
MATERIALI E METODI	12
Isolamento e coltura delle VSMC e trattamenti	12
Esposizione a radiazione UVB	13
Valutazione dello stato redox	14
Valutazione dell'attività enzimatica	14
Citologia analitica.	15
ACTINA CITOSCHELETRICA	15
ACTINA G E ACTINA F	15
ANALISI DEI NUCLEI	16
β -GALATTOSIDASI	16
H2AX FOSFORILATO	16
APOPTOSI	17
FAK	17
Test del distacco delle cellule dal substrato di adesione	17
Analisi western blot	17
ESPRESSIONE DI BECLINA 1, LC3 I E LC3 II	17
ESPRESSIONE DEI RECETTORI DEGLI ORMONI SESSUALI	18
Analisi statistica	18
RISULTATI E DISCUSSIONE	19
Stato redox nelle cellule di controllo	19
Citoscheletro nelle cellule di controllo	21
Destino cellulare nelle cellule di controllo	22
Recettori degli estrogeni e degli androgeni nelle cellule di controllo	28
Stato redox in condizioni di stress ossidativo	29
Citoscheletro in condizioni di stress ossidativo	29
Destino cellulare in condizioni di stress ossidativo	30
Recettori degli estrogeni e degli androgeni in condizioni di stress ossidativo	33

CONCLUSIONI	34
RINGRAZIAMENTI	37
BIBLIOGRAFIA	38

INTRODUZIONE

Le differenze di genere sono numerosissime, coinvolgono tutti gli organi ed apparati ed hanno importanti ripercussioni sull'incidenza, il decorso clinico, la diagnosi, la prognosi ed il trattamento, in termini di sicurezza ed efficacia, delle malattie. Le malattie cardiovascolari (MCV) ne costituiscono probabilmente l'esempio più eclatante, forse perché il più riconosciuto. La loro incidenza è in continua crescita sia nell'uomo che nella donna ma i tempi e i modi variano significativamente nei due sessi; diversi studi clinici, sperimentali ed epidemiologici enfatizzano il fatto che le differenze di genere sono rintracciabili nelle manifestazioni delle MCV (Legato, 2004; Hirakawa *et al*, 2007). In linea generale si può affermare che nelle donne le MCV si sviluppano dai 10 ai 20 anni più tardi rispetto agli uomini oppure, nel caso l'età sia paragonabile, si è spesso visto che la gravità delle patologie nelle donne è molto maggiore (Regitz-Zagrosek, 2006). Inoltre rispetto all'uomo, dove l'insorgenza e la progressione delle MCV sono costanti con l'avanzare dell'età, nella donna hanno un'incidenza che varia a seconda dello stato biologico del soggetto, aumentando in maniera evidente durante la menopausa. La prevalenza dell'ipertensione, per esempio, è maggiore negli uomini finché, raggiunta l'età della menopausa, le donne ne mostrano un drammatico aumento.

In molti di questi processi giocano un ruolo chiave diversi eventi, fra cui la crescita, l'apoptosi e la migrazione delle cellule muscolari lisce vasali (VSMC), che contribuiscono al processo di rimodellamento della parete vasale.

Numerosi studi hanno dimostrato un coinvolgimento importante in questi eventi da parte delle specie reattive dell'ossigeno (ROS).

L'anione superossido (O_2^-) è la specie reattiva primaria ed è prodotto da diverse ossidasi, fra cui la NAD(P)H ossidasi e la xantinaossidasi, dalle lipoossigenasi, dalle cicloossigenasi, dal citocromo P450, dal disaccoppiamento della catena respiratoria mitocondriale e della nitrossido sintasi. A sua volta è ridotto a perossido d'idrogeno (H_2O_2) attraverso una reazione di dismutazione spontanea,

soprattutto a bassi valori di pH, o attraverso l'azione della superossido dismutasi (SOD); la reazione può continuare fino alla formazione del radicale idrossilico (Paravicini e Touyz, 2006; Genestra, 2007; Malorni *et al*, 2007). O_2^- e H_2O_2 sono fra i ROS più importanti nella biologia del sistema cardiovascolare. La produzione dei ROS è controbilanciata da enzimi antiossidanti come la SOD, la catalasi, la glutatione perossidasi, le tioredoxine e le perossiredoxine ed è tamponata da molecole antiossidanti come il glutatione ridotto (GSH) (Papaharalambus e Griendling, 2007) (Fig. 1).

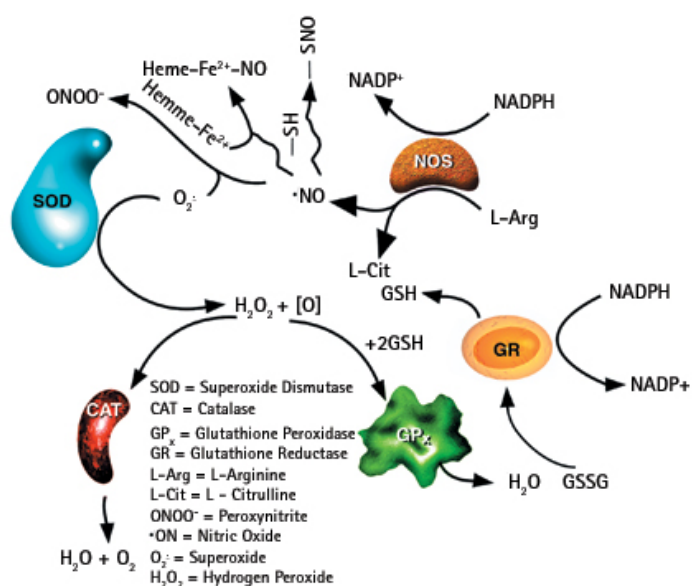


Figura 1. Principali enzimi e molecole coinvolte nella formazione ed eliminazione dei ROS (http://www.merckbiosciences.co.uk/html/cbc/oxidative_stress.htm)

A basse concentrazioni, i ROS hanno un ruolo fisiologico nella parete vasale e la loro produzione e rimozione è finemente controllata dai sistemi antiossidanti. In queste condizioni si comportano come importanti molecole segnale coinvolte in diversi aspetti della funzione vascolare come, ad esempio, la proliferazione ed il tono delle VSMC e quindi il fisiologico rimodellamento vasale. Tuttavia, quando i livelli superano i valori fisiologici e le difese antiossidanti sono insufficienti, i ROS provocano stress ossidativo. Alti livelli di O_2^- , il conseguente accumulo di H_2O_2 e la diminuzione della biodisponibilità di nitrossido (NO), a causa dell'avidità

reazione di O_2^- con quest'ultimo per formare il perossinitrito, giocano un ruolo chiave nel rimodellamento vascolare e, più in generale, nelle modificazioni funzionali e strutturali che avvengono nella parete vasale nel corso dell'inizio e della progressione di diverse malattie vascolari, incluse ipertensione e aterosclerosi (Fortuno *et al*, 2005; Miller *et al*, 2007). Inoltre, il perossinitrito è un forte ossidante che attacca proteine, lipidi e acidi nucleici, causando danno cellulare (Fortuno *et al*, 2005). Elevati livelli di ROS hanno effetti deleteri nella parete vascolare, quali la promozione dell'apoptosi delle cellule endoteliali e delle VSMC, dell'espressione di molecole di adesione infiammatorie e dell'ipertrofia e iperplasia delle VSMC (Miller *et al*, 2007). Alte concentrazioni di H_2O_2 sono proapoptotiche, mentre basse concentrazioni stimolano la crescita e la differenziazione (Touyz e Schiffrin, 2004). I ROS, inoltre, modulano la struttura vascolare attraverso l'aumento della deposizione delle proteine della matrice extracellulare, come il collagene e la fibronectina. O_2^- e H_2O_2 influenzano l'attività delle metalloproteinasi 2 e 9 (MMP2 e MMP9) vascolari, che promuovono la degradazione della membrana basale e dell'elastina, rispettivamente. I ROS inducono l'espressione di molecole proinfiammatorie, di molecole di adesione, la perossidazione lipidica ed i processi di migrazione cellulare, contribuendo in questo modo al rimodellamento dei vasi. Anche il tono vasomotore potrebbe essere modulato attraverso l'effetto diretto dei ROS: questi sembrano infatti controllare la contrazione ed il rilasciamento a seconda del letto vascolare e del tipo di specie generate (Touyz e Schiffrin, 2004).

Come sopra accennato, gli eventi cellulari alla base di patologie del sistema cardiovascolare, quali ipertensione e aterosclerosi, vedono il coinvolgimento di diversi tipi cellulari, fra cui le VSMC, attraverso processi di crescita/proliferazione, apoptosi/anoikia, migrazione, infiammazione e fibrosi (Frohlich e Lear, 2002). Il presente lavoro di tesi è stato condotto su colture primarie di VSMC con lo scopo di studiare, in funzione del sesso/genere, la risposta allo stress ossidativo in termini di destino cellulare.

Abbiamo scelto di valutare la risposta allo stress ossidativo perché lo **stato redox** (i) sembra essere genere-dipendente e (ii) influisce profondamente sul destino cellulare.

È nota l'esistenza di differenze di sesso/genere, per lo più sotto il controllo degli ormoni sessuali, nello stato redox intracellulare. Per esempio, il 17 β -estradiolo riduce l'attività della NAD(P)H ossidasi in VSMC mentre il progesterone ne provoca l'incremento (Malorni *et al*, 2007). Studi clinici e sperimentali suggeriscono che l'espressione e l'attività di SOD siano più alte nelle femmine che nei maschi e siano regolate dai livelli di estrogeni e progesterone; inoltre sono state riscontrate differenze di genere che coinvolgono la Cu,Zn SOD: le differenze nel tono miogenico, trovate in animali di controllo, non sono più rintracciabili negli animali knockout per la Cu,Zn SOD (Malorni *et al*, 2007). Anche l'attività del Citocromo P450, una superfamiglia di enzimi mediatori della trasformazione ossidativa di composti endogeni ed esogeni, è modulata dagli ormoni sessuali in maniera tessuto-specifica. Analogamente, gli effetti degli estrogeni sul GSH sono molto complessi e sembrano essere tessuto-specifici (Malorni *et al*, 2007). I mitocondri sono un'importante sorgente di GSH e, allo stesso tempo, la fonte principale di specie reattive all'interno della cellula e hanno un ruolo centrale nel determinare il destino cellulare, attraverso la regolazione dei processi di sopravvivenza e di morte. Gli ormoni sessuali sembrano essere coinvolti anche nella mitocondriogenesi; infatti il testosterone, il 17 β -estradiolo ed il progesterone modulano l'espressione di alcuni fattori nucleari coinvolti nel controllo della biogenesi mitocondriale e nella funzione termogenica (Malorni *et al*, 2007).

Lo stato redox influisce profondamente sul destino cellulare che, a sua volta, è alla base della fisiopatologia di diversi sistemi, incluso quello cardiovascolare. In molti processi patologici l'eccessiva produzione di ROS e/o l'inadeguata efficienza dei meccanismi antiossidanti portano all'accumulo irreversibile del danno e le cellule dei tessuti rigenerativi possono contare su uno di due

meccanismi per evitare la replicazione: l'arresto permanente del ciclo cellulare (senescenza) oppure la morte programmata (Vicencio *et al*, 2008).

La **senescenza** cellulare è considerata, normalmente, una risposta adattativa che contribuisce a prolungare la vita di un organismo ed occorre in seguito a diversi eventi, quali l'accorciamento progressivo dei telomeri, danni al DNA in siti non telomerici, un eccesso di segnali mitogenici, inclusi quelli prodotti dagli oncogeni, stress non genotossici, quali le modificazioni dell'organizzazione della cromatina, lo stress ossidativo e, probabilmente, stimoli di origine ancora sconosciuta (Campisi e d'Adda di Fagagna, 2007; van Heemst *et al*, 2007). È stato dimostrato che cellule in coltura a concentrazioni di ossigeno prossime a quelle fisiologiche non vanno in senescenza mentre lo fanno se in presenza di concentrazioni più alte, mostrando anche un aumento considerevole di mutazioni a carico del DNA. Queste osservazioni sono in accordo con altri studi che suggeriscono che la senescenza potrebbe essere ritardata, in cellule umane in coltura, utilizzando basse concentrazioni di ossigeno (Colavitti e Finkel, 2005). La relazione fra gli ossidanti intracellulari e la senescenza è rinforzata dall'osservazione che il trattamento con H₂O₂ può portare rapidamente alla senescenza cellule in coltura primaria e sembra che alte concentrazioni di ROS favoriscano l'apoptosi mentre basse concentrazioni portino alla senescenza. L'aggiunta di perossido d'idrogeno a concentrazioni subletali induce una serie di modificazioni biochimiche intracellulari fra cui, in particolare, l'aumento dei livelli della proteina p53 e l'induzione del regolatore del ciclo cellulare p21/waf-1 con conseguente arresto in fase G1 (Colavitti e Finkel, 2005).

Tra i processi di morte cellulare, i più studiati sono l'apoptosi e l'autofagia, finora note anche come morte cellulare di tipo I e di tipo II rispettivamente (Galluzzi *et al*, 2007).

L'**apoptosi** è la forma di morte cellulare programmata meglio descritta ed implica, attraverso stimoli di varia natura quali, ad esempio, danni al DNA, stress a livello del reticolo endoplasmico e carenza di nutrienti, l'attivazione di proteasi

e altre idrolasi che portano a rapida degradazione di tutte le strutture cellulari (Galluzzi *et al.*, 2007). Qualora uno stimolo sia capace d'indurre, in cellule aderenti, perdita di adesione o adesione inappropriata, l'apoptosi che ne risulta prende il nome di *anoikia*, termine di etimologia greca che significa "senz'atetto". Questo processo apoptotico è stato descritto in diversi tipi cellulari e, sebbene la maggior parte della letteratura attribuisca alla resistenza all'anoikia un significato profondo nella patogenesi, progressione e diffusione dei tumori attraverso i processi metastatici, altre patologie sembrano essere il risultato di una sua aberrante induzione (Chiarugi e Giannoni, 2008). Infatti, l'aumento dell'anoikia, se non è compensato da un corretto "recupero" cellulare, è probabilmente responsabile di patologie degenerative cardiovascolari, come avviene per il distacco dei cardiomiociti nell'insufficienza cardiaca, la rottura della placca nei processi aterosclerotici e la perdita di cellule muscolari lisce negli aneurismi e nelle vene varicose (Chiarugi e Giannoni, 2008). I ROS possono indurre apoptosi, come dimostrato in diversi tipi cellulari. Il *Transforming Growth Factor β* (TGF- β), per esempio, induce apoptosi in epatociti fetali attraverso la produzione di ROS a livello mitocondriale (Herrera *et al.*, 2001). Il timerosal, un conservante ampiamente utilizzato in numerosi prodotti, inclusi i vaccini, può portare, in cellule HeLa S, alla formazione di ROS, incluso il perossido d'idrogeno, e ad una stimolazione acuta (entro pochi minuti) della fosforilazione in tirosina di FAK (*Focal adhesion kinase*), una chinasi che promuove il mantenimento dell'adesione al substrato ed il rimodellamento del citoscheletro; un'esposizione più prolungata (24 ore) porta a morte per apoptosi (Mian *et al.*, 2008). Analoghi risultati sono stati ottenuti sulle cellule muscolari lisce vasali (VSMC): alte concentrazioni di H₂O₂ (da 500 μ M a 1 mM) inducono apoptosi mentre concentrazioni più basse (100 μ M) causano senescenza per arresto del ciclo cellulare in fase G1 (Yung *et al.*, 2006). L'anione superossido (O₂⁻), generato per attività della NAD(P)H ossidasi, gioca un ruolo duplice nell'equilibrio fra sopravvivenza ed apoptosi in cellule endoteliali umane da vena ombelicale (HUVEC). È stato osservato che le LDL ossidate stimolano, a basse concentrazioni, la proliferazione delle HUVEC mentre causano apoptosi a concentrazioni più elevate ed entrambi gli effetti sono mediati

dalla formazione di O_2^- . Il coinvolgimento di O_2^- in questi processi è stato suggerito dal fatto che l'apoptosi indotta da LDL ossidate aumenta in seguito a trattamento con dietil-ditio-carbammato, un inibitore della SOD, e si riduce per aumento di SOD o di catalasi. In alcuni casi, elevati livelli di ROS sembrano essere alla base della morte cellulare per anoikia; infatti, il trattamento con l'antiossidante N-acetilcisteina riduce i livelli delle specie ossidanti e protegge le HUVEC dalla morte per anoikia (Yung *et al*, 2006).

L'**autofagia**, da sempre ritenuta un processo di morte cellulare, solo recentemente comincia ad essere interpretata come una possibile ed utile strategia di sopravvivenza, per esempio per cellule in condizioni di carenza di amminoacidi (Mizushima *et al*, 2008). È caratterizzata dalla capacità delle cellule di inglobare e digerire materiale e organelli intracellulari e funziona perciò da meccanismo di turnover per eliminare organelli danneggiati, patogeni intracellulari e porzioni superflue di citoplasma, così come proteine vecchie, aberranti o aggregate (Vicencio *et al*, 2008). La cellula muore per autofagia soltanto quando tutte le risorse intra- ed extracellulari sono esaurite (Tinari *et al*, 2008). Mentre l'apoptosi comporta la demolizione rapida di tutte le strutture e gli organelli cellulari, l'autofagia è un fenomeno lento e spazialmente circoscritto, in cui parti di citoplasma sono sequestrate all'interno di vacuoli e successivamente digerite dalle idrolasi lisosomiali. La relazione funzionale fra l'apoptosi e l'autofagia è complessa e quest'ultima può contribuire alla morte della cellula oppure, al contrario, costituire una difesa contro lo stress acuto, come nel caso della mancanza di nutrienti (Galluzzi *et al*, 2007). Il turnover autofagico è considerato come un possibile meccanismo di adattamento allo stress ossidativo. Alcune evidenze in tal senso emergono da studi condotti sui tessuti neonatali. Infatti i tessuti fetali sono relativamente ipossici se confrontati con quelli dell'adulto e, al momento della nascita, sono esposti improvvisamente ad un ambiente ricco d'ossigeno a causa dell'inizio della respirazione, del passaggio dalla circolazione fetale a quella dell'adulto e dell'aumento del consumo d'ossigeno in diversi tessuti. Questo porta ad un incremento dello stress ossidativo, come dimostrato

dal drammatico aumento dell'ossidazione del glutatione, che, insieme alle ridotte difese antiossidanti del neonato, può portare a danni da radicali liberi. Infatti i nati pretermine, soprattutto quando esposti ad elevate concentrazioni d'ossigeno, sono particolarmente suscettibili allo stress ossidativo ed alle conseguenti patologie. È verosimile che, analogamente ad altre situazioni, le proteine ossidate inducano una risposta autofagica al momento della nascita (Schiaffino *et al*, 2008). Il ruolo protettivo dell'autofagia in questi frangenti è dimostrato dal fatto che alcune proteine indotte dallo stress ossidativo, fra cui la glutatione S-transferasi, aumentano nel fegato di topi knockout per Atg7, proteina coinvolta nel processo di elongazione della vescicola autofagosomale, suggerendo che una diminuzione dei normali processi autofagici porti a stress ossidativo, contribuendo così al danno epatico (Schiaffino *et al*, 2008). È stato visto che il fattore di trascrizione FoxO3, coinvolto nell'induzione dell'autofagia nel muscolo scheletrico, è attivato dallo stress ossidativo e protegge le cellule dai ROS inducendo l'espressione genica di proteine di difesa antiossidante come la SOD. Cellule staminali ematopoietiche carenti in FoxO3 mostrano un marcato aumento dei ROS a causa della diminuzione dell'espressione di enzimi antiossidanti e danno da radicali liberi. Simili risultati sono stati ottenuti in cellule del sistema ematopoietico adulto (Schiaffino *et al*, 2008).

Il destino cellulare, come precedentemente accennato, ha un ruolo fondamentale nei processi legati a MCV come ipertensione e aterosclerosi. È noto, infatti, che nel rimodellamento associato all'ipertensione si possono riscontrare segni di accelerata proliferazione ed ipertrofia delle VSMC (Shaw e Xu, 2003; Rzuclidlo, 2009) e, nel processo aterosclerotico, l'abnorme proliferazione di esse porta all'iniziale "strozzatura" dell'arteria mentre l'apoptosi è sospettata di portare alla rottura della placca (Bennett, 1999) e di essere coinvolta nei processi di calcificazione vascolare (Son *et al*, 2008).

Sulla base di queste premesse, pertanto, abbiamo proceduto con la valutazione, in VSMC di origine maschile e femminile, dello stato redox in assenza ed in presenza di uno stimolo capace d'indurre stress ossidativo e la sua influenza sui

processi di senescenza, apoptosi e autofagia con lo scopo di cogliere, se presenti, differenze legate al sesso e di analizzarne i meccanismi alla base.

MATERIALI E METODI

Isolamento e coltura delle VSMC e trattamenti

Le VSMC sono state isolate dall'aorta discendente di ratti Sprague Dawley maschi e femmine del peso di 250 g circa, allevati con cibo ed acqua ad libitum, con un ciclo di luce e buio di 10-14 ore e sacrificati mediante dislocazione cerebrale (Coinu *et al*, 2006). Immediatamente dopo il decesso, si è proceduto al prelievo del tratto di aorta discendente, compreso tra l'arco aortico e la biforcazione delle arterie renali, ed il vaso è stato trasferito in tampone fosfato (PBS) sterile freddo (+4°C). Dal segmento aortico per prima cosa è stato rimosso meccanicamente lo strato connettivale esterno e i piccoli vasi sanguigni, quindi il vaso è stato aperto longitudinalmente. L'aorta nuda è stata immersa in una soluzione allo 0,15% di collagenasi di tipo II in PBS e posta in incubazione per 20 minuti a 37 °C in atmosfera di CO₂.

L'aorta è stata quindi trasferita in 10 ml di soluzione di collagenasi 0,15% in DMEM (GIBCO-Invitrogen, MI, Italy) e antibiotico (gentamicina 50 µg/ml) ed è stata finemente sminuzzata. La sospensione così ottenuta è stata incubata a 37°C per altri 20 minuti. Dopo l'incubazione ed un passaggio in centrifuga a 200 g per 5 minuti, il surnatante è stato rimosso e il pellet risospeso in DMEM completo (addizionato con 10% di siero fetale bovino (FBS), 1% di aminoacidi non-essenziali, 100 unità/ml di penicillina e 100 ng/ml di streptomicina).

I frammenti di aorta sono stati incubati per una decina di giorni a 37 °C in atmosfera di CO₂ (vedi Fig. 2)

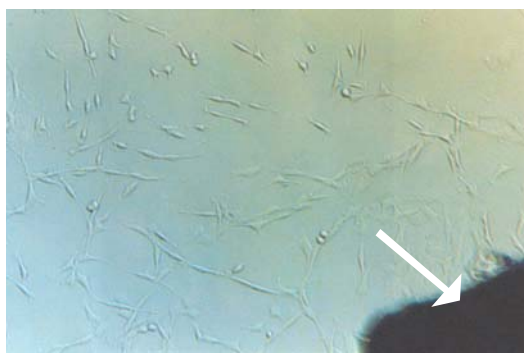


Figura 2. VSMC in coltura. La freccia indica il frammento di aorta da cui migrano le cellule verso la superficie di crescita.

Quindi le cellule sono state trattate con una soluzione di tripsina allo 0,25% in EDTA 1 mM per 3-5 minuti a 37 °C in atmosfera di CO₂ e la sospensione è stata filtrata con cell strainer (Falcon) per separare le VSMC dai frammenti di aorta. Il filtrato è stato centrifugato per 5 minuti a 200xg. Le colture sono state mantenute in terreno DMEM completo (addizionato con 10% di FBS, 1% di aminoacidi non-essenziali, 100 unità/ml di penicillina e 100 ng/ml di streptomina). Per le analisi al microscopio in fluorescenza le cellule sono state seminate su vetrini tondi del diametro di 13 mm all'interno di pozzetti separati. In questo lavoro sono state utilizzate cellule a passaggio di crescita compreso fra 2 e 4. Tuttavia abbiamo riscontrato alcune differenze di genere, per esempio nello stato redox e nell'espressione dei recettori degli estrogeni, fino al 14°/16° passaggio.

Per la deplezione del GSH, le VSMC, sei ore prima dell'irradiamento con UVB, sono state trattate con L-buthionine-[S,R]-sulfoximine (BSO) 2.5 mM, un inibitore della sintesi della γ -glutamilsteina. Il BSO è stato completamente rimosso prima dell'esposizione alle radiazioni UVB.

L'inibitore di FAK (1,2,4,5-benzentetrammina tetraidrocloruro, Tocris Bioscience, Bristol, UK) è stato aggiunto alle cellule 1 ora prima dell'esposizione a UVB utilizzando due differenti concentrazioni (0.5-1 μ M).

Esposizione a radiazione UVB

Le cellule sono state esposte ad una singola dose di radiazione UVB (200 mJ/cm²): a 24 ore dalla semina, le cellule, in uno strato sottile di PBS (pH 7.4), sono state esposte alla radiazione usando una lampada Philips TL 20W/12 (Philips, Netherlands), collocata a 10 cm dalla superficie di adesione. Le radiazioni non-UVB sono state schermate utilizzando un filtro Kodacell TL 401 (Kodak). In queste condizioni, la densità del flusso radiante è stata misurata con un'apparecchiatura Osram Centra radiometer. Le misure radiometriche sono state registrate per ciascun esperimento (Straface *et al*, 2001) 2001). I campioni di controllo sono stati sottoposti alle stesse condizioni, in assenza delle radiazioni UVB.

Valutazione dello stato redox

Le cellule (5×10^5) sono state incubate con 1 $\mu\text{mol/L}$ di diidroetidio (DHE, Molecular Probes) o con 10 $\mu\text{mol/L}$ di diidrorodamina 123 (DHR 123, Molecular Probes) per 15 minuti a 37°C (Frey, 1997). Il DHE è un derivato ridotto dell'etidio, non fluorescente, che viene ossidato dall' O_2^- dando una fluorescenza rossa. DHR 123 diffonde liberamente nelle cellule dove viene ossidato prevalentemente dall' H_2O_2 dando una fluorescenza verde (Frey, 1997). Il GSH intracellulare è stato rilevato con monoclorobimano (MBC, Molecular Probes, Leiden, The Netherlands). Il MBC è stato disciolto in dimetilsolfossido e la soluzione, preparata immediatamente prima dell'uso, è stata direttamente addizionata alle colture cellulari (Sebastia *et al*, 2003). La fluorescenza dei campioni è stata registrata con un citometro LRS II dotato di laser ad argon a 488 nm e di laser UVB. I dati ottenuti sono stati analizzati con il software DIVA (B&D) sottraendo al valore ottenuto quello registrato prima dell'aggiunta di MBC. Le mediane degli istogrammi delle intensità della fluorescenza sono state usate per fornire delle stime semi-quantitative del contenuto di GSH e della produzione di ROS.

Valutazione dell'attività enzimatica

Le attività della SOD e della catalasi sono state misurate utilizzando kit spettrofotometrici (Cayman Chemical Company, USA). Il kit utilizzato per misurare l'attività della SOD misura differenti tipi di SOD (Cu/Zn, Mn-SOD e Fe-SOD) ed utilizza i sali di tetrazolio per individuare i radicali superossido generati dalla xantina ossidasi e dall'ipoxantina ossidasi fornite nel kit. Un'unità di SOD è definita come la quantità d'enzima necessaria per produrre la dismutazione del 50% dei radicali superossido. L'assorbanza dei campioni (misurata in triplicato per ciascuna condizione sperimentale) è stata letta a 450 nm in micropiastra. L'attività della SOD (espressa in U/ml) è stata ottenuta per comparazione con campioni standard.

Il kit per la catalasi utilizza la reazione dell'enzima con il metanolo in presenza di una concentrazione ottimale di H₂O₂. La formaldeide prodotta è stata misurata spettrofotometricamente usando come cromogeno il 4-ammino-3-idrazino-5-mercapto-1,2,4-triazolo. L'assorbanza dei campioni (in triplicato) è stata letta a 450 nm in micropiastra. L'attività della catalasi (espressa come nmol/min/ml) è stata ottenuta per comparazione con campioni standard.

Citologia analitica.

ACTINA CITOSCHELETRICA

Le cellule sono state fissate con paraformaldeide al 4% e permeabilizzate con 0.5% Triton X-100 (Sigma) e quindi colorate con fluoresceina-falloidina (Sigma Chemical Co, St. Louis, MO, USA) a 37°C per 30 minuti. Quindi i campioni sono stati montati su vetrini con glicerolo-PBS (2:1) ed analizzati al microscopio a fluorescenza. Per l'analisi quantitativa sono state contate almeno 300 cellule (ingrandimento 500X).

ACTINA G E ACTINA F

Le cellule sono state staccate con tripsina-EDTA e lavate con PBS. L'actina è stata stabilizzata mediante incubazione per 3 minuti a 4°C in tampone salino (10 mM TRIS e 0.15 M NaCl pH 7.4), 0.01% Triton X-100, 2mM MgCl₂, 0.2 Ditioneritritolo e 10% glicerolo (v/v). Dopo lavaggio in PBS, il pellet è stato suddiviso in due parti:

- Marcatura di actina G: le cellule sono state trattate con DNasi I coniugata con fluoresceina (40ug/ml con 10%glicerolo) per 30 minuti a temperatura ambiente. Dopo lavaggio in PBS sono state fissate con paraformaldeide per 15 minuti a temperatura ambiente, lavate in PBS e sottoposte ad analisi citofluorimetrica.
- Marcatura di actina F: le cellule sono state fissate con paraformaldeide per 15 minuti a temperatura ambiente, permeabilizzate con Triton X-100 0.5%, marcate con Falloidina-FITC per 30 minuti a temperatura ambiente ed infine analizzate al citofluorimetro.

Le mediane degli istogrammi delle intensità della fluorescenza sono state usate per fornire le stime semi-quantitative del contenuto di actina G ed actina F.

ANALISI DEI NUCLEI

Le cellule sono state fissate con paraformaldeide al 4% e permeabilizzate con 0.5% Triton X-100 (Sigma) e quindi trattate con Hoechst 33258 (Sigma). Quindi i campioni sono stati montati su vetrini con glicerolo-PBS (2:1) ed analizzati al microscopio a fluorescenza. Per l'analisi quantitativa sono state contate almeno 300 cellule (ingrandimento 500X).

β -GALATTOSIDASI

Per la marcatura della β -galattosidasi, le cellule sono state fissate con paraformaldeide al 4% e permeabilizzate con 0.5% Triton X-100 (Sigma) e quindi incubate con un anticorpo monoclonale (Immunological Sciences) per 30 minuti a 37°C. Dopo il lavaggio con PBS, le cellule sono state incubate con un anticorpo secondario coniugato con FITC (Sigma). Dopo il lavaggio con PBS è stata condotta l'analisi citofluorimetrica con FACScan (Becton Dickinson) equipaggiato con un laser ad argon a 488 nm. Sono stati acquisiti almeno 20000 eventi. Le mediane degli istogrammi dell'intensità della fluorescenza sono state usate per fornire un'analisi semi-quantitativa. Al fine di assicurare la specificità della colorazione, sono stati utilizzati, come controllo negativo, degli anticorpi monoclonali FITC-coniugati (Sigma).

H2AX FOSFORILATO

Per la marcatura dell'istone H2AX fosforilato, le cellule sono state fissate in acetone/metanolo 1/1 (v/v) ed incubate a temperatura ambiente con un anticorpo policlonale anti H2AX (Abcam, Cambridge, UK) per 30 minuti. Dopo il lavaggio con PBS, le cellule sono state incubate con un anticorpo secondario coniugato con FITC (Sigma), quindi lavate con PBS. Quindi i campioni sono stati montati su vetrini con glicerolo-PBS (2:1) ed analizzati al microscopio a fluorescenza. Per l'analisi quantitativa sono state contate almeno 300 cellule (ingrandimento 500X).

APOPTOSI

La percentuale di cellule apoptotiche è stata valutata utilizzando il kit Annexin V (MBL, International Corporation, Woburn, USA) ed analizzando le cellule positive all'annexina V/ioduro di propidio al citofluorimetro FACScan (Becton Dickinson) equipaggiato con un laser ad argon a 488 nm.

FAK

Per la marcatura di FAK (totale e fosforilata), le cellule sono state fissate con paraformaldeide al 4% e permeabilizzate con 0.5% Triton X-100 (Sigma) e quindi incubate con un anticorpo monoclonale (Chemicon, Tecumala CA, USA) per 30 minuti a 37°C e, dopo lavaggio con PBS, incubate con un anticorpo secondario coniugato con FITC (Sigma). Quindi i campioni sono stati analizzati al citofluorimetro FACScan (Becton Dickinson) equipaggiato con un laser ad argon a 488 nm. Per le immagini rappresentative della distribuzione di p-FAK, i campioni sono stati montati su vetrini con glicerolo-PBS (2:1) ed analizzati al microscopio a fluorescenza.

Test del distacco delle cellule dal substrato di adesione

Le cellule (2×10^5) sono state seminate in dischi Petri e mantenute a 37 °C in atmosfera di CO₂. 24 ore dopo l'esposizione a UVB, le cellule flottanti nel medium di coltura e quelle adese alla superficie di crescita sono state raccolte separatamente e contate al microscopio invertito ad ingrandimento 500X.

Analisi western blot

ESPRESSIONE DI BECLINA 1, LC3 I E LC3 II

Le cellule sono state lisate in RIPA buffer (Tris-HCl 100 mM pH 8, NaCl 150 mM, 1% Triton X-100, MgCl 1 mM) in presenza di miscela completa di inibitori delle proteasi (Sigma Chemical Co, St. Louis, MO, USA). Le proteine totali sono state quantificate con metodo Bradford. Le proteine (25 µg/lane) sono state risolte in SDS-PAGE 12 % e quindi trasferite su membrana PVDF. Le membrane sono

state marcate con i seguenti anticorpi: policlonale anti-LC 3 (MBL, International Corporation, Woburn, USA), monoclonale anti-Bcclina 1 (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA) e anti- α tubulina (Sigma). La rivelazione è stata fatta utilizzando anticorpi secondari (monoclonali o policlonali) coniugati con HRP e successiva rivelazione con sistema ECL (Pierce, Rockford, IL).

ESPRESSIONE DEI RECETTORI DEGLI ORMONI SESSUALI

Le cellule sono state lisate e solubilizzate (in Tris 0.125 M pH 6.8, contenente 10% (p/v) SDS, fluoruro di fenilmetilsulfonile 1 mM, 5 μ g/ml di leupeptina) e quindi portate a 90°C per 2 minuti. Le proteine totali sono state quantificate con Bradford assay. Le proteine (20 μ g/lane) sono state risolte in SDS-PAGE 10 % e quindi trasferite su membrana di nitrocellulosa. Le membrane sono state marcate con i seguenti anticorpi: anti-ER α MC20 (C-terminus, Santa Cruz, CA, USA), anti-ER β L20 (C-terminus, Santa Cruz, CA, USA), anti-AR (Abcam, Cambridge, UK), anti-tubulina (MP Biomedical, LLC, Solon, OH, USA). Le reazioni degli anticorpi sono state visualizzate in chemiluminescenza con Western Blotting detection reagent (Amersham Biosciences, Little Chalfont, UK).

I risultati ottenuti dall'analisi densitometrica sono espressi come unità arbitrarie (u.a.).

Analisi statistica

I risultati citofluorimetrici sono stati analizzati con il test non parametrico Kolmogorov-Smirnov usando il software Cell Quest. Sono stati acquisiti almeno 20000 eventi.

I dati morfometrici e quelli ricavati dalle analisi densitometriche, ottenuti dalla media di almeno 4 esperimenti separati, sono stati analizzati col test *t* di Student. Sono state considerate significative soltanto le differenze con $P < 0.05$.

RISULTATI E DISCUSSIONE

Stato redox nelle cellule di controllo

Lo stato redox cellulare, analizzato con l'utilizzo della citofluorimetria quantitativa e analisi spettrofotometriche, indica chiaramente la presenza di differenze basali fra le VSMC da animali maschi e femmine (MVSMC e FVSMC). Infatti, nelle cellule di controllo, i livelli sia d'idrogeno perossido (Figura 3A) che di anione superossido (Figura 3B) sono significativamente superiori nelle MVSMC che nelle FVSMC.

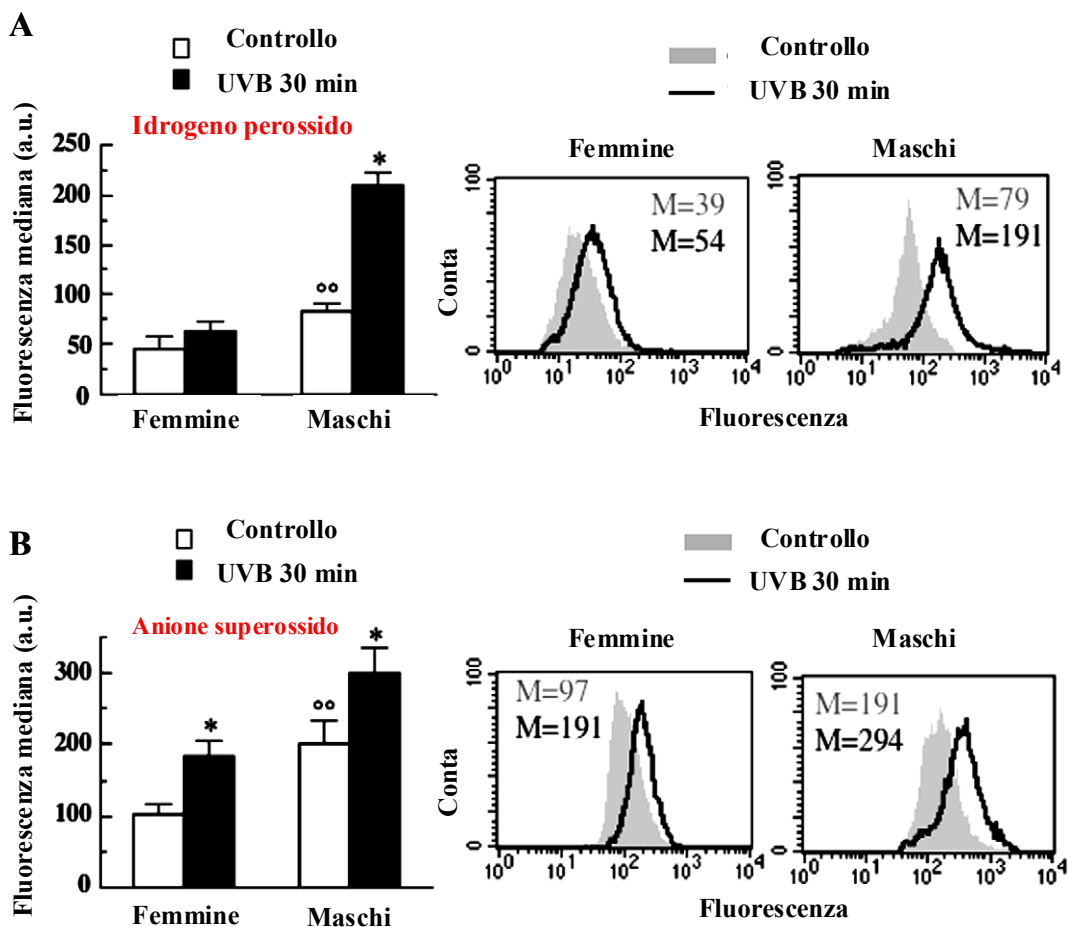


Figura 3. Analisi citofluorimetrica della produzione di idrogeno perossido (A) e anione superossido (B) in condizioni basali e dopo irradiazione con UVB. I valori riportati rappresentano la fluorescenza mediana. Nella colonna a sinistra è riportata la media dei risultati ottenuti da quattro esperimenti indipendenti \pm E.S. Nella colonna a destra sono mostrati i risultati ottenuti in esperimenti rappresentativi. (°°) $P < 0.01$ tra VSMC da maschi vs femmine; (*) $P < 0.01$ fra VSMC irradiate con UVB e cellule di controllo.

Inoltre, i livelli di glutatione ridotto (GSH) sono superiori nelle FVSMC (Fig. 4A). Il GSH è una specie antiossidante perché mette a disposizione delle specie ossidanti un elettrone, preservando in questo modo numerose macromolecole intracellulari dal danno ossidativo. Tuttavia non è l'unico sistema che la cellula utilizza per il mantenimento dell'equilibrio redox. Infatti, diversi enzimi antiossidanti contribuiscono alle difese della cellula. Fra queste vi sono la SOD e la catalasi. L'analisi spettrofotometrica ha mostrato che l'attività enzimatica sia di SOD che di catalasi è significativamente più alta nelle FVSMC che nelle MVSMC (Fig. 4B e 4C).

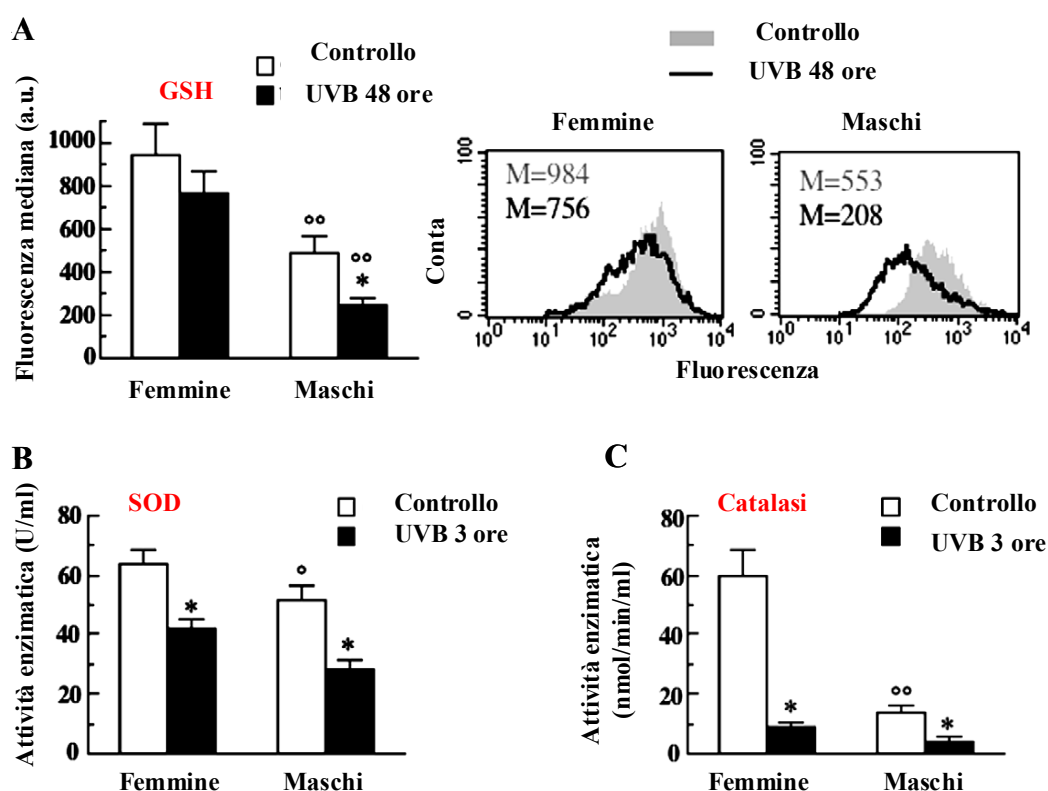


Figura 4. Analisi citofluorimetrica dei livelli di GSH (A) e spettrofotometrica dell'attività di SOD (B) e catalasi (C) in condizioni basali e dopo irradiazione con UVB. (A) I valori riportati rappresentano la fluorescenza mediana; nella colonna a sinistra è riportata la media dei risultati ottenuti da quattro esperimenti indipendenti \pm E.S. Nella colonna a destra sono mostrati i risultati ottenuti in esperimenti rappresentativi. (°) $P < 0.05$ tra VSMC da maschi vs femmine; (°°) $P < 0.01$ tra VSMC da maschi vs femmine; (*) $P < 0.01$ fra VSMC irradiate con UVB e cellule di controllo.

Complessivamente, le VSMC isolate da femmine mostrano di avere un bilancio redox più favorevole rispetto alla controparte maschile.

Citoscheletro nelle cellule di controllo

Il citoscheletro, responsabile della forma e della polarità della cellula e dell'interazione col substrato di adesione, è uno dei bersagli della produzione di ROS. Perciò abbiamo condotto esperimenti per valutare la distribuzione e l'organizzazione dell'actina. Le analisi indicano che, in condizioni basali, i filamenti di actina appaiono organizzati in fibre sottili ed orientate attraverso il citoplasma in maniera simile tra FVSMC e MVSMC (Fig. 5A) e non mostrano significative differenze di sesso nella presenza di cross-link (Fig. 5B).

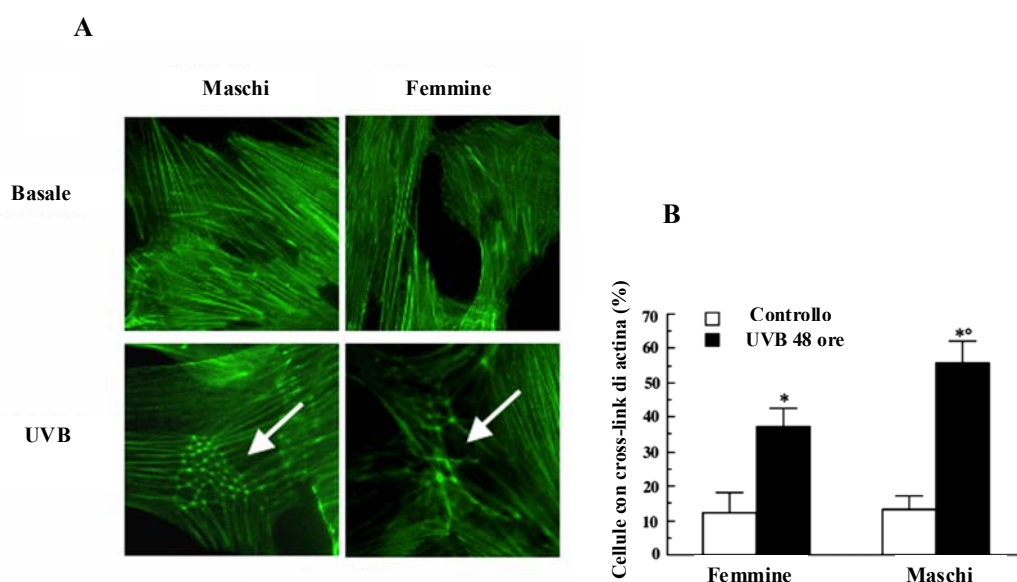


Figura 5. (A) Analisi in microscopia a fluorescenza del citoscheletro di actina in cellule colorate con FITC-falloidina. Nelle cellule non trattate (pannello superiore) i filamenti di actina F appaiono organizzati in fibre sottili ed orientate. Dopo esposizione a UVB si verifica una marcata riorganizzazione dei filamenti (pannello inferiore) soprattutto nelle MVSMC. Le frecce indicano i cross-link di actina. (B) Analisi morfometrica dei cross-link di actina in FVSMC e MVSMC prima e dopo esposizione a UVB. (*) $P < 0.01$ tra cellule trattate con UVB e di controllo; (°) $P < 0.01$ fra FVSMC trattate e MVSMC trattate.

Inoltre, le FVSMC esprimono livelli superiori di actina, sia nella forma G monomerica che in quella F polimerica, in confronto a MVSMC (Fig 6A e 6B) e questo dato suggerisce che le VSMC da animali femmina abbiano un citoscheletro più robusto.

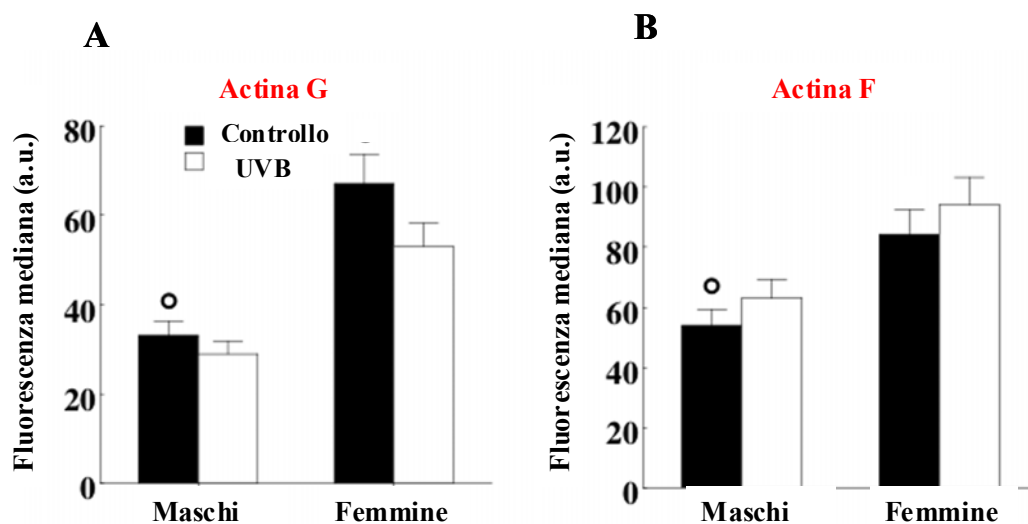


Figura 6. analisi citofluorimetrica di actina G e actina F ottenuta da quattro esperimenti indipendenti \pm D.S. (*) $P < 0.05$ fra MVSMC e FVSMC, sia in condizioni basali che dopo esposizione a UVB.

Destino cellulare nelle cellule di controllo

Per la valutazione del destino cellulare abbiamo per prima cosa studiato la **senescenza** attraverso l'analisi morfologica dei nuclei (Fig. 7A e 7B), per verificare la presenza di eterocromatina, caratteristica generalmente riportata come tipica della senescenza cellulare (Straface *et al*, 2007; Zhang e Adams, 2007) e l'analisi quantitativa dell'enzima β -galattosidasi (Fig. 8), noto marker della senescenza (Straface *et al*, 2007). Dai dati riportati in Figura 7B emerge che, in condizioni basali, non ci sono differenze significative tra FVSMC e MVSMC in termini di percentuale di cellule con foci eterocromatinici. I dati riportati in Figura 8 mostrano che le FVSMC positive alla β -galattosidasi sono più numerose rispetto alle MVSMC, suggerendo una maggiore propensione alla senescenza.

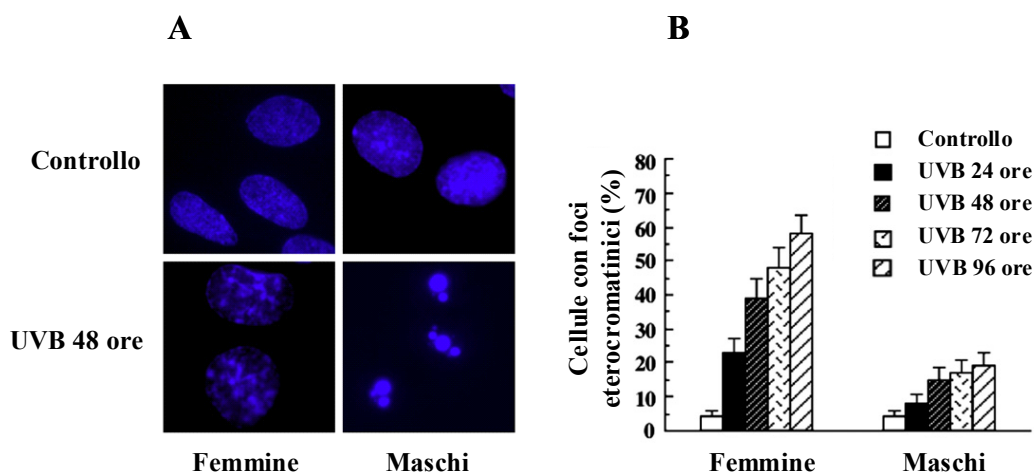


Figura 7. (A) Immagini in fluorescenza di cellule colorate con colorante Hoechst per evidenziare i nuclei. Le immagini rappresentative mostrano: (i) foci eterocromatinici in FVSMC esposte a UVB (confrontate con le femmine di controllo nel pannello superiore) e (ii) condensazione della cromatina, tipica dell'apoptosi, in MVSMC esposte a UVB (confrontate con i maschi di controllo nel pannello superiore). (B) Analisi morfometrica quantitativa, a diversi tempi dopo esposizione a UVB, dei foci eterocromatinici osservati al microscopio a fluorescenza. La percentuale di cellule con foci eterocromatinici è significativamente superiore ($P < 0.01$) in FVSMC rispetto a MVSMC in seguito a esposizione a UVB.

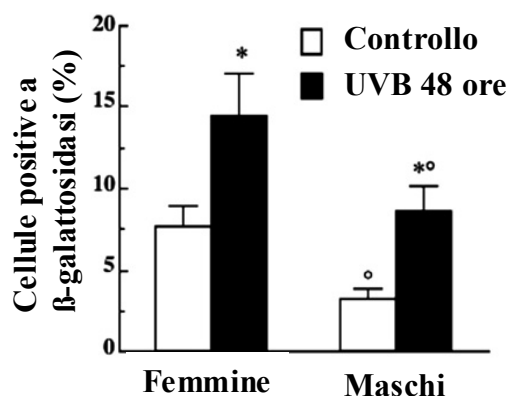


Figura 8. Analisi citofluorimetrica dell'espressione di β -galattosidasi in FVSMC e MVSMC in condizioni basali e dopo esposizione a UVB. (*) $P < 0.01$ fra VSMC esposte a UVB e non esposte; (°) $P < 0.01$ tra FVSMC e MVSMC in condizioni basali e dopo esposizione a UVB.

La senescenza indotta da stress ossidativo è chiamata senescenza prematura e potrebbe essere causata da danno al DNA (per esempio rottura della doppia elica) in siti diversi dai telomeri (Sedelnikova *et al*, 2004; Straface *et al*, 2007). Recentemente sono stati caratterizzati gli eventi precoci del danno al DNA, come il reclutamento al sito danneggiato di chinasi segnale e loro attivazione che porta alla fosforilazione della Serina-139 delle molecole di istone H2AX adiacenti al sito stesso (Shiloh, 2003; von Zglinicki *et al*, 2005). Perciò abbiamo voluto verificare se questo meccanismo fosse coinvolto nei processi di senescenza da noi osservati ed abbiamo condotto specifici esperimenti d'immunocitochimica (Fig. 9). Dai dati emerge che, in condizioni basali, una percentuale maggiore di MVSMC rispetto a FVSMC è positiva per H2AX fosforilato (p-H2AX) e non possiamo perciò escludere un ruolo del bilancio redox, meno favorevole nelle MVSMC.

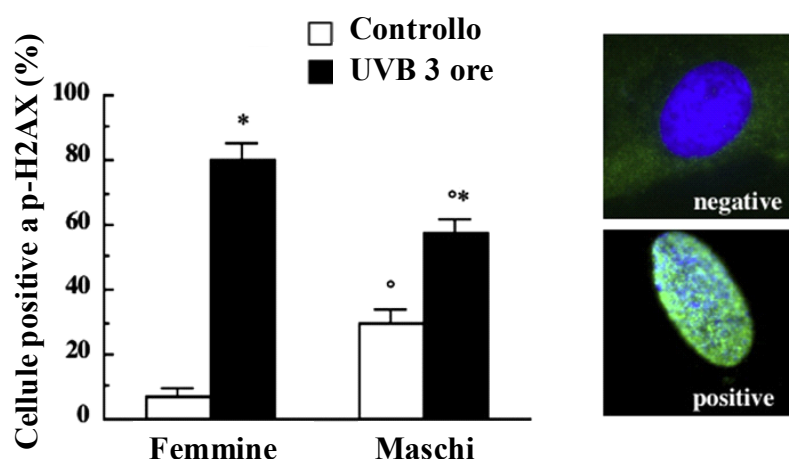


Figura 9. Valutazione quantitativa delle cellule positive a p-H2AX in microscopia in fluorescenza dopo doppia colorazione con colorante Hoechst ed uno specifico anticorpo monoclonale diretto contro p-H2AX. Le immagini rappresentative (a destra) mostrano un nucleo negativo (immagine superiore) o positivo (immagine inferiore) a p-H2AX. (*) $P < 0.01$ fra cellule esposte a UVB e cellule di controllo. (^o) $P < 0.01$ tra FVSMC e MVSMC, in condizioni basali e dopo esposizione a UVB.

Il passo successivo è stato la valutazione dell'**apoptosi**. I dati riportati in Figura 10 indicano che la percentuale di cellule apoptotiche (marcate con Annexina V per l'esternalizzazione della fosfatidilserina di membrana, considerata un marker

precoce di apoptosi) non differisce in maniera significativa tra FVSMC e MVSMC.

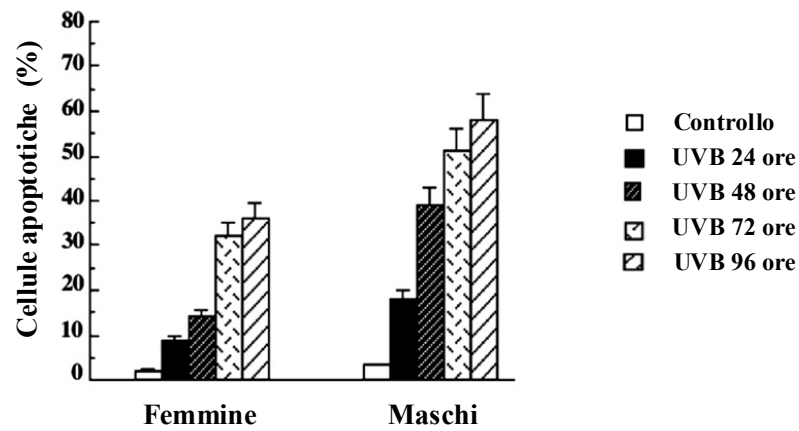


Figura 10. Analisi citofluorimetrica dell'apoptosi dopo doppia colorazione con Annessina V/Ioduro di propidio a diversi tempi dopo l'esposizione a UVB. UVB induce apoptosi in maniera tempo-dipendente. La percentuale di cellule apoptotiche è più alta ($P<0.01$) nelle MVSMC che nelle FVSMC.

Analogamente, non abbiamo riscontrato differenze tra FVSMC e MVSMC in condizioni basali nel test di distacco dal substrato (Fig. 11). Questo esperimento è stato condotto perché l'adesione cellula-substrato rappresenta un fattore chiave nella resistenza all'anoikia che, come già detto, costituisce un particolare tipo di apoptosi.

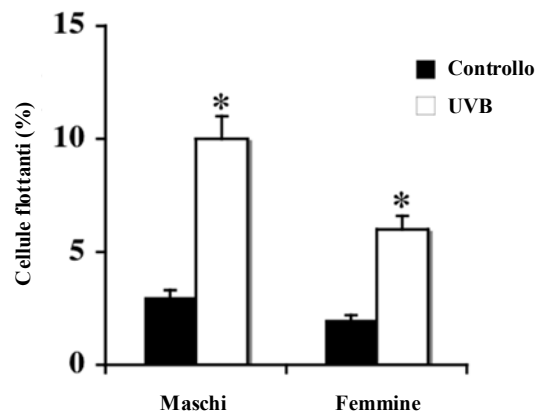


Figura 11. Percentuale delle cellule flottanti a 24 ore dall'esposizione a UVB. I valori sono riportati come media \pm D.S. di quattro esperimenti indipendenti. (*) $P<0.01$ tra MVSMC esposte a UVB e FVSMC esposte a UVB.

La *Focal Adhesion Kinase* (FAK) è una chinasi implicata nella trasduzione dei segnali in arrivo dalle integrine ed agisce promuovendo il mantenimento dell'adesione al substrato ed il rimodellamento del citoscheletro actinico. Perciò abbiamo valutato sia i livelli di FAK totale (Fig. 12) che della sua forma attiva fosforilata (p-FAK) (Fig. 13). Abbiamo visto che le FVSMC mostrano, già in condizioni basali, livelli superiori di FAK totale (Fig. 12).

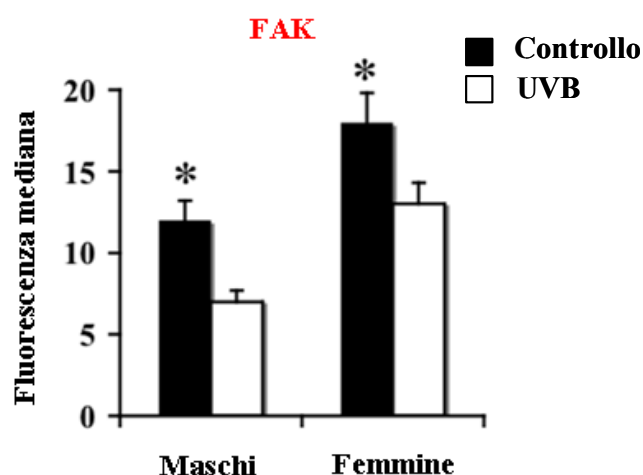


Figura 12. Analisi citofluorimetrica di FAK totale. I dati sono la media \pm D.S. di quattro esperimenti indipendenti. (*) $P < 0.01$ tra MVSMC e FVSMC.

I dati mostrati in Figura 13 indicano che anche i livelli di p-FAK sono, già in condizioni basali, superiori nelle FVSMC che nelle MVSMC. Questo dato non sorprende perché lo stato redox meno favorevole nelle MVSMC (Figg. 3 e 4) potrebbe attivare metalloproteinasi o bloccarne gli inibitori ed aumentare così la suscettibilità proteolitica di cellule aderenti (Rees *et al*, 2008).

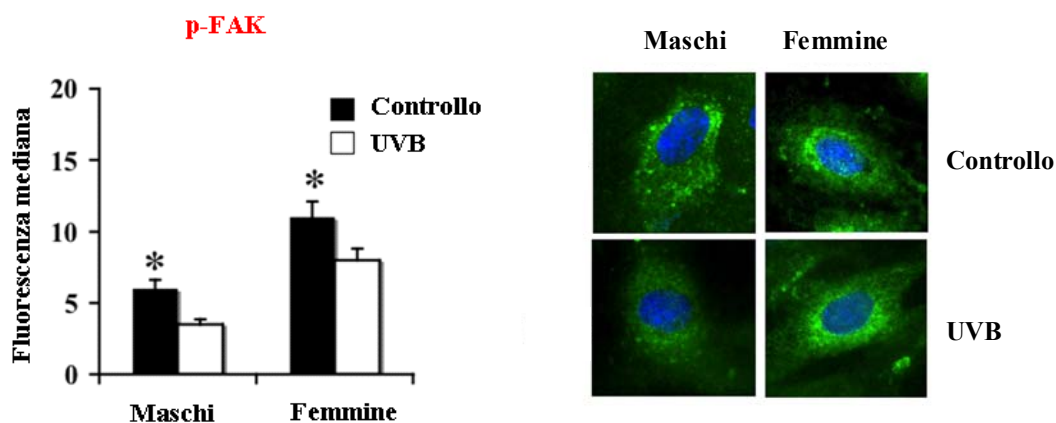


Figura 13. Analisi citofluorimetrica di p-FAK. I dati sono la media \pm D.S. di quattro esperimenti indipendenti. Sulla destra immagini rappresentative che mostrano la distribuzione di p-FAK in condizioni basali (immagini superiori) ed in seguito ad esposizione a UVB (immagini inferiori). (*) $P < 0.01$ tra MVSMC e FVSMC.

L'**autofagia** è oggi considerata come un potenziale meccanismo di sopravvivenza che le cellule possono utilizzare in condizioni microambientali sfavorevoli (Kroemer e Levine, 2008). Lo stress ossidativo altera le proteine e gli organelli cellulari e l'appropriato turnover delle proteine citoplasmatiche, influenzando perciò il processo autofagico (Amaravadi *et al*, 2007; Lock e Debnath, 2008). Perciò abbiamo analizzato l'autofagia nel nostro sistema, valutando l'espressione di due specifici biomarker (vedi Figura 14):

- Beclina 1: fa parte di un complesso fosfatidilinositolo 3-kinasi che è ritenuto avere un ruolo importante durante le fasi iniziali della formazione dell'autofagosoma (nucleazione della vescicola)
- LC3 I/LC3 II: la coniugazione della proteina LC3 con molecole lipidiche porta alla conversione della sua forma solubile (LC3 I) a quella insolubile associata alla vescicola autofagica (LC3 II).

Abbiamo visto che, in condizioni basali, l'espressione di LC3 II è più alta nelle MVSMC che nelle FVSMC e ciò suggerisce un'attività autofagica "di base" superiore nelle VSMC isolate dai maschi. Il dato non sorprende, visto che queste

ultime hanno un bilancio redox meno favorevole (Figg. 3 e 4) ed è possibile che un “tono autofagico basale” aiuti a mantenere l’omeostasi cellulare.

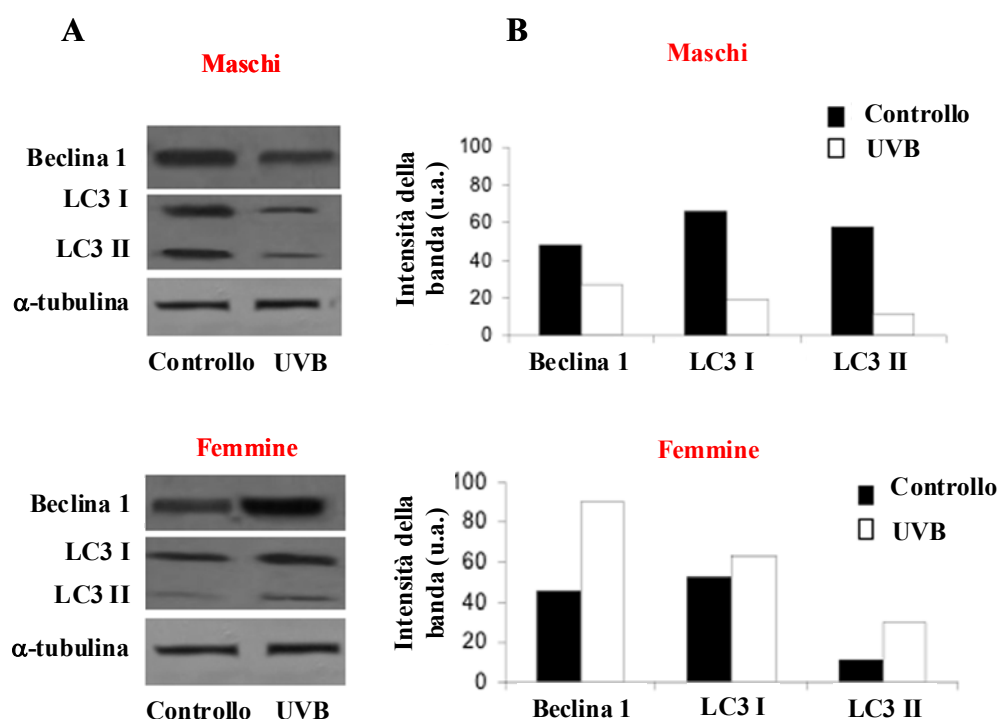


Figura 14. (A) Immagini rappresentative di analisi Western Blot e (B) analisi densitometrica dell’espressione di Beclina 1, LC3 I e LC3 II sia in condizioni basali che in seguito a esposizione a UVB.

Recettori degli estrogeni e degli androgeni nelle cellule di controllo

L’estradiolo (E2) regola, attraverso i suoi recettori (ER- α e ER- β), l’espressione di numerosi geni coinvolti nel controllo redox e negli effetti estrogeno-indotti sul sistema cardiovascolare (Meyer *et al*, 2006). I recettori degli estrogeni mediano effetti diversi ed opposti. ER- α è considerato il mediatore principale dell’inibizione della crescita di VSMC estrogeno-indotta mentre, nel danno acuto da ischemia/riperfusionazione caratterizzato da stress ossidativo, ER- β è coinvolto nella cardioprotezione (Wang *et al*, 2008). Nelle condizioni basali, abbiamo visto che le FVSMC esprimono meno ER- α e ER- β rispetto alle MVSMC mentre i livelli del recettore degli androgeni (AR) non sono diversi fra i due sessi (Figura 15).

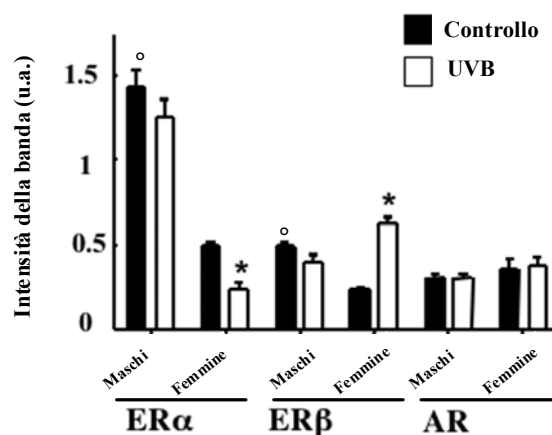


Figura 15. Analisi western blot dei livelli di ER- α , ER- β e AR. (°) $P < 0.01$ tra MVSMC e FVSMC; (*) $P < 0.01$ tra FVSMC esposte a UVB e FVSMC di controllo.

Stato redox in condizioni di stress ossidativo

L'analisi citofluorimetrica, condotta a diversi tempi dall'esposizione alla radiazione UVB (15', 30', 3 ore e 48 ore), ha dimostrato che la produzione di ROS indotta da UVB aumenta rapidamente dopo 15' (dato non mostrato), raggiunge un picco a 30' (Fig. 3A e 3B) e diminuisce dopo 48 ore (dato non mostrato). I livelli in seguito a stress ossidativo sono più elevati nelle MVSMC rispetto alle FVSMC (Fig. 3A e 3B). I livelli di GSH si riducono con un picco minimo a 48 ore dall'esposizione a UVB ma la riduzione è più marcata nelle MVSMC (Fig. 4A) ed i livelli di attività di SOD e catalasi sono significativamente più elevati nelle FVSMC a 3 ore dall'esposizione a UVB (Fig. 4B e 4C).

Complessivamente, anche sotto stress ossidativo le VSMC isolate da femmine mostrano di avere un bilancio redox più favorevole rispetto alla controparte maschile.

Citoscheletro in condizioni di stress ossidativo

Come mostrato in Figura 5A, l'esposizione a radiazione UVB porta ad una marcata riorganizzazione dei filamenti di actina, soprattutto nelle MVSMC. Infatti, a 48 ore dall'esposizione a UVB si verifica un'evidente redistribuzione ed ispessimento delle fibre di actina che presentano numerosi cross-link. Abbiamo quindi condotto una valutazione morfometrica delle cellule che presentavano cross-link di actina. Come mostrato in figura 5B, la percentuale di cellule con

cross-link aumenta in seguito all'esposizione a UVB ma in misura superiore nelle MVSMC. Un tale rimodellamento del citoscheletro porta ad un suo notevole irrigidimento e le conseguenze sulla contrattilità e sull'adesione al substrato possono essere importanti. Il maggior danno riportato dalle cellule isolate dai maschi è in linea con la maggiore produzione di ROS indotta dall'esposizione a UVB e dalle minori difese antiossidanti mostrate da queste cellule rispetto alle FVSMC (vedi Figg. 3 e 4). Infatti, in base ai dati della letteratura, la presenza di cross-link tra i filamenti di actina sembra indicare un rimodellamento ossidativo del citoscheletro con formazione di ponti disolfuro fra gruppi tiolici vicini (Masella *et al*, 2000). L'esposizione alle radiazioni UVB non determina una riduzione significativa dei livelli di actina G e actina F in entrambi i sessi perciò viene mantenuta la differenza, a vantaggio delle FVSMC, già osservata in condizioni basali (Fig. 6).

Destino cellulare in condizioni di stress ossidativo

Dai dati riportati in Figura 7 è evidente che la percentuale di cellule con foci eterocromatinici (indice di **senescenza**) aumenta significativamente con il tempo, specialmente nelle FVSMC esposte a UVB. La conferma del dato è stata ottenuta dalla quantificazione percentuale delle cellule positive all'enzima β -galattosidasi (Fig. 8). L'aumento delle FVSMC senescenti si associa ad un maggiore incremento rispetto alle MVSMC delle cellule positive all'istone H2AX fosforilato (Fig. 9) e ciò suggerisce che potremmo essere in presenza di senescenza precoce, che generalmente non richiede l'accorciamento dei telomeri (Goligorsky *et al*, 2009), indotta da stress ossidativo.

Come mostrato in Figura 10, l'esposizione a UVB induce **apoptosi** in maniera tempo-dipendente, soprattutto nelle MVSMC e il dato è rafforzato dall'osservazione che la percentuale delle cellule flottanti nel medium di coltura a 24 ore dall'esposizione a UVB (Fig. 11) è maggiore per le MVSMC. È noto, infatti, che il distacco delle cellule dal substrato in seguito a stress ossidativo gioca un ruolo chiave nell'anoikia mentre l'overespressione della Mn SOD rallenta il processo (Wong *et al*, 1989; Mian *et al*, 2008). Inoltre, in seguito a

induzione di stress ossidativo (al quale le MVSMC sono più suscettibili) i livelli di FAK totale e p-FAK diminuiscono significativamente sia nelle MVSMC che nelle FVSMC ma queste ultime mantengono il “vantaggio” già presente nelle condizioni basali (Figg. 12 e 13). Allo scopo d’indagare più a fondo il ruolo di FAK nella resistenza all’anoikia, abbiamo condotto esperimenti utilizzando due diverse concentrazioni di un inibitore di FAK (aggiunto alle cellule 1 ora prima dell’esposizione a UVB) ed abbiamo quindi valutato la percentuale di cellule apoptotiche a 24 ore dall’esposizione alla radiazione. Come mostrato in Figura 16, la percentuale di cellule apoptotiche (valutate in termini di positività all’Annessina V) è aumentata significativamente in presenza d’inibizione di FAK. Le FVSMC potrebbero avere un vantaggio in termini di sopravvivenza grazie al miglior mantenimento del loro ancoraggio al substrato, uno degli stimoli fondamentali capaci d’indurre resistenza all’anoikia (Lock e Debnath, 2008) insieme alle caratteristiche della loro impalcatura citoscheletrica, che sembrano essere influenzate in misura minore dallo stress rispetto a quelle mostrate dalle MVSMC (Figg. 5 e 6).

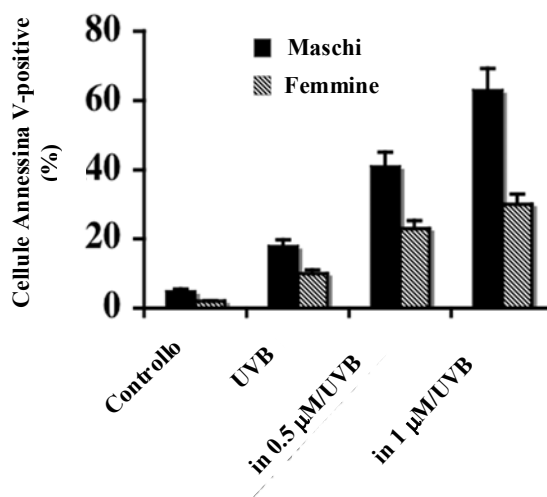


Figura 16. Percentuale di cellule positive all’Annessina V trattate con due diverse concentrazioni di inibitore di FAK 1 ora prima dell’esposizione a UVB. La differenza fra cellule trattate e non trattate è significativa in entrambi i sessi ($P < 0.01$).

Perché il destino delle cellule isolate da animali maschi e femmine sembra così diverso in termini di suscettibilità all'apoptosi ed alla senescenza? Per prima cosa abbiamo approfondito il ruolo dello stato redox utilizzando un depletante del GSH, il BSO, ed abbiamo quindi valutato la senescenza e l'apoptosi a due diversi tempi dall'esposizione a UVB. Abbiamo trovato che la riduzione dei livelli di GSH influenza profondamente il destino delle FVSMC. Infatti un'alta percentuale di FVSMC pretrattate con BSO va incontro ad apoptosi in misura drammaticamente superiore rispetto all'assenza di deplezione di GSH (si confronti, per esempio, il dato a 48 ore dall'esposizione a UVB riportato nelle Figure 17 e 10) e, allo stesso tempo, la percentuale di cellule senescenti diminuisce significativamente, come si vede dal confronto del dato a 48 ore tra le Figure 17 e 8.

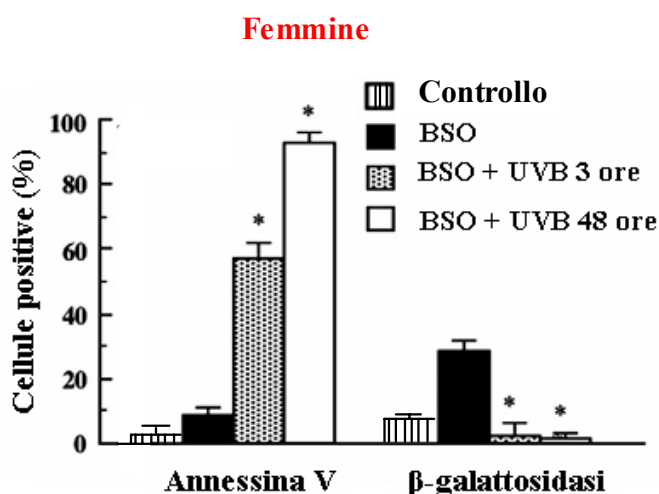


Figura 17. Analisi citofluorimetrica delle cellule apoptotiche (positive ad Annexina V/Ioduro di propidio) e senescenti (positive a β -galattosidasi) a due differenti tempi dopo l'esposizione a UVB in cellule di controllo e pretrattate con BSO per depletare il GSH. (*) $P < 0.01$ vs gli stessi time point in Fig. 10 (per l'apoptosi) ed in Fig. 8 (per la β -galattosidasi).

Un'altra possibile spiegazione della migliore resistenza all'anoikia manifestata dalle FVSMC in condizioni di stress ossidativo è data dal fatto che queste cellule mostrano un notevole incremento dell'attività autofagica in contrasto con la riduzione delle stessa nelle MVSMC in condizioni di stress. Infatti i livelli di LC3 I sono aumentati nelle femmine e diminuiti nei maschi mentre i livelli di LC3 II e

Beclina 1, che nel basale erano simili tra i due sessi, risultano molto più elevati nelle femmine (Fig. 14 e Tab. 1).

	Condizioni basali	Stress ossidativo
Beclina 1	=	+
LC3 I	=	+
LC3 II	-	+

Tabella 1. Tabella riassuntiva dei risultati dei confronti FVSMC vs MVSMC sui livelli di espressione di Beclina 1, LC3 I e LC3 II in condizioni basali e di stress ossidativo.

Recettori degli estrogeni e degli androgeni in condizioni di stress ossidativo

Come mostrano i dati riportati in Figura 15 ed in Tabella 2, l'irradiazione con UVB non modifica i livelli di AR e ERs nelle MVSMC mentre nelle FVSMC i livelli di entrambi i due tipi di ER sono alterati: ER- β è aumentato mentre ER- α è diminuito e ciò si traduce in un aumento drastico del rapporto ER- β / ER- α . Sulla base alcuni dati riportati in letteratura, che suggeriscono un ruolo protettivo degli estrogeni attraverso i loro recettori β (Wang *et al*, 2008), non possiamo escludere la possibilità che un aumento dei livelli di ER- β indotto dall'esposizione a UVB possa rappresentare un meccanismo di adattamento allo stress risultante nella resistenza all'anoikia mostrata dalle FVSMC.

	Condizioni basali	Stress ossidativo
AR	=	=
ER- α	-	-
ER- β	-	+
ER- β /ER- α	+	+++

Tabella 2. Tabella riassuntiva dei risultati dei confronti FVSMC vs MVSMC sui livelli di espressione di AR, ER- α , ER- β e sul rapporto ER- β /ER- α .

CONCLUSIONI

Nella Tabella 3 sono riassunti i confronti (FVSMC vs MVSMC) sui principali parametri esaminati nel corso di questo lavoro. I risultati ottenuti sembrano suggerire che le VSMC in coltura primaria e a bassi passaggi in coltura possano mantenere una sorta di “memoria” di dimorfismo sessuale. In particolare mostrano:

- Un differente stato redox basale: le FVSMC hanno un bilancio redox più favorevole perché mostrano livelli di O_2^- e H_2O_2 inferiori, di GSH e di attività di SOD e catalasi superiori rispetto alle MVSMC.
- Differente suscettibilità allo stress ossidativo: le cellule isolate da femmine sono “in vantaggio” rispetto a quelle isolate dai maschi perché continuano a mantenere, pur subendo le conseguenze dell’esposizione alla radiazione UVB, livelli inferiori di O_2^- e H_2O_2 e superiori di GSH e di attività di SOD e catalasi rispetto alle cellule isolate dai maschi. L’osservazione che abbiamo tratto è che questa condizione si associa ad un differente destino cellulare, che noi abbiamo valutato in termini di resistenza all’apoptosi, ed abbiamo riscontrato che le FVSMC sono più resistenti, nel caso specifico all’anoikia, rispetto alle MVSMC. Una possibile spiegazione è legata alle loro migliori capacità di adesione: infatti, come emerso dal test di distacco dal substrato di crescita, le FVSMC mostrano di perdere l’adesione in misura significativamente inferiore rispetto alla controparte maschile. Ciò potrebbe essere in relazione anche con le caratteristiche del citoscheletro, che mostra di essere più “robusto”, grazie al maggior contenuto di actina, e probabilmente resiste meglio all’irrigidimento causato dal rimodellamento ossidativo perché “aggredito” dallo stress in misura minore, forse proprio perché le FVSMC mostrano un bilancio redox più favorevole anche in tali condizioni. È possibile che anche la maggiore propensione alla senescenza spieghi la migliore capacità di sottrarsi ai processi apoptotici e riteniamo interessante sottolineare che, in questo caso specifico, sembra che quello

che abbiamo osservato riporti, come del resto già visto altrove (Straface *et al*, 2001; Sedelnikova *et al*, 2004), ad un processo di senescenza prematura piuttosto che alla senescenza replicativa. È noto che la senescenza prematura possa implicare reversibilità del processo (Goligorsky *et al*, 2009) e quindi un potenziale pieno recupero, qualora venga a mancare lo stato di stress, delle funzioni cellulari. Ancora, le FVSMC mostrano una maggiore propensione ad utilizzare i processi autofagici, utili nell'adattamento a condizioni microambientali sfavorevoli, e sospettiamo che questo comportamento sia in relazione con lo stato redox: infatti avevamo osservato che le MVSMC vi ricorrono maggiormente in condizioni basali, quando cioè, rispetto alle FVSMC, sono in “svantaggio” redox, mentre il carico dello stress ossidativo sembra portarle massivamente all'apoptosi. Infine, non possiamo escludere la possibilità che un aumento dei livelli di ER- β possa rappresentare un meccanismo di adattamento allo stress risultante nella resistenza all'anoikia mostrata dalle FVSMC.

		Condizioni basali	Stress ossidativo
STATO REDOX	H ₂ O ₂	-	-
	O ₂ ⁻	-	-
	GSH	+	+
	SOD (attività)	+	+
	Catalasi (attività)	+	+
CITOSCHELETRO	Cross-link di actina (% cellule con la caratteristica)	=	-
	Actina G	+	+
	Actina F	+	+
SENESCENZA	Foci eterocromatinici (% cellule con la caratteristica)	=	+
	β-galattosidasi (% cellule positive)	+	+
	Annessina V (% cellule positive)	=	-
APOPTOSI	Distacco dal substrato (% cellule flottanti)	=	-
	FAK totale	+	+
	p-FAK	+	+
AUTOFAGIA	Beclina 1	=	+
	LC3 I	=	+
	LC3 II	-	+
RECETTORI DEGLI ESTROGENI	ER-α	-	-
	ER-β	-	+
	ER-β/ER-α	+	+++

Tabella 3. Riepilogo dei confronti (FVSMC vs MVSMC) sui principali parametri esaminati

L'importanza del destino cellulare nella patogenesi di numerose malattie, incluse quelle cardiovascolari, è ben nota. Come già detto, il rimodellamento dei vasi, che

è alla base di patologie come ipertensione ed aterosclerosi, è profondamente influenzato dai processi di proliferazione, migrazione e apoptosi delle cellule coinvolte ed il significato di ciascuno di essi può assumere connotazioni differenti a seconda del distretto, dello stadio patologico e dei tipi cellulari interessati (Shaw e Xu, 2003; Fortuno *et al*, 2005; Miller *et al*, 2007; Rzuclidlo, 2009). È infatti noto che l'iperproliferazione e la migrazione delle VSMC partecipano all'ispessimento, irrigidimento e stenosi della parete vasale ed alla formazione della placca aterosclerotica, mentre l'apoptosi può inserirsi in questi processi da una parte controbilanciando la tendenza iperproliferativa, dall'altra esacerbando il danno con conseguenze anche gravi, come la rottura della placca e la calcificazione dei vasi (Bennett, 1999; Son *et al*, 2008).

Più in generale, i risultati ottenuti in questo lavoro sembrano suggerire la possibilità che i meccanismi patogenetici di alcune malattie possano essere diversi tra i due sessi ed invitano a riflettere sull'utilizzo di cellule in coltura primaria come un modello valido *per se*, a prescindere dal sesso della "sorgente".

RINGRAZIAMENTI

Ringrazio la Prof.ssa Franconi, per la fiducia sempre accordatami, ed il gruppo di lavoro da lei guidato, prima fra tutti Ilaria, per la sua infinita pazienza.

Ringrazio con affetto e riconoscenza il gruppo di ricerca guidato dal Prof. Malorni, Reparto di Farmacologia dei processi degenerativi e dell'invecchiamento – Dipartimento del Farmaco – Istituto Superiore di Sanità – Roma, per tutto quello che con grande competenza e pazienza ha saputo fare per formarmi, sostenermi ed incoraggiarmi.

Ringrazio tutta la mia famiglia per il sostegno costante e sicuro.

BIBLIOGRAFIA

- Amaravadi, R. K., D. Yu, et al. (2007). "Autophagy inhibition enhances therapy-induced apoptosis in a Myc-induced model of lymphoma." J Clin Invest **117**(2): 326-36.
- Bennett, M. R. (1999). "Apoptosis of vascular smooth muscle cells in vascular remodelling and atherosclerotic plaque rupture." Cardiovasc Res **41**(2): 361-8.
- Campisi, J. and F. d'Adda di Fagagna (2007). "Cellular senescence: when bad things happen to good cells." Nat Rev Mol Cell Biol **8**(9): 729-40.
- Chiarugi, P. and E. Giannoni (2008). "Anoikis: a necessary death program for anchorage-dependent cells." Biochem Pharmacol **76**(11): 1352-64.
- Coinu, R., A. Chiaviello, et al. (2006). "Exposure to modeled microgravity induces metabolic idleness in malignant human MCF-7 and normal murine VSMC cells." FEBS Lett **580**(10): 2465-70.
- Colavitti, R. and T. Finkel (2005). "Reactive oxygen species as mediators of cellular senescence." IUBMB Life **57**(4-5): 277-81.
- Fortuno, A., G. San Jose, et al. (2005). "Oxidative stress and vascular remodelling." Exp Physiol **90**(4): 457-62.
- Frohlich, J. and S. A. Lear (2002). "Old and new risk factors for atherosclerosis and development of treatment recommendations." Clin Exp Pharmacol Physiol **29**(9): 838-42.
- Galluzzi, L., M. C. Maiuri, et al. (2007). "Cell death modalities: classification and pathophysiological implications." Cell Death Differ **14**(7): 1237-43.
- Genestra, M. (2007). "Oxyl radicals, redox-sensitive signalling cascades and antioxidants." Cell Signal **19**(9): 1807-19.
- Goligorsky, M. S., J. Chen, et al. (2009). "Stress-induced premature senescence of endothelial cells: a perilous state between recovery and point of no return." Curr Opin Hematol **16**(3): 215-9.
- Herrera, B., A. M. Alvarez, et al. (2001). "Reactive oxygen species (ROS) mediates the mitochondrial-dependent apoptosis induced by transforming growth factor (beta) in fetal hepatocytes." Faseb J **15**(3): 741-51.

- Hirakawa, Y., Y. Masuda, et al. (2007). "Impact of gender on in-hospital mortality of patients with acute myocardial infarction undergoing percutaneous coronary intervention: an evaluation of the TAMIS-II data." Intern Med **46**(7): 363-6.
- Kroemer, G. and B. Levine (2008). "Autophagic cell death: the story of a misnomer." Nat Rev Mol Cell Biol **9**(12): 1004-10.
- Legato, M. J. (2004). "Gender-specific medicine: the view from Salzburg." Gen Med **1**(2): 61-3.
- Lock, R. and J. Debnath (2008). "Extracellular matrix regulation of autophagy." Curr Opin Cell Biol **20**(5): 583-8.
- Malorni, W., I. Campesi, et al. (2007). "Redox features of the cell: a gender perspective." Antioxid Redox Signal **9**(11): 1779-801.
- Masella, R., E. Straface, et al. (2000). "Subcellular alterations induced by UV-oxidized low-density lipoproteins in epithelial cells can be counteracted by alpha-tocopherol." Photochem Photobiol **71**(1): 97-102.
- Meyer, M. R., E. Haas, et al. (2006). "Gender differences of cardiovascular disease: new perspectives for estrogen receptor signaling." Hypertension **47**(6): 1019-26.
- Mian, M. F., C. Kang, et al. (2008). "Cleavage of focal adhesion kinase is an early marker and modulator of oxidative stress-induced apoptosis." Chem Biol Interact **171**(1): 57-66.
- Miller, A. A., T. M. De Silva, et al. (2007). "Effect of gender and sex hormones on vascular oxidative stress." Clin Exp Pharmacol Physiol **34**(10): 1037-43.
- Mizushima, N., B. Levine, et al. (2008). "Autophagy fights disease through cellular self-digestion." Nature **451**(7182): 1069-75.
- Papaharalambus, C. A. and K. K. Griendling (2007). "Basic mechanisms of oxidative stress and reactive oxygen species in cardiovascular injury." Trends Cardiovasc Med **17**(2): 48-54.
- Paravicini, T. M. and R. M. Touyz (2006). "Redox signaling in hypertension." Cardiovasc Res **71**(2): 247-58.

- Rees, M. D., E. C. Kennett, et al. (2008). "Oxidative damage to extracellular matrix and its role in human pathologies." Free Radic Biol Med **44**(12): 1973-2001.
- Regitz-Zagrosek, V. (2006). "Therapeutic implications of the gender-specific aspects of cardiovascular disease." Nat Rev Drug Discov **5**(5): 425-38.
- Rzucidlo, E. M. (2009). "Signaling pathways regulating vascular smooth muscle cell differentiation." Vascular **17 Suppl 1**: S15-20.
- Schiaffino, S., C. Mammucari, et al. (2008). "The role of autophagy in neonatal tissues: just a response to amino acid starvation?" Autophagy **4**(5): 727-30.
- Sebastia, J., R. Cristofol, et al. (2003). "Evaluation of fluorescent dyes for measuring intracellular glutathione content in primary cultures of human neurons and neuroblastoma SH-SY5Y." Cytometry A **51**(1): 16-25.
- Sedelnikova, O. A., I. Horikawa, et al. (2004). "Senescing human cells and ageing mice accumulate DNA lesions with unreparable double-strand breaks." Nat Cell Biol **6**(2): 168-70.
- Shaw, A. and Q. Xu (2003). "Biomechanical stress-induced signaling in smooth muscle cells: an update." Curr Vasc Pharmacol **1**(1): 41-58.
- Shiloh, Y. (2003). "ATM and related protein kinases: safeguarding genome integrity." Nat Rev Cancer **3**(3): 155-68.
- Son, B. K., M. Akishita, et al. (2008). "Mechanism of pi-induced vascular calcification." J Atheroscler Thromb **15**(2): 63-8.
- Straface, E., P. U. Giacomoni, et al. (2001). "Cultured cells as a model system for the study of UV-induced cytotoxicity." J Photochem Photobiol B **63**(1-3): 52-60.
- Straface, E., R. Vona, et al. (2007). "Single exposure of human fibroblasts (WI-38) to a sub-cytotoxic dose of UVB induces premature senescence." FEBS Lett **581**(22): 4342-8.
- Tinari, A., P. Matarrese, et al. (2008). "Hyperphagia by self- and xeno-cannibalism: cell death by indigestion? a reminiscence of the Phedrus Fabula "Rana Rupta et Bos"?" Autophagy **4**(1): 128-30.

- Touyz, R. M. and E. L. Schiffrin (2004). "Reactive oxygen species in vascular biology: implications in hypertension." Histochem Cell Biol **122**(4): 339-52.
- van Heemst, D., P. M. den Reijer, et al. (2007). "Ageing or cancer: a review on the role of caretakers and gatekeepers." Eur J Cancer **43**(15): 2144-52.
- Vicencio, J. M., L. Galluzzi, et al. (2008). "Senescence, apoptosis or autophagy? When a damaged cell must decide its path--a mini-review." Gerontology **54**(2): 92-9.
- von Zglinicki, T., G. Saretzki, et al. (2005). "Human cell senescence as a DNA damage response." Mech Ageing Dev **126**(1): 111-7.
- Wang, M., P. R. Crisostomo, et al. (2008). "Estrogen receptor beta mediates acute myocardial protection following ischemia." Surgery **144**(2): 233-8.
- Wong, G. H., J. H. Elwell, et al. (1989). "Manganous superoxide dismutase is essential for cellular resistance to cytotoxicity of tumor necrosis factor." Cell **58**(5): 923-31.
- Yung, L. M., F. P. Leung, et al. (2006). "Reactive oxygen species in vascular wall." Cardiovasc Hematol Disord Drug Targets **6**(1): 1-19.
- Zhang, R. and P. D. Adams (2007). "Heterochromatin and its relationship to cell senescence and cancer therapy." Cell Cycle **6**(7): 784-9.