

Modelli cardiovascolari per studiare le differenze di sesso-genere ed individuare approcci diagnostici e terapeutici innovativi

Le malattie cardiovascolari (CVD) sono state considerate in passato come una patologia tipicamente maschile; tuttavia, al giorno d'oggi, l'incidenza di questa serie di patologie ha subito un significativo cambio di tendenza; le CVD infatti rappresentano la principale causa di morte e ospedalizzazione delle donne nei paesi industrializzati.

In Europa, le CVD sono responsabili del 54% dei decessi a carico delle donne contro un 43% degli uomini e anche nel nostro paese si osserva un forte squilibrio di genere: ogni anno infatti muoiono per malattie cardiovascolari circa 126.000 donne l'anno contro circa 97.000 uomini. (1)

Le ragioni di questo notevole cambio di tendenza sono molteplici: un fattore estremamente importante è costituito dal cosiddetto "paradosso donna": le donne vivono di più e sperimentano una serie di patologie che minano profondamente la qualità della vita. Anche altri fattori, non immediatamente riconducibili all'aumentata aspettativa di vita e al conseguente deterioramento delle condizioni psico-fisiche, tendono a partecipare alla genesi del paradosso donna: un fattore che ha avuto e ha una notevole importanza nella creazione di questo squilibrio di genere è rappresentato dalla scarsa attenzione e sensibilità riservata alle donne dal punto di vista medico e clinico a causa della visione "maschile" delle CVD.

Da quanto discusso finora appare chiaro che le CVD hanno un comportamento nettamente dimorfico per quanto riguarda l'epidemiologia; tuttavia, le differenze si accentuano se si indagano altri fattori correlati ad esse, come ad esempio il peso relativo dei vari fattori di rischio, la mortalità, i processi fisiopatologici che ne guidano la genesi e lo sviluppo, la diagnostica e la risposta al trattamento farmacologico; quest'ultimo fattore ha un'enorme importanza per la medicina di genere a causa, per l'appunto, della diversa costituzione maschile e femminile dal punto di vista fisiologico, ormonale ecc che si riflette in una diversa risposta al farmaco.

È importante evidenziare il fatto che le differenze di genere nelle CVD hanno molte delle proprie basi eziologiche nel diverso comportamento cellulare di cellule maschili e femminili. Studi effettuati su cellule maschili e femminili provenienti da modelli animali e umani hanno evidenziato come molti processi cellulari siano diversi nei due sessi; fra le cause ritroviamo la diversa esposizione agli ormoni sessuali e una diversa risposta fisiologica a questa esposizione.

Un esempio di un processo cellulare estremamente dimorfico, implicato nella genesi di una diversa condizione clinica fra maschi e femmine, può essere l'azione dell'ormone sessuale estradiolo: studi su ratti hanno infatti dimostrato che lo steroide sessuale è responsabile dell'attivazione del pathway PI3K/AKT, fondamentale per la sopravvivenza cellulare in seguito al danno da ischemia/riperfusion, e della produzione di ossido nitrico, a sua volta coinvolto nella sopravvivenza cellulare; Per questioni di spazio e di attinenza alle tematiche non è possibile approfondire l'argomento in questa sede; il lettore interessato ad approfondire l'argomento può trovare una gran mole di informazioni nel testo indicato in bibliografia (2).

Il nostro laboratorio è coinvolto da anni nella ricerca di base sulle implicazioni del sesso in modelli cellulari umani; in particolare, i modelli da noi utilizzati sono costituiti dalle cellule HUVEC e dalle cellule HUASMC; le prime sono cellule endoteliali isolate dalla vena del cordone ombelicale, le seconde sono cellule muscolari isolate dalla muscolatura liscia delle arterie del cordone ombelicale. Questi due tipi cellulari rappresentano degli ottimi modelli sperimentali per indagare la funzione cardiovascolare dal momento che entrambi i tipi cellulari sono fortemente coinvolti nelle CVD.

I risultati preliminari del nostro laboratorio mostrano che il sesso di appartenenza, il sesso cellulare, condiziona fortemente alcuni aspetti cellulari tra i quali la migrazione, l'autofagia, lo stress ossidativo e l'apoptosi. Per entrare nel merito di uno dei processi da noi meglio studiati, l'autofagia, ossia la degradazione dei componenti della cellula a fini energetici e omeostatici, i nostri risultati mostrano che le cellule endoteliali maschili ricorrono maggiormente a questo processo, probabilmente a causa di un equilibrio redox più sfavorevole; nelle cellule muscolari il processo è più accentuato nelle femmine anziché nei maschi, anche se tuttora non se ne conoscono i motivi.

Il nostro progetto di ricerca, vincitore del premio destinato alla ricerca in medicina di genere e farmacologia di genere, si propone di proseguire lo sviluppo del lavoro da noi già iniziato sulla caratterizzazione dei processi cellulari sopracitati dal punto di vista del sesso-genere in condizioni basali e in seguito a stimolazione con alcuni fattori di interesse fisiopatologico. Verranno utilizzate cellule maschili e femminili HUVEC e HUASMC, provenienti da madri sane, non fumatrici, non affette da diabete gestazionale, non sottoposte a trattamento farmacologico e non obese; in aggiunta verranno utilizzate anche cellule provenienti da donne fumatrici e affette da diabete gestazionale. Le cellule verranno sottoposte a trattamento con diverse molecole ad azione pro-infiammatoria, pro-autofagica e pro-apoptotica (vedi riquadro), a nicotina e a deprivazione di siero (induzione di *starvation*)

Nello specifico, il progetto da noi proposto rivolgerà la propria attenzione ai seguenti processi cellulari:

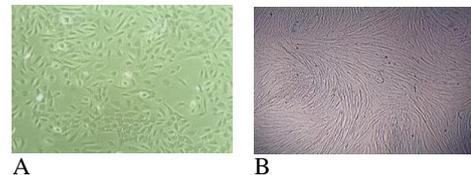
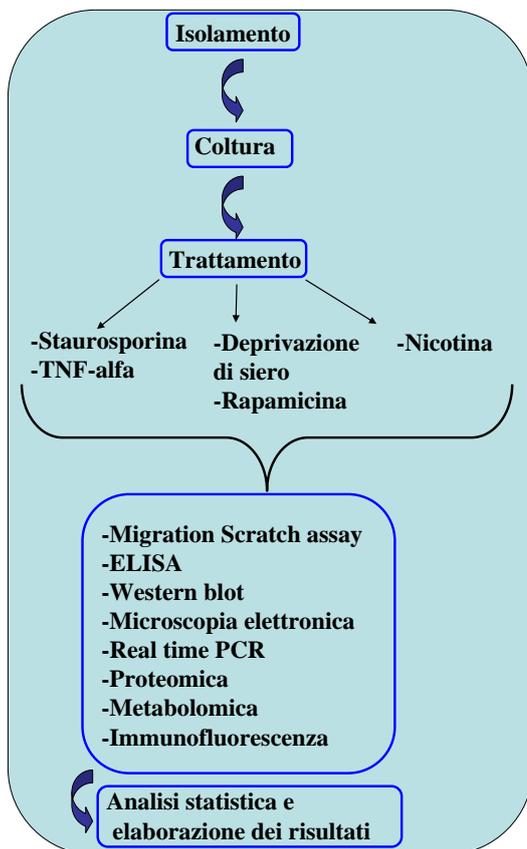


Fig.1A; Fotografia al microscopio ottico di cellule HUVEC; Si nota la conformazione a "cobblestone".
Fig.1B. Fotografia al microscopio ottico di cellule HUASMC; Si evidenzia la disposizione delle cellule a fasci paralleli.

- Autofagia: come già accennato, l'autofagia consiste nella degradazione di componenti cellulari al fine di mantenere l'omeostasi energetica e funzionale della cellula. Il grado di autofagia e la regolazione del processo saranno valutati mediante l'analisi delle proteine responsabili del processo mediante western blotting; saranno anche analizzate le immagini ottenute mediante microscopia elettronica a trasmissione.
- Apoptosi: L'apoptosi è un processo che porta le cellule a distruggere la propria organizzazione morfologica e funzionale fino alla totale dissoluzione della cellula stessa. È importante per la sopravvivenza d'organo e di tessuto e rappresenta l'esito di un processo ben definito (come nel caso della formazione dei tessuti) o di un insulto chimico, fisico o biologico di grado troppo elevato. Come per l'autofagia, indagheremo la regolazione e l'entità del processo mediante western blotting.
- Migrazione cellulare. La migrazione cellulare è un fenomeno estremamente importante durante l'isorgenza e il progredire della formazione della lesione aterosclerotica. Il nostro progetto valuterà la migrazione cellulare in seguito ai vari stimoli mediante la tecnica del *scratch assay*.
- Produzione di Ros. I reattivi dell'ossigeno svolgono un ruolo importante nella genesi di disfunzioni cellulari e nell'infiammazione. Pertanto verranno valutate le concentrazioni intra cellulari e nel surnatante di alcuni dei ROS più importanti, mediante l'utilizzo di kit commerciali.
- Valutazione dell'espressione dei recettori degli ormoni sessuali e dell'attività. Mediante la tecnica del western blotting e dell'immuno fluorescenza si indagherà la presenza di recettori per gli estrogeni (alfa e beta) e del testosterone. Si procederà anche a investigare l'espressione dei geni codificanti i suddetti recettori. Verrà valutata anche l'attività mediante il rilevamento delle forme fosforilate dei recettori e delle proteine ad esse contigue nel pathway cellulare.



In aggiunta allo studio sui processi elencati sopraelencati, verranno condotte analisi di proteomica (al fine di rilevare la produzione di alcune proteine pro infiammatorie come TNF α e peptidi vasocostrittori quali angiotensina II e endoteline.) e metabolomica (al fine di ricostruire la regolazione di alcuni aspetti del metabolismo, ad esempio il metabolismo dei folati e i pathways della transulfurazione ecc...). Infine, il risultato del lavoro sarà sottoposto alla più appropriata analisi statistica mediante il software Sigmastat.

Il progetto proposto ha l'obiettivo di far luce sulla regolazione dei sopracitati processi cellulari su cellule maschilie femminili, sia per le cellule di controllo, sia per le cellule sottoposte a vari trattamenti che mimano condizioni di infiammazione e disfunzione endoteliale, con l'obiettivo ultimo di individuare le differenze legate al sesso per riuscire a selezionare possibili nuovi target per terapie farmacologiche innovative e nuovi marker per il monitoraggio delle patologie cardiovascolari.

Fig.2; schema riassuntivo dell'organizzazione del Progetto.

Bibliografia

- 1) La Medicina di Genere, *la nuova frontiera della medicina* Hippocrates Edizioni Medico-Scientifiche, Milano, 2011
- 2) Sex and Gender Differences in Pharmacology, Handbook of Experimental Pharmacology 214 Springer editions, Berlin, 2012