



-Università del Piemonte Orientale-

“Amedeo Avogadro”

**ESPRESSIONE DI PPAR- α E PPAR- γ IN
MONOCITI/MACROFAGI DA PAZIENTI CON
CORONAROPATIA (CAD: CORONARY ARTERY
DISEASE) E DIFFERENZE DI GENERE**

XIV Ciclo di Dottorato in Medicina Molecolare

Tutor: Prof. Sandra Brunelleschi

Dottorando: Dott.ssa Alessandra Palma

Introduzione

I PPARs “*Peroxisome Proliferator Activated Receptors*” sono una famiglia di recettori ormonali nucleari di cui si conoscono tre isoforme, alfa, beta/delta e gamma. Sono implicati nella regolazione del metabolismo lipidico e glucidico, e svolgono un ruolo importante nel controllo dei fenomeni infiammatori che accompagnano l’evoluzione dell’aterosclerosi (Nunn et al., 2007).

L’attivazione dei recettori PPARs è altamente correlata alla risposta infiammatoria, ad esempio gli agonisti di PPAR riducono l’espressione delle molecole di adesione sulla superficie delle cellule endoteliali attivate, la produzione di citochine pro-infiammatorie come il TNF- α (*Tumor Necrosis Factor*), IL-6 (*Intereukin-6*) e IL-1 β (*Intereukin-1* β), e quindi, la diminuzione di infiltrato macrofagico nella placca arteriosclerotica (Amoruso et al., 2007; Brown and Plutzky 2007; Duval 2002; Li and Palinski 2006; Mandrad 2004).

L’isoforma PPAR α è stata la prima ad essere stata identificata, e svolge un ruolo fondamentale nel “*up-take*” e nell’ossidazione degli acidi grassi; inoltre agisce sulla regolazione dell’accumulo dei lipidi, sul metabolismo delle lipoproteine, sul differenziamento degli adipociti.

Durante i periodi di digiuno prolungato, gli acidi grassi sono rilasciati dal tessuto adiposo, assorbiti dal fegato e qui ossidati e metabolizzati in corpi chetonici. Gli agonisti di PPAR α stimolano la captazione dei trigliceridi, diminuendone così i livelli ematici, e riducono i livelli di acidi grassi liberi, inducono l’espressione delle lipasi e inibiscono l’attività dell’ apo-C3 (*apolipoprotein-C3*) nel fegato. L’attivazione di PPAR α aumenta la sintesi delle HDL (*High Density Lipoprotein*) attraverso la sintesi di apoA-1e -2 (*apolipoprotein-A-1 e-2*) e diminuisce i livelli di colesterolo aumentando l’espressione di ABCA-1 (*ATP-binding cassette transporter*), il trasportatore che media l’efflusso dei lipidi dalle cellule alle apolipoproteine povere di lipidi (Chinetti et al., 2006).

Inoltre l’attivazione di PPAR α inibisce l’accumulo di lipidi nei macrofagi, e quindi la formazione di *foam cell*, riducendo l’espressione di Apo-B 48 (recettore per le LDL presente sui chilimicroni); in più inibisce le metalloproteasi, stabilizzando la placca arteriosclerotica, e l’attività del fattore infiammatorio NF-kB (Babaev et al.,2007).

I più importanti ligandi naturali del PPAR α sono il leucotriene B4 e alcuni metaboliti delle prostaglandine come la 15-desossi-prostaglandina J₂ (15-dPGJ₂), mentre i fibrati, (gemfibrozil e fenofibrato) sono ligandi sintetici (Brown and Plutzky, 2007; Li and Palinski 2006).

L’isoforma γ dei recettori PPAR è espressa nelle cellule endoteliali, nelle cellule muscolari lisce, nei macrofagi, nei cardiomiociti e nel tessuto adiposo ed è attivato sia da da ligandi endogeni, quali la 15d-PGJ₂, uno dei più importanti metaboliti della PGD₂, il 15-HETE (15-

Hydroxyeicosatetraenoic acid), il 13-HODE (13-*Hidroxy octadecadienoid acid*) e le OX-LDL, sia da composti di sintesi, quali i tiazolidindioni, della famiglia di farmaci antidiabetici orali di ultima generazione (TDZ; ad es. rosiglitazone, ciglitazone, pioglitazone) e alcuni antiinfiammatori non steroidei (indometacina, ibuprofene). (Brown and Plutzky 2007; Li and Palinski 2006).

I TDZs si sono rivelati un ottimo *tool* farmacologico e hanno permesso di chiarire la via di segnale attivata da PPAR γ nel tessuto muscolare e adiposo. Infatti questi farmaci, una volta somministrati, si legano al recettore, che a sua volta va ad attivare i geni coinvolti nella sensibilizzazione insulinica. La somministrazione dei TDZ nei pazienti diabetici, aumenta la captazione del glucosio e il suo utilizzo a livello muscolare, aumenta la lipogenesi, diminuisce la lipolisi nel tessuto adiposo, riduce i livelli glucosio e la sintesi di lipoproteine a livello del fegato. (Ricote et al., 1998) Come PPAR α , anche PPAR γ gioca un ruolo fondamentale nei processi infiammatori. Infatti gli agonisti di PPAR γ inibiscono l'attivazione di NF-kB, AP-1, STAT-1, oltre a diminuire l'espressione di molecole di adesione nelle cellule endoteliali, il rilascio di chemochine e citochine pro-infiammatorie (IL-8, -12 e TNF- α) e inibire l'attività delle metalloproteasi.

In letteratura, alcuni lavori riportano come i ligandi di PPAR γ siano responsabili della stimolazione dell'espressione di alcuni recettori pro-infiammatori (es. CD14 e CD11/CD18) e dell'*up*-regolazione di *Scavenger Receptor* come il CD36 responsabile dell'*up take* delle LDL ossidate. (Collot-Teixera, 2007), così esercitando effetti pro-aterogeni.

Tuttavia, assai più numerosi sono i lavori che attribuiscono a PPAR γ un ruolo anti-aterogeno; gli effetti anti-aterogeni di PPAR γ sono attribuibili alla sua azione sugli *Scavenger Receptor A* nei macrofagi. Infatti, gli agonisti di PPAR γ aumentano l'attività di rimozione del colesterolo dai macrofagi inducendo l'espressione dei recettori per le HDL (CLA-1/SRB-1, ABCA1, ABCG1 e Apo E).

Recentemente, nel nostro laboratorio, abbiamo dimostrato che l'espressione di PPAR γ è costitutivamente più elevata nei macrofagi (MDM) rispetto ai monociti ed è altamente incrementata nelle cellule isolate da fumatori/fumatrici (Amoruso et al., 2007).

Considerato che il fumo di sigaretta rappresenta un importante fattore di rischio cardiovascolare, abbiamo voluto indagare l'espressione di PPAR γ in pazienti affetti da CAD (*Coronary artery disease*), con particolare attenzione ad eventuali differenze di genere.

Infatti, numerosi studi clinici ed epidemiologici evidenziano come, relativamente alle malattie cardiovascolari (CVD), il profilo di rischio, i tempi di presentazione e la probabilità di sopravvivenza dipendano dal genere (Franconi et al., 2007).

Ad esempio, il rischio di cardiopatia ischemica (CI) è 5 volte superiore nella popolazione maschile rispetto a quella femminile, in cui va invece crescendo progressivamente dopo la menopausa, fino a

raggiungere valori simili a quelli maschili in età avanzata. Tuttavia l'insorgenza, in età giovanile, nella donna, di CVD, ha una progressione molto più maligna rispetto all'uomo (Franconi et al., 2007; Mosca et al., 2002).

I più importanti fattori di rischio cardiovascolare riguardano entrambi i sessi, ma alcuni di essi risultano essere più pericolosi per le donne. Ad esempio, l'ipertensione viene identificata come fattore di rischio indipendente più importante nella donna, insieme all'età (Regitz-Zagrosek, 2006).

Il fumo è la principale causa prevenibile di morte per le donne, e più del 50% di infarti del miocardio sono associabili all'uso di tabacco. La menopausa rappresenta il passaggio, per una donna, da una condizione a basso rischio cardiovascolare ad un rischio maggiore, tale da eguagliare quello maschile. Il calo estrogenico, durante la menopausa, causa un aumento del colesterolo totale e in particolare delle LDL, a cui si associano una riduzione della frazione HDL e una riduzione della sensibilità all'insulina, che a sua volta condiziona un maggior rischio di sviluppare il diabete mellito (Elsasse et al., 2004; Leinwand et al., 2003; Mendelson et al., 2005; Xin et al., 2002).

Altro fattore importante è il diabete che aumenta il rischio di morte coronarica molto più nelle donne (3-7 volte) che negli uomini (2-3 volte).

Nel sesso maschile la placca arteriosclerotica inizia a rendersi evidente verso i 30 circa, mentre la donna è protetta durante la vita fertile dal cosiddetto "ombrello estrogenico" creato dagli ormoni sessuali, che favoriscono un profilo lipidico sfavorevole alla formazione della placca ateromatosa.

Considerando che la placca impiega dai 15 ai 25 anni per creare nell'arteria un restringimento emodinamicamente significativo, questo spiega perché nel sesso maschile le sindromi coronariche acute, in media, insorgono a partire dai 50 anni, mentre nelle donne questo avvenga dopo i 70 anni (Mosca et al., 2002).

Coerentemente con il programma del mio dottorato di ricerca (*PPARs as expression of gender differences in drug response and cardiovascular disease*), nel primo anno mi sono prevalentemente dedicata alla valutazione di possibili differenze di genere nell'espressione/attivazione di PPARs in pazienti affetti da CAD.

Materiali e Metodi

Reclutamento pazienti:

In collaborazione con i colleghi cardiologi sono stati reclutati 30 pazienti non fumatori con CAD (15 uomini e 15 donne) e 15 controlli sani non fumatori (7 uomini e 8 donne).

Tutti i pazienti (sintomatici per CAD) non erano sottoposti a terapia con TDZs o fibrati (che aumentano di per se' l'espressione dei PPARs). I dati anagrafici e clinici di ogni paziente sono riportati in un database dedicato.

Il protocollo di sperimentazione è stato approvato dal Comitato Etico dell'ospedale Civile Maggiore di Verona.

Preparazione di monociti umani (M) e Monocyte-Derived Macrophages (MDM)

I monociti umani (M) sono stati isolati da sangue venoso eparinizzato. Il sangue prelevato viene fatto sedimentare con una soluzione di destrano in rapporto 1:1 e centrifugato a 400g per 30' a temperatura ambiente su gradiente di Hystopaque (densità = 1.077 g/cm³). L'anello di cellule mononucleate viene trasferito in un altro tubo e lavato con PBS (phosphate-buffered saline pH 7.4) per 10' a 250g per tre volte; le cellule così recuperate vengono piastrate in RPMI 1640 medium, con l'aggiunta di FBS al 5% (*fetal bovine serum* scomplementato), 2 mM di glutammina, 50 µg ml⁻¹ di streptomina, 5 U ml⁻¹ di penicillina e 2.5 µg ml⁻¹ di anfotericina B (Brunelleschi *et al.*, 1998). La popolazione purificata di monociti viene ottenuta per adesione (90', 37°C, 5% CO₂) e le cellule in sospensione (principalmente linfociti) vengono rimosse con tre lavaggi di PBS; la vitalità cellulare viene valutata con "trypan blue dye exclusion" ed è normalmente > 98% (Brunelleschi *et al.*, 1998). I *Monocyte-Derived Macrophages* (MDM) sono ottenuti da monociti incubati a 37°C per 8-10 giorni con RPMI 1640 completo con l'aggiunta del 20% di FBS, con cambi di terreno ogni 2-3 giorni. Gli MDM vengono considerati cellule "macrophage-like", grazie alla diminuzione dei *marker* di superficie CD14 (soltanto il 25-30% degli MDM sono CD14⁺) ed all'assenza dell'espressione del *marker* CD1a che dimostra che nelle preparazioni di MDM non ci sono cellule che si stanno differenziando in cellule dendritiche (Amoruso *et al.*, 2008).

Espressione proteica e semiquantificazione di PPAR

Le cellule, piastrate nelle piastre da sei pozzetti, sono state lavate due volte con PBS freddo e staccate in tampone di lisi (3% SDS, 0.25 M Trizma base e 1 mM PMSF, phenyl-methyl-sulfonyl fluoride). Le cellule lisate sono state sottoposte a *shock* termico. La determinazione delle concentrazioni proteiche è stata fatta con metodo BCA. I campioni di proteina (20 µg) sono stati analizzati con SDS-PAGE (10% acrilammide) e trasferiti su membrane di nitrocellulosa. Gli *immunoblots* sono stati eseguiti con metodiche standard utilizzando i seguenti anticorpi: anticorpo monoclonale anti-PPAR γ (Santa Cruz 1:1000 in TBS-Tween 5% latte) anticorpo monoclonale anti-PPAR α (ABCAM 1:1000 in TBS-Tween 5% latte) ed anticorpo monoclonale β -actina (Sigma; 1:5000 in TBS-Tween 3% BSA). L'anticorpo secondario utilizzato è associato con la perossidasi (Amersham Biosciences). Le proteine sono state visualizzate attraverso un sistema di intensificazione della chemiluminiscenza (ECL, Perkin Elmer). Il segnale di chemiluminiscenza è stato analizzato con un densitometro in condizioni non saturanti (Versadoc, Bio-Rad, Hercules, CA, USA). La valutazione semi-quantitativa delle proteine PPAR è stata valutata calcolando il rapporto tra l'espressione proteica di PPAR e quella della β -actina, quest'ultima utilizzata come proteina *house-keeping*.

Isolamento dell'RNA e Real-time PCR

L'RNA totale è stato estratto dai monociti con: *GenElute Mammalian Total RNA Miniprep Kit* (Sigma), e la purezza e la quantità di RNA totale è stata valutata tramite metodo spettrofotometrico (260-280 nm). La sintesi del cDNA è stata eseguita con: *High Capacity cDNA Reverse Transcription kit* (Applied Biosystem; Carlsbad, CA). Sono stati successivamente caricati 4 µl di cDNA template in piastre da 96 pozzetti (*Optical Reaction Plates*; Applied Biosystem) con 1 µl di *TaqMan Expression Assay* (PPAR γ), 5 µl RNasi free water, 10 µl *TaqMan Universal PCR Master Mix* (2x) (senza *AmpErase* UNG). I campioni sono stati analizzati con *Applied Biosystem 7000 ABI Prism System*. Il gene di controllo endogeno usato per la normalizzazione che è stato utilizzato è la glucoronidasi beta.

Risultati

Per questo studio sono stati reclutati 30 pazienti (15 uomini e 15 donne) non fumatori CAD (Coronary Artery Disease) e 15 controlli sani non fumatori (7 uomini e 8 donne). Le caratteristiche cliniche e demografiche sono riportate nella tabella 1.

Le donne in studio erano in fase post-menopausale e non sottoposte a terapia sostitutiva ormonale. Tutti i pazienti non erano sottoposti a terapia con TDZs o fibrati (che aumentano di per se' l'espressione dei PPARs).

	CAD, F (n=15)	CAD, M (n=15)	Healthy, F (n=8)	Healthy, M (n=7)
Età, anni	66 ± 2.8	65.5 ± 2	63 ± 3	64.2 ± 3
BMI, kg/m ²	26.1 ± 1.1	28.4 ± 0.8	25.8 ± 0.9	27 ± 1.1
Dislipidemia	10/15	8/15	-	-
Ipertensione	12/15	11/15	-	-
Diabete mellito	5/15	4/15	-	-
Familiarità CHD	5/15	4/15	-	-
Angina instabile	8/15	7/15	-	-
Coronaropatia multivasale	5/15	5/15	-	-
Glucosio, mmol/L	7.15 ± 0.7	6.99 ± 0.4	5.9 ± 0.9	6.1 ± 0.7
Total C, mmol/L	4.55 ± 0.28	4.93 ± 0.23	4.6 ± 0.2	4.7 ± 0.2
LDL-C, mmol/L	2.76 ± 0.22	3.29 ± 0.2	2.8 ± 0.2	3.1 ± 0.2
HDL-C, mmol/L	1.13 ± 0.08	1.13 ± 0.06	1.36 ± 0.1	1.1 ± 0.05
TG, mmol/L	1.27 ± 0.14	1.16 ± 0.12	1.3 ± 0.1	1.3 ± 0.1
Nitrati	11/15	11/15	-	-
Ca-antagonisti	2/15	4/15	-	-
ACE-I ± AT1 bloccanti	10/15	12/15	-	-
β-bloccanti	13/15	8/15	-	-
Statine	9/15	7/15	-	-
Aspirina	13/15	14/15	-	-
Antidiabetici	5/15	5/15	-	-

Tabella 1. Caratteristiche demografiche e cliniche dei pazienti CAD e dei donatori sani

Come riportato in Fig. 1 nei monociti, nei M 4d e nei MDM di pazienti CAD l'espressione costitutiva di PPAR γ è significativamente aumentata (circa 10 volte) rispetto ai volontari sani. Inoltre, a conferma di precedenti osservazioni del laboratorio (Amoruso et al., 2007), l'espressione di PPAR γ è maggiore durante il differenziamento da monociti a macrofagi.

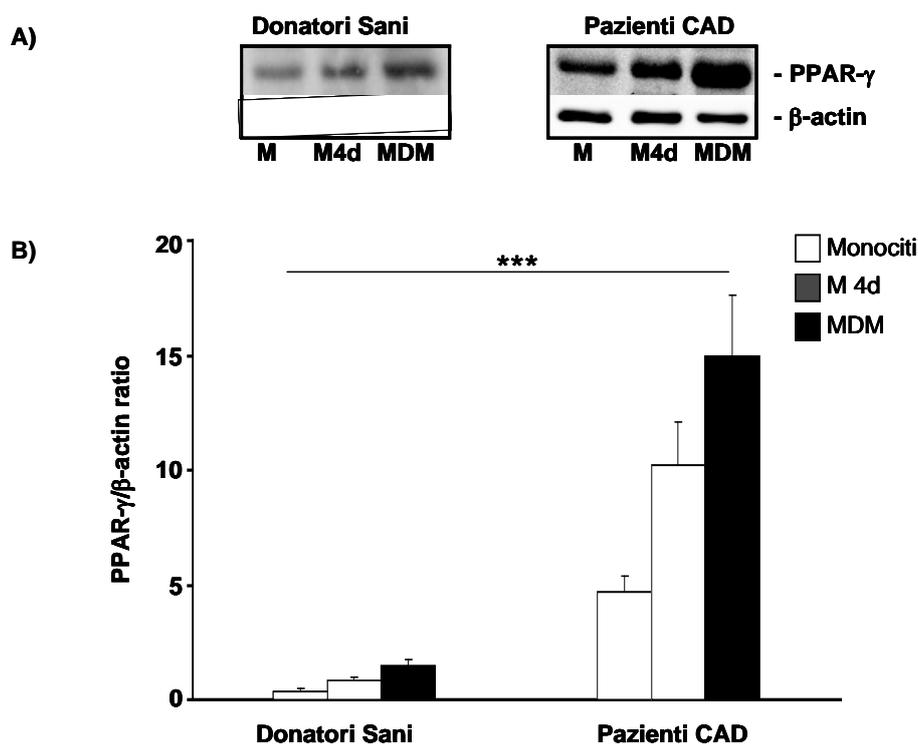


Fig1: Espressione costitutiva di PPAR γ in monociti, MDM e M 4d da donatori sani e pazienti CAD. A: Blot PPAR γ e β actina in monociti, MDM e M 4d; B: espressione semiquantitativa di PPAR γ (*) $p < 0.001$)**

Andando a valutare l'espressione di PPAR γ , separatamente nei due sessi, è possibile evidenziare (Fig.2) che non c'è nessuna differenza di genere nelle cellule (monociti e macrofagi) isolate da donatori sani. Al contrario, nei pazienti affetti da CAD, le donne mostrano un'espressione costitutiva di proteina significativamente superiore rispetto agli uomini (PPAR γ / β actina in monociti 5.80 ± 0.85 e $3,62 \pm 0.46$ ($n= 15$; $p < 0.05$) in MDM: 18.15 ± 3.82 e 11.85 ± 1.43 ($n= 15$; $p < 0.05$).

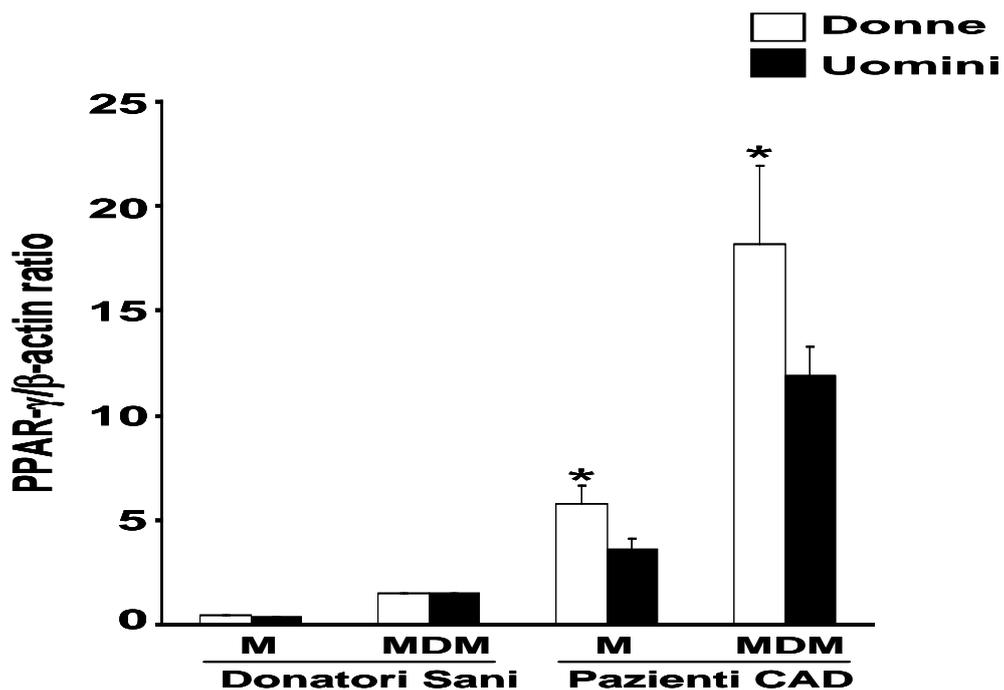


Fig.2 Espressione semiquantitativa di PPAR γ in monociti e macrofagi isolati da donatori sani e pazienti CAD

Valutando l'espressione di PPAR α , non abbiamo evidenziato alcune differenze ne' tra monociti e macrofagi, ne' tra i due gruppi (donatori sani e pazienti CAD) ne' a livello di genere. (Fig.3)

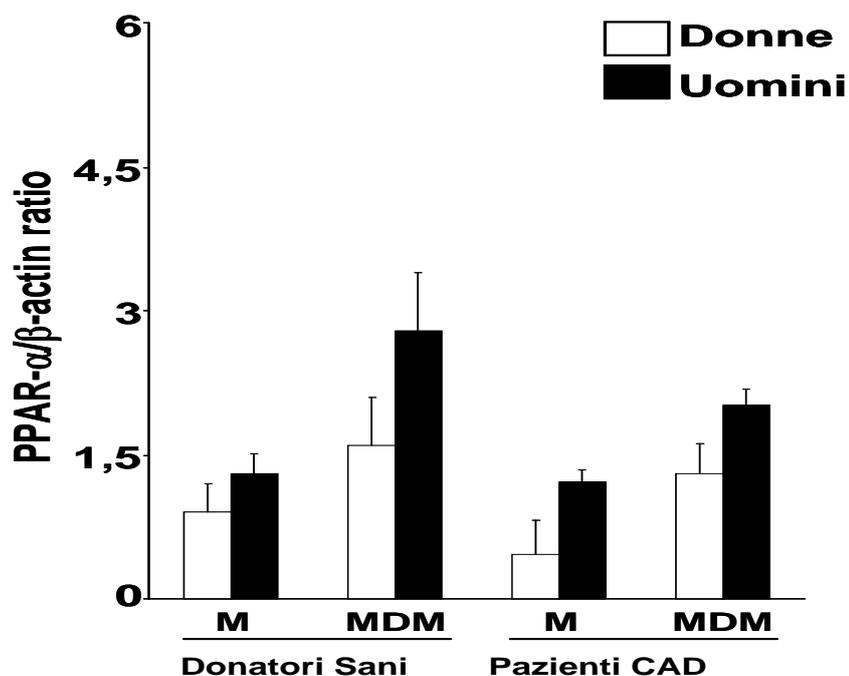


Fig.3 Espressione semiquantitativa di PPAR α in monociti e macrofagi isolati da donatori sani e pazienti CAD

Numerose osservazioni documentano che gli agonisti PPAR γ , sia i ligandi endogeni quali la 15d-PGJ₂, che esogeni, come il rosiglitazone, aumentano l'espressione della proteina nei monociti e macrofagi (Amoruso et al., 2007).

Come riportato in tabella 2, i due ligandi determinano un aumento dell'espressione di PPAR γ (di circa \square 2.5 volte per la 15d-PGJ₂ e di circa 4 volte per il rosiglitazone), sia nei monociti che negli MDM, ma senza alcuna differenza statisticamente rilevante tra i tipi cellulari, nei volontari sani e pazienti, uomini e donne.

	Aumento dell'espressione PPAR-γ/β-actina	
	+ 15d-PGJ ₂ 10 μ M (<i>n</i> = 5)	+ Rgtz 5 μ M (<i>n</i> = 5)
Monociti, Sani, M	2.5 \pm 0.3	4 \pm 0.4
Monociti, Sani, F	2.6 \pm 0.4	3.9 \pm 0.3
Monociti, CAD, M	2.7 \pm 0.3	4 \pm 0.3
Monociti, CAD, F	2.8 \pm 0.3	4.2 \pm 0.4
MDM, Sani, M	2.6 \pm 0.2	4 \pm 0.3
MDM, Sani, F	2.7 \pm 0.3	4.2 \pm 0.4
MDM, CAD, M	2.7 \pm 0.2	4.1 \pm 0.4
MDM, CAD, F	2.8 \pm 0.4	4.4 \pm 0.3

Tabella 2: I ligandi selettivi di PPAR γ aumentano l'espressione della proteina in monociti e macrofagi.

I risultati finora ottenuti sono stati confermati anche dallo studio dell'espressione genica di PPAR γ in monociti isolati da donatori sani (*n*= 8; 4 uomini e 4 donne) e da pazienti CAD (*n*= 15; 9 uomini e 6 donne).

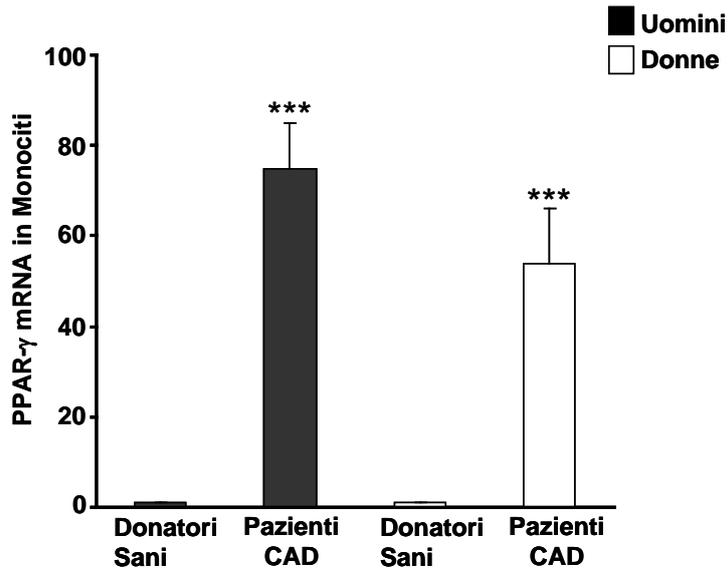


Fig.4 Espressione genica di PPAR γ in monociti da donatori sani e pazienti CAD

Come riportato nella Fig.4, il livello di mRNA di PPAR γ nei monociti isolati dai pazienti CAD è di circa 60 volte superiore rispetto ai controlli sani ($p < 0.001$), ma non è apprezzabile nessuna differenza di genere.

Partendo dal presupposto che l'espressione di PPAR γ è direttamente correlata alla sua attivazione, è stata valutata la sua capacità di legare il DNA tramite tecnica EMSA.

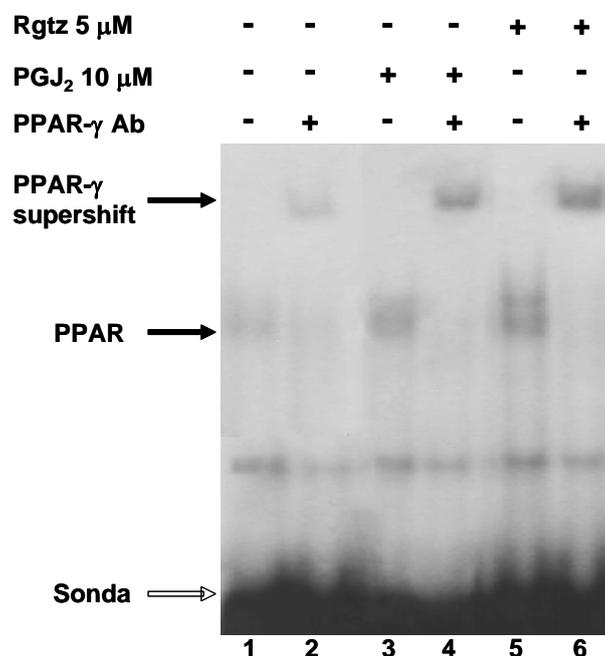


Fig.5 Attivazione di PPAR γ in monociti da donatori sani. Le cellule sono state stimulate con 10 μ l di 15d-PGJ₂ (lane 3 e 4) o con 5 μ l di rosiglitazone (lane 5 e 6); le cellule non stimulate (lane 1 e 2).

Come si vede nella Fig.5 entrambi gli agonisti di PPAR γ (*lane 3* PGI $_2$ e *lane 5* rosiglitazone) aumentano l'attivazione della proteina rispetto agli estratti nucleari dei monociti non trattati (*lane 1*). Inoltre per dimostrare in modo inequivocabile il coinvolgimento di PPAR γ è stato usato un saggio di *supershift* (con l'anticorpo specifico per PPAR) (*lane 2, 4, 6*).

Avendo dimostrato come PPAR γ sia maggiormente espresso nei pazienti CAD rispetto ai donatori sani, si è andati a valutare una possibile relazione tra PPAR γ e alcuni parametri clinici (LDL-C, HDL-C, BMI, glucosio, trigliceridi e colesterolo totale). Nessuna correlazione significativa è stata riscontrata tra l'espressione di PPAR γ e HDL-C, BMI, glucosio, trigliceridi e colesterolo totale (dati non mostrati).

Al contrario, nei pazienti CAD (uomini e donne) è stata riscontrata una correlazione inversa tra l'espressione di PPAR γ nei monociti e i livelli di LDL-C ($r = -0.467$; $p = 0.009$). (Fig.6A)

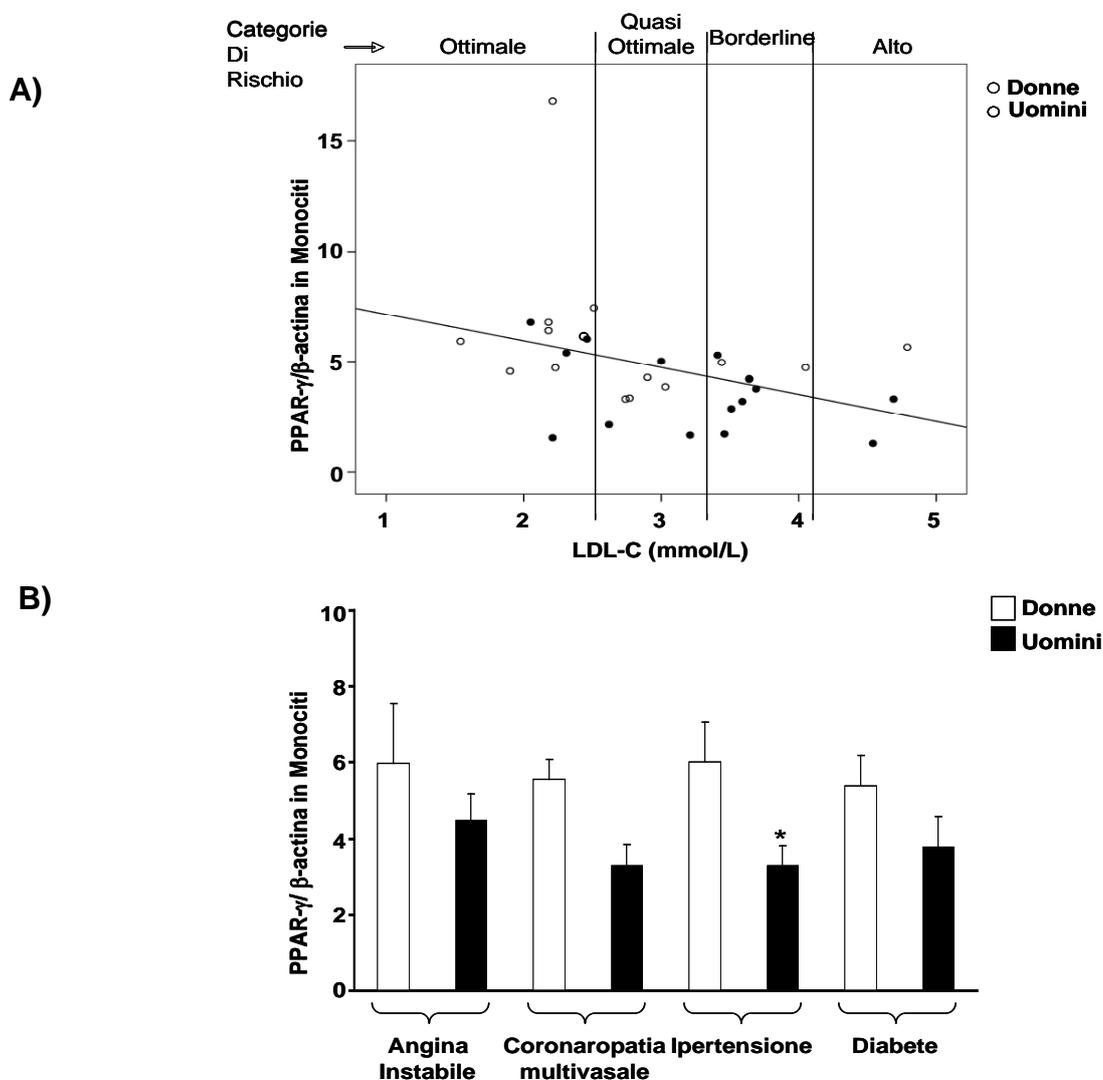


Fig.6 Correlazione tra l'espressione di PPAR γ in monociti da pazienti CAD e parametri clinici. **A:** correlazione inversa tra espressione di PPAR γ e i livelli di LDL-C ($r = -0.467$; $p = 0.009$). **B:** Espressione di PPAR γ in monociti derivati da pazienti CAD uomini e donne (angina instabile, $n = 8$ donne e 7 uomini; coronaropati multi vasale, $n = 5$ donne e 5 uomini; ipertensione, $n = 12$ donne e 11 uomini; diabete, $n = 5$ donne e 4 uomini) $p < 0,05$ vs monociti donne.

Inoltre, analizzando l'espressione di PPAR γ nei monociti in correlazione ad alcune patologie caratteristiche dei pazienti CAD, (angina instabile, coronaropatia multi vasale, ipertensione e diabete) abbiamo evidenziato una significativa differenza di genere solo per l'ipertensione ($p=0.05$). (Fig.6B)

L'attivazione dei recettori PPARs è altamente correlata alla risposta infiammatoria: infatti, gli agonisti di PPAR riducono la produzione di citochine pro-infiammatorie come TNF- α (*Tumor Necrosis Factor*) l' IL-6 (*Interleukin-6*) (Amoruso 2007; Brown and Plutzky 2007; Duval 2002; Li and Palinski 2006; Mandrad 2004).

Partendo da questo presupposto, siamo andati a misurare la liberazione basale di citochine per valutare, nei monocito/macrofagi di donatori sani e pazienti CAD, una eventuale differenza di genere.

I monociti e gli MDM dei pazienti CAD liberano maggiore quantità di TNF- α rispetto ai donatori sani (Fig.7A). Nessuna differenza di genere è stata osservata, in entrambi i tipi cellulari, nei donatori sani, al contrario, i monociti e i macrofagi delle pazienti donne CAD liberano una minor quantità di TNF- α rispetto agli uomini ($p < 0.05$; Fig.7A).

Valutando la liberazione basale di IL-6 (Fig 7B), è evidente l'aumentato "release" spontaneo dei monociti isolati da pazienti CAD rispetto ai volontari sani ($p < 0.05$), senza però alcuna differenza di genere. Infine, non è stata documentata alcuna variazione significativa nella liberazione della citochina pro-infiammatoria IL-10. (Fig.7C).

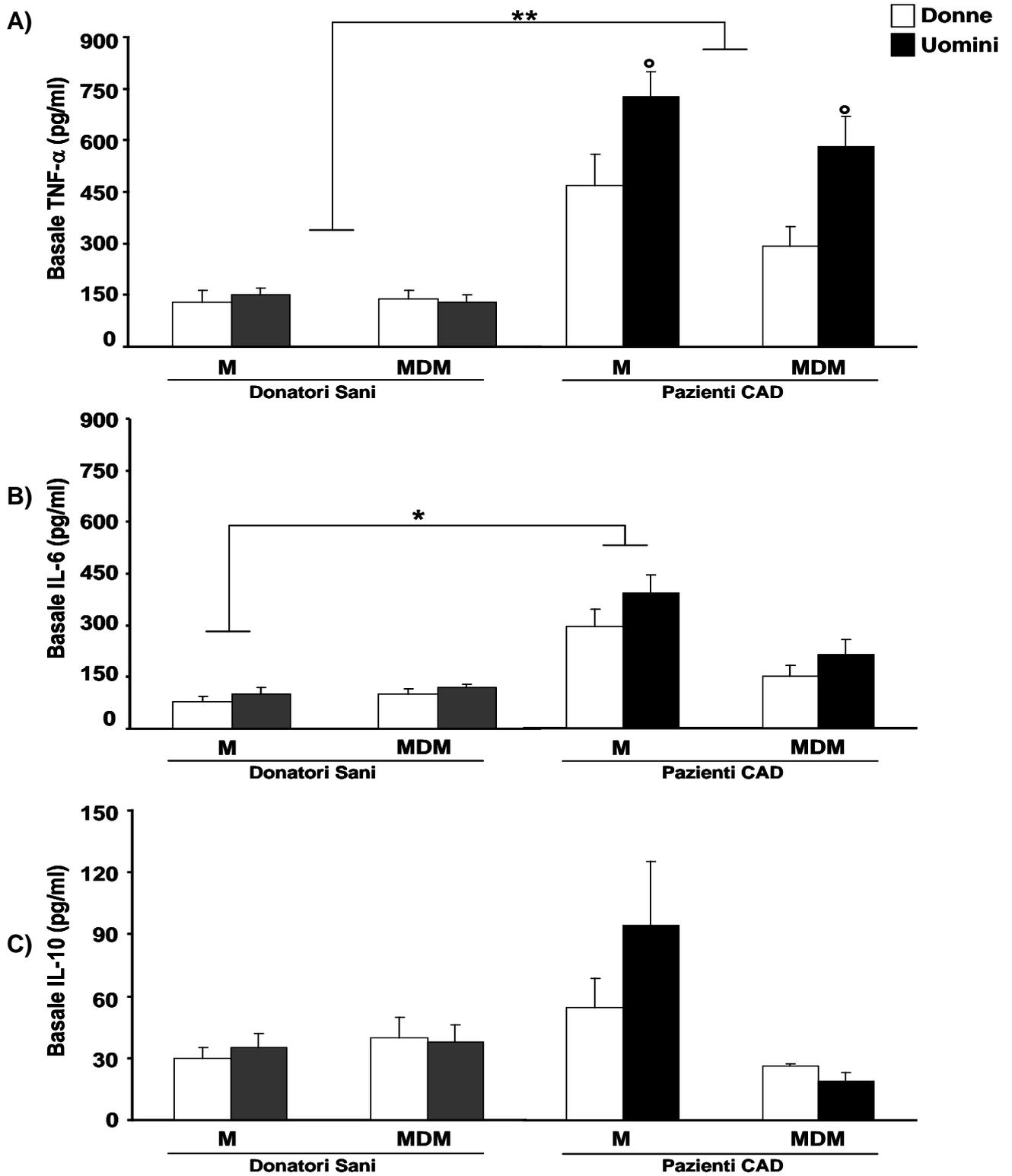


Fig.7 Rilascio basale di TNF- α , IL-6 e IL-10 in monociti (M) e macrofagi (MDM) da pazienti CAD e donatori sani. A: TNF- α ; B: IL-6; C: IL-10.

** $p < 0.01$, CAD vs donatori sani; * $p < 0.05$, monociti CAD vs monociti donatori sani; ^o $p < 0.05$ vs donne.

Discussione

Nonostante i recettori PPAR α e PPAR γ siano conosciuti come mediatori anti-infiammatori e anti-aterogeni, non si hanno informazioni sulla loro espressione quantitativa; inoltre, solo pochi studi hanno valutato la loro rilevanza nei pazienti CAD.

Con questo studio pilota abbiamo voluto analizzare l'espressione di PPAR α e PPAR γ in monocito/macrofagi isolati da donatori sani e pazienti CAD, reclutando pazienti di entrambe i sessi, con caratteristiche cliniche e demografiche simili ma non fumatori. (Amoroso et al., 2007)

Il primo importante risultato dello studio è la dimostrazione che i monociti isolati da pazienti CAD esprimono costitutivamente livelli più elevati valori di proteina PPAR γ (c.ca 10 volte) e del relativo mRNA (c.ca 60 volte) rispetto a donatori sani; ma non di PPAR α .

Questo dato è in accordo con i risultati di Teupser et al. (2008) i quali mostrano un aumento dell'mRNA di CD36, nei monociti isolati da pazienti CAD. Inoltre è noto in letteratura che l'attivazione trascrizionale di PPAR γ aumenta l'espressione di CD36 (Chawla et al., 2001).

CD36 è uno *scavenger receptor* presente sulla superficie dei monocito/macrofagi; questo recettore gioca un ruolo importante nello sviluppo della lesione aterosclerotica grazie alla sua capacità di legare e endocitare le OX-LDL ed è inoltre implicato nella formazione di *foam cells* (Collot-Teixeira et al., 2007).

Nel paziente affetto da CAD si sviluppa uno stato di infiammazione locale dovuto ad un prolungato reclutamento dei monociti (che poi differenziano in macrofagi). L'accumulo di esteri di colesterolo nei macrofagi, con conseguente formazione di *foam cells*, dipende dall'*uptake* delle LDL e dall'efflusso di colesterolo libero controllato principalmente da ABCA-1.

Mentre alcuni studi supportano il ruolo pro-aterogenico di PPAR γ (Tontonoz et al., 1998), altri lavori reputano PPAR γ un recettore con un ruolo anti-aterogenico (Chawla et al., 2001; Chinetti et al., 2001). Infatti, l'espressione di PPAR γ aumenta sì l'espressione di CD36, ma l'aumento dell'espressione di questo *marker* è controbilanciato dalla diminuzione dell'espressione degli *scavenger receptor A* e dell'LXR (Liver X Receptor).

Un altro risultato interessante è la dimostrazione che i monocito/macrofagi isolati da donne affette da CAD esprimono livelli maggiori di proteina PPAR γ rispetto agli uomini, ma, come dimostrato dai risultati ottenuti con *real time-PCR*, non c'è *up* regolazione del gene. Da ciò si può dedurre che la differenza di genere rilevata è dovuta a modificazione post-trascrizionali.

L'esistenza di una differenza di genere è stata precedentemente riscontrata (Vidal-Puig et al., 1997) nel tessuto adiposo sottocutaneo sia di individui normopeso che obesi, dove le donne mostrano un aumento di espressione di PPAR γ -1 e -2 rispetto agli uomini.

Un'altra importante osservazione riguarda la possibile correlazione tra la proteina PPAR γ e la liberazione di citochine da monocito/macrofagi isolati da volontari sani e pazienti CAD.

E' noto che il rilascio di citochine è un fenomeno molto complesso che coinvolge diversi *pathway* finemente regolati (Andreakos et al., 2004; Amoruso et al., 2008).

TNF- α e IL-6 rappresentano importanti *marker* di rischio di malattie cardiovascolari e i pazienti affetti da CAD presentano maggiori livelli di queste citochine rispetto ad individui sani (Blake and Ridker, 2002; Ridker et al., 2002; Skoog et al., 2002).

I risultati da noi ottenuti sono in buon accordo con i dati della letteratura; infatti, i monocito/macrofagi ottenuti dai pazienti CAD liberano spontaneamente maggiori quantità di TNF- α e IL-6 rispetto ai donatori sani. Interessante è, da nostro avviso, l'osservazione che i monocito/macrofagi delle donne CAD, che esprimono maggiori livelli di proteina PPAR γ , liberano meno TNF- α rispetto agli uomini CAD.

Andando a valutare l'espressione di PPAR γ relativamente a parametri clinici (indice di massa corporea, diabete mellito, angina instabile coronaropatia multi vasale e ipertensione), abbiamo documentato una differenza di genere solo nel caso dell'ipertensione, le donne esprimono più proteina PPAR γ rispetto agli uomini.

Nel nostro studio, circa i due terzi dei pazienti CAD sono in trattamento con ACE-inibitori e AT1 bloccanti che, in vitro e ad alte concentrazioni, aumentano l'espressione di PPAR γ in adipociti differenziati (Schupp et al., 2004, 2006; Storka et al., 2008).

Non riteniamo che la differenza di genere dell'espressione di PPAR γ dipenda dalla terapia farmacologica; infatti un numero simile di pazienti (10 donne e 12 uomini) risultavano in trattamento con ACE-inibitori.

Inoltre, andando a valutare la correlazione tra l'espressione di PPAR γ e i livelli di LDL-C, si è visto come alti livelli di PPAR γ corrispondono a bassi livelli di LDL-C nei monociti. La relazione è meno evidente negli MDM, e può in qualche misura dipendere dal tempo (8-10 giorni) necessario per la differenziazione da monociti a macrofagi.

Circa la metà dei pazienti reclutati in questo studio è in trattamento con statine. Yano et al., (2007) hanno dimostrato che le statine inducono l'espressione di PPAR γ in una linea cellulare macrofagica in vitro. Tuttavia, l'effetto è ottenuto a concentrazioni elevate, ben superiori a quelle che sono le posologie somministrate ai nostri pazienti.

In accordo con dati di letteratura, le proprietà anti-infiammatorie e anti-aterogene degli agonisti di PPAR γ sono ben documentati, anche se recentemente alcuni studi hanno evidenziato un aumento del rischio di malattie cardiovascolari nei pazienti diabetici trattati con rosiglitazone.(Home et al., 2007; Nissen and Wolsky, 2007). Ancora più recentemente alcuni studi clinici, hanno evidenziato il ruolo benefico del rosiglitazone nei pazienti obesi (Manning et al., 2008) e nei pazienti diabetici con CAD dopo angioplastica coronarica (Wang et al., 2008).

Pertanto, riteniamo che l'aumentata espressione di PPAR γ (e la riduzione della liberazione di TNF- α) che abbiamo documentato nelle donne affette da CAD, rispetto agli uomini, possa svolgere un ruolo protettivo.

Bibliografia

Amoruso A, Bardelli C, Gunella G, Fresu LG, Ferrero V, and Brunelleschi S (2007) Quantification of PPAR-gamma protein in monocyte/macrophages from healthy smokers and non-smokers: a possible direct effect of nicotine. *Life Sci* **81**:906–915.

Amoruso A, Bardelli C, Gunella G, Ribichini F, and Brunelleschi S (2008) A novel activity for substance P: stimulation of peroxisome proliferator-activated receptor- γ in human monocytes and macrophages. *Br J Pharmacol* **154**:144–152.

Andreaskos E, Sacre SM, Smith C, Lundberg A, Kiriakidis S, Stonehouse T, Monaco C, Feldmann M, and Foxwell BM (2004) Distinct pathways of LPS-induced NF- κ B activation and cytokine production in human myeloid and non-myeloid cells defined by selective utilization of MyD88 and Mal/TIRAP. *Blood* **103**:2229–2237.

Antoniucci D, Miller VM, Sieck GC, Fitzpatrick LA. Gender-related differences in proliferative responses of vascular smooth muscle cells to endothelin-1. *Endothelium* 2001;8:137–45.

Babaev VR, Ishiguro H, Ding L, Yancey PG, Dove DE, Kovacs WJ, Semenkovich CF, Fazio S, and Linton MF (2007) Macrophage expression of peroxisome proliferator activated receptor- α reduces atherosclerosis in low-density lipoprotein receptor deficient mice. *Circulation* **116**:1404–1412.

Blake GJ and Ridker PM (2002) Inflammatory bio-markers and cardiovascular risk prediction. *J Intern Med* **252**:283–294.

Brown JD and Plutzky J (2007) Peroxisome proliferator-activated receptors as transcriptional nodal points and therapeutic targets. *Circulation* **115**:518–533.

Chawla A, Boisvert WA, Lee CH, Laffitte BA, Barak Y, Joseph SB, Liao D, Nagy L, Edwards PA, Curtiss LK, et al. (2001) A PPAR α -LXR-ABCA1 pathway in macrophages is involved in cholesterol efflux and atherogenesis. *Mol Cell* **7**:161–171.

Chinetti G, Fruchart JC, Staels B (2006) Transcriptional regulation of macrophage cholesterol trafficking by PPAR α and LXR. *Biochem Soc Trans.*34(Pt 6):1128-31. Review. Erratum in: *Biochem Soc Trans.* 2007 Feb;35(Pt 1):165

Chinetti G, Lestavel S, Bocher V, Remaley AT, Neve B, Torra IP, Teissier E, Minnich A, Jaye M, Duverger N, et al. (2001) PPAR- γ and PPAR- α activators induce cholesterol removal from human macrophage foam cells through stimulation of the ABCA1 pathway. *Nat Med* **7**:53–58.

Collot-Teixeira S, Martin J, McDermott-Roe C, Poston R, and McGregor JL (2007) CD36 and macrophages in atherosclerosis. *Cardiovasc Res* **75**:468–477.

Cross HR, Murphy E, Koch WJ, Steenbergen C. (2002) Male and female mice overexpressing the beta(2)-adrenergic receptor exhibit differences in ischemia/reperfusion injury: role of nitric oxide. *Cardiovasc Res*;53:662–71.

Duval C, Chinetti G, Trottein F, Fruchart JC, and Staels B (2002) The role of PPARs in atherosclerosis. *Trends Mol Med* **8**:422–430.

- Elsaesser A, Hamm CW. Acute coronary syndrome: the risk of being female(2004). *Circulation* 109:565–7.
- Franconi F, Brunelleschi S, Steardo L, Cuomo V (2007) Gender differences in drug responses. *Pharmacol Res.*55(2):81-95. Epub 2006 Nov 6. Review.
- Home PD, Pocock SJ, Beck-Nielsen H, Gomis R, Hanefeld M, Jones NP, Komajda M, McMurray JJ, and RECORD Study Group (2007) Rosiglitazone evaluated for cardiovascular outcomes—an interim analysis. *N Engl J Med* 357:28–38.
- Leinwand LA. (2003) Sex is a potent modifier of the cardiovascular system. *J Clin Invest*;112:302–7.
- Li AC and Palinski W (2006) Peroxisome proliferator-activated receptors: how their effects on macrophages can lead to the development of a new drug therapy against atherosclerosis. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 46:1–39.
- Mandard S, Müller M, and Kersten S (2004) Peroxisome proliferator-activated receptor α target genes. *Cell Mol Life Sci* 61:393–416.
- Manning PJ, Sutherland WH, Walker RJ, Williams SM, de Jong SA, and Berry EA (2008) The effect of rosiglitazone on oxidative stress and insulin resistance in overweight individuals. *Diabetes Res Clin Pract* 81:209–215.
- Mendelsohn ME, Karas RH. (2005) Molecular and cellular basis of cardiovascular gender differences. *Science*;308:1583–7.
- Mosca L. Epidemiology and prevention of heart disease.(2002) In: Douglas PS, editor. *Cardiovascular health and disease in women*. Philadelphia: WB Saunders;. p. 23–8.
- Nissen SE and Wolski K (2007) Effect of rosiglitazone on the risk of myocardial infarction and death from cardiovascular causes. *N Engl J Med* 356:2457–2471.
- Nunn AV, Bell J, Barter P. (2007) The integration of lipid-sensing and anti-inflammatory effects: how the PPARs play a role in metabolic balance. *Nucl Recept.* May 25;5(1):1.
- Osterud B and Bjorklid E (2003) Role of monocytes in atherogenesis. *Physiol Rev* 83:1069–1112.
- Regitz-Zagrosek V. (2006) Therapeutic implications of gender-specific aspects of cardiovascular disease. *Nat Rev Drug Discov*;5:425–38
- Ricote M, Li AC, Willson TM, Kelly CJ, and Glass CK (1998) The peroxisome proliferator-activated receptor-gamma is a negative regulator of macrophage activation. *Nature* 391:79–82.
- Ridker PM, Rifai N, Stampfer MJ, and Hennekens CH (2000) Plasma concentration of interleukin-6 and the risk of future myocardial infarction among apparently healthy men. *Circulation* 101:1767–1772.
- Rossi ML, Merlini PA, Ardissino D. Percutaneous coronary revascularisation in women (2001). *Thromb Res*;103:S105–11.
- Schupp M, Janke J, Clasen R, Unger T, and Kintscher U (2004) Angiotensin type 1 receptor blockers induce peroxisome proliferator-activated receptor- γ activity. *Circulation* 109:2054–2057.

Schupp M, Lee LD, Frost N, Umbreen S, Schmidt B, Unger T, and Kintscher U (2006) Regulation of peroxisome proliferator-activated receptor γ activity by losartan metabolites. *Hypertension* **47**:586–589.

Skoog T, Dichtl W, Boquist S, Skoglund-Andersson C, Karpe F, Tang R, Bond MG, de Faire U, Nilsson J, Eriksson P, et al. (2002) Plasma tumour necrosis factor α and early carotid atherosclerosis in healthy middle-aged men. *Eur Heart J* **23**:376–383.

Storka A, Vojtassakova E, Mueller M, Kapiotis S, Haider DG, Jungbauer A, and Wolzt M (2008) Angiotensin inhibition stimulates PPAR γ and the release of visfatin. *Eur J Clin Invest* **38**:820–826.

Teupser D, Mueller MA, Koglin J, Wilfert W, Ernst J, von Scheidt W, Steinbeck G, Seidel D, and Thiery J (2008) CD36 mRNA expression is increased in CD14 monocytes of patients with coronary heart disease. *Clin Exp Pharmacol Physiol* **35**:552–556.

Tontonoz P, Nagy L, Alvarez JG, Thomazy VA, and Evans RM (1998) PPAR γ promotes monocyte/macrophage differentiation and uptake of oxidized LDL. *Cell* **93**:241–252.

Vidal-Puig AJ, Considine RV, Jimenez-Linan M, Werman A, Pories WJ, Caro JF, and Flier JS (1997) Peroxisome proliferator-activated receptor gene expression in human tissues. *J Clin Invest* **99**:2416–2422.

Wang G, Zhang Z, Yu J, Zhang F, He L, Wei J, Mao J, and Wang X (2008) Antidiabetic rosiglitazone reduces soluble intercellular adhesion molecule-1 level in type 2 diabetic patients with coronary artery disease. *PPAR Res* doi: 10.1155/2008/548178.

Xin HB, Senbonmatsu T, Cheng DS, Wang YX, Copello JA, Ji GJ, et al. (2002) Oestrogen protects FKBP12.6 null mice from cardiac hypertrophy. *Nature*;416:334–8

Yano M, Matsumura T, Senokuchi T, Ishii N, Murata Y, Taketa K, Motoshima H, Taguchi T, Sonoda K, Kukidome D, et al. (2007) Statins activate peroxisome proliferator-activated receptor γ through extracellular signal-regulated kinase $\frac{1}{2}$ and p38 mitogen-activated protein kinase-dependent cyclooxygenase-2 expression in macrophages. *Circ Res* **100**:1442–1451.

Seminari

5 Dicembre 2008 Prof. Luca SANTI, Virologia e Biotecnologie Vegetali, Dipartimento di Biologia Università degli Studi di Roma "Tor Vergata" Facoltà di Scienze, Titolo: *Production of bio-farmaceuticals in plants.*

12 Dicembre 2008 Antonio UCCELLI, Università di Genova, Titolo: *Le cellule Mesenchimali Staminali per il trattamento delle malattie neurologiche.*

15 Dicembre 2008 Marco SALVETTI, Università "La Sapienza" di Roma, Titolo: *Interazioni geni - ambiente nella eziologia della SM: studi sui gemelli.*

9 Gennaio 2009 Riccardo TRONCONE, Università Federico II di Napoli Titolo: *La malattia celiaca*

13 Gennaio 2009 Francesco ZAJA, Università di Udine Titolo: *Porpora trombocitopenica autoimmune:nuovi orientamenti fisiopatologici e terapeutici.*

10 Febbraio 2009 Antonio MUSARO', Dipartimento di Istologia e Embriologia Medica,Università di Roma, La Sapienza, Titolo: *Non solo motoneuroni: il contributo del muscolo scheletrico alla patogenesi della sclerosi laterale amiotrofica.*

25 Febbraio 2009 Prof. Gaetano THIENE Professore Ordinario di Anatomia Patologica Università degli Studi di Padova, Titolo: *Linee guida per il riscontro diagnostico sulla morte improvvisa.*

26 Febbraio 2009 Prof. Mauro MACCARONE, Dipartimento di Scienze Biomediche Università di Teramo, Titolo: *Il metabolismo degli endocannabinoidi e la sua rilevanza terapeutica.*

18 Marzo 2009 Prof. Piero PUCCI, Dipartimento di Biochimica Clinica e Organica Università di Napoli Federico II, Titolo: *La proteo mica: un nuovo modo per guardare al mondo delle proteine.*

18 Marzo 2009 Prof. Giorgio STASSI, Dipartimento di Scienze Oncologiche e Chirurgiche Università di Palermo, Titolo: *Cellule staminali tumorali: implicazioni terapeutiche.*

9 Aprile 2009 Dott.ssa Sara MANTERO, Dipartimento di Bioingegneria, Politecnico di Milano, Titolo: *I bioreattori nella Medicina Rigenerativa: dalla ricerca alla realtà di una start-up.*

22 Aprile 2009 Davide SCHIFFER, Ph.D. M.D.Professore Emerito di Neurologia, Università di Torino Direttore Centro di Neuro-Bio-oncologia della Fondazione Policlinico di Monza Vercelli. Titolo: *Patologia dei tumori cerebrali recenti acquisizioni in tema di diagnosi e prognosi.*

30 Aprile 2009 Prof. Antonio SICA, Dip. Scienze Chimiche, Alimentari, Farmaceutiche e Farmacologiche (DISCAF) Università del Piemonte Orientale, Titolo: *Polarized inflammation in tumour development.*

6 Maggio 2009 Dr.ssa Barbara PALAZZO, Department of Chemistry University of Bologna, Titolo: *Integrated nanoparticle–biomolecule hybrid systems: design of stimuli-responsive nanomaterials for cancer diagnosis and therapy.*

12 Maggio Prof. Giuseppe POLI, Dipartimento di Scienze Biologiche e Cliniche, Università di Torino –Orbassano, Titolo: *Ipercolesterolemia e progressione di malattia in patologia umana*
Prof. Angelo POLETTI, Dipartimento di Endocrinologia, Fisiopatologia e Biologia Applicata, CEND, Università di Milano, Titolo: *Neurotossicità delle proteine "misfolded" nelle malattie del motoneurone.*

14 Maggio 2009 Prof. Stefano GUSTINCICH, SISSA di Trieste Basovizza, Trieste ITALY, Titolo: *Functional Genomics of Brain.*

14 Maggio 2009 dr. Andrea MUSACCHIO, European Institute of Oncology, Milan, Italy, Titolo: *The molecular bases of chromosome segregation.*

4 Giugno 2009 PROF. Silvia GIORDANO, Università di Torino e IRCC, Candiolo, Titolo: *Targeting met in cancer and metastasis: a matter of addiction and sensitivity.*

10 Giugno 2009 Milo FRATTINI, MSc Responsabile Laboratorio di Diagnostica Molecolare Istituto Cantonale di Patologia Locarno (Svizzera), Titolo: *Marcatori molecolari nel carcinoma colon rettale: dalla teoria alla pratica clinica.*

Pubblicazioni

Amoruso A, Bardelli C, Fresu LG, Palma A, Vidali M, Ferrero V, Ribichini F, Vassanelli C, Brunelleschi S. (2009) Enhanced PPAR- γ Expression in Monocyte/macrophages from Coronary Artery Disease Patients and possible Gender Differences. *J Pharmacol Exp Ther*.

C Bardelli, A Amoruso, LG Fresu, E Poletti, A Palma, HW Zeng, E Ongini and S Brunelleschi Anti-inflammatory effects of NCX 6550 (Nitropravastatin) in human monocyte/macrophages: cytokine release, PPAR γ expression and NF- κ B activation. *BJP* **Under review**