

Università del Piemonte Orientale “Amedeo Avogadro”

**I recettori PPAR γ ed il loro ruolo in
patologie coronariche e nel diabete.**

XIX ciclo del Dottorato in Medicina Molecolare

Tutor: Prof.ssa Sandra Brunelleschi

Dottorando: dott.ssa Angela Amoruso

Introduzione

Peroxisome proliferator activated receptor

I “peroxisome proliferator activated receptors” (PPARs) sono una famiglia di recettori ormonali nucleari implicati nella regolazione del metabolismo lipidico e glucidico; sono anche coinvolti nel controllo di fenomeni infiammatori che accompagnano l’evoluzione dell’aterosclerosi (1-7). Il nome attribuito a questi recettori deriva dalle osservazioni iniziali con farmaci, quali i fibrati, che portavano, nei roditori, alla proliferazione dei perossisomi, corpuscoli intracellulari adibiti all’ossidazione di vari xenobiotici e degli acidi grassi.

Sono stati identificati tre tipi di recettori (α , β/δ e γ), ognuno codificato da un gene specifico e con una differente distribuzione tissutale.

Il PPAR α è espresso nel fegato, nel rene, nel cuore e nel tessuto adiposo bruno. I primi studi negli anni '90 ne hanno evidenziato il ruolo fondamentale nella regolazione dei geni coinvolti nei processi metabolici cellulari come la β -ossidazione e la ω -ossidazione.

I più importanti ligandi naturali del PPAR α sono il leucotriene B4 e alcuni metaboliti delle prostaglandine come la dPGJ2, mentre i fibrati, soprattutto gemfibrozil e fenofibrato, sono dei ligandi sintetici (8).

Il recettore PPAR β/δ è ubiquitario, il suo ruolo è ancora poco chiaro, ma è noto che la sua espressione è fondamentale durante l’embriogenesi. I ligandi naturali per il PPAR β/δ sono gli eicosanoidi, e non esistono ancora ligandi sintetici.

PPAR γ è presente in tre diverse isoforme γ 1, γ 2 e γ 3 (lo stesso gene viene trascritto in tre differenti mRNA). PPAR γ 1 è espresso in tutte le cellule, PPAR γ 2 è implicato nella differenziazione degli adipociti, mentre non si conoscono ancora in dettaglio la localizzazione ed il ruolo del PPAR γ 3 (2-5). I metaboliti dell’acido arachidonico (ad es: la dPGJ2 e alcuni eicosanoidi) e le LDL ossidate costituiscono i principali ligandi naturali del PPAR γ , mentre una nuova classe di antidiabetici, i tiazolidindioni, e alcuni farmaci antinfiammatori non steroidei, agiscono da agonisti sintetici.

Una volta attivati, per l’interazione con i loro ligandi, i PPARs eterodimerizzano con un altro recettore nucleare, il recettore X dell’acido retinoico (RXR), e modulano la trascrizione genica attraverso il legame con uno specifico elemento di risposta (PPRE) localizzato nell’area di regolazione del gene, a monte della zona codificante (Fig. 1) (1-8).

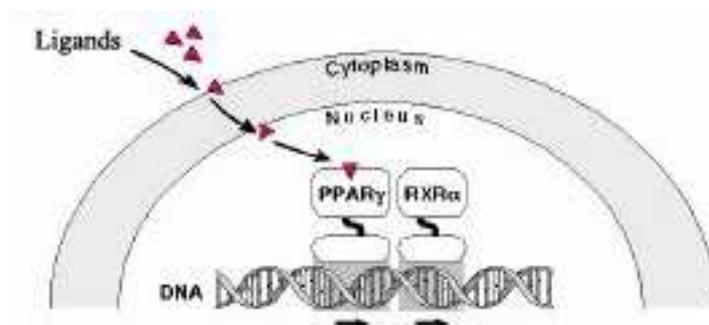


Figura 1. Regolazione dei “peroxisome proliferator activated receptors” (PPARs). Una volta attivati i recettori PPAR γ eterodimerizzano con il recettore X dell’acido retinoico (RXR), e si legano ad una specifica sequenza (PPRE) sul promotore del gene bersaglio, modulandone la trascrizione. (focus.hms.harvard.edu)

Peroxisome proliferator activated receptor- γ , metabolismo lipidico e glucidico, infiammazione e cancerogenesi

Basi molecolari.

L'attivazione di PPAR γ modula importanti processi fisiologici. Metabolismo glucidico e lipidico, differenziazione e proliferazione cellulare, tono vascolare, adesione leucocitaria, coagulazione, infiammazione ed immunità, sono alcuni tra i più importanti processi controllati da PPAR γ .

Da qui ne risulta che patologie come diabete, aterosclerosi, infiammazione, trombosi, fino alla cancerogenesi, possono essere modulate dagli attivatori di questo recettore.

Anche se le azioni svolte dai PPAR γ possono essere descritte separatamente, risulta più organico e più vicino alla realtà fisiologica considerarle ed analizzarle assieme. Ad esempio, il controllo del metabolismo glucidico è esplicato principalmente attraverso la modulazione di quello lipidico, mentre l'effetto antidiabetico complessivo dipende dalle azioni appena menzionate associate agli effetti su vasi sanguigni, sui processi infiammatori, coagulatori ed immunitari.

Da un punto di vista clinico generale, l'attivazione dei PPAR γ comporta una riduzione significativa dell'incidenza delle malattie cardiovascolari. Tale effetto è esplicato grazie al fatto che diversi fattori di rischio cardiovascolare (dislipidemia, ipertensione, ipercoagulabilità, iperinsulinemia ed un basso grado di infiammazione) sono migliorati dalla somministrazione degli attivatori dei PPARs. Siccome questi stessi sintomi sono spesso raggruppati nelle condizioni cliniche di insulino-resistenza (1,2), descrivere i processi associati a questa condizione permette di inquadrare gran parte delle azioni svolte dagli attivatori dei PPAR γ . Infatti, uno degli effetti più importanti conseguenti all'attivazione dei PPAR γ è quello antidiabetico. I tiazolidindioni, ligandi sintetici dei PPAR γ , erano già noti come agenti antidiabetici anni prima della clonazione dei PPARs. La successiva scoperta dei PPARs ha permesso di chiarirne il meccanismo d'azione (8, 25-29).

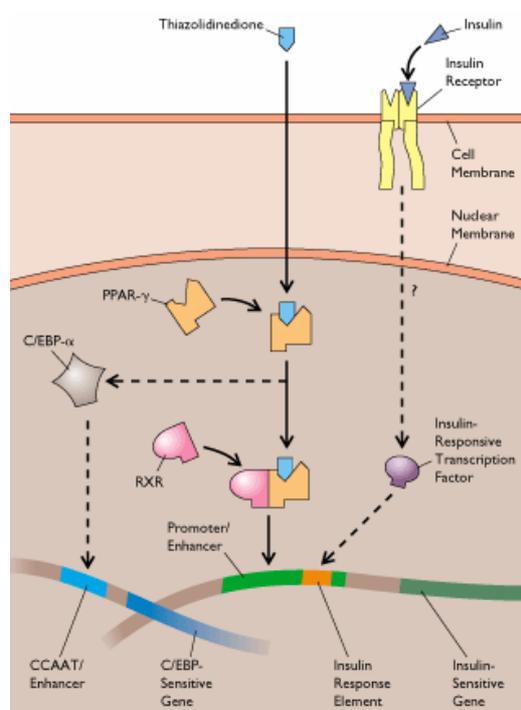


Figura 2: Meccanismo d'azione dei Tiazolidindioni (www.hosprract.com/issues; Goldfine).

La sperimentazione clinica con i tiazolidindioni è iniziata nel 1997 con l'immissione sul mercato americano del troglitazone, ritirato successivamente dal commercio nel 2000 per gravi episodi di tossicità epatica.

Dal 1999, in alcune nazioni, sono disponibili per uso clinico, il rosiglitazone ed il pioglitazone (30). Ciò ha permesso di iniziare alcuni trials clinici utili per la comprensione della reale efficacia di tali farmaci. In ragione della loro recente disponibilità, tali sperimentazioni mancano ancora di dati a lungo termine. D'altro canto, nonostante l'innumerabile massa di dati sinora prodotti, molti aspetti del loro meccanismo d'azione sono ancora poco conosciuti.

La somministrazione di tiazolidindionici migliora la sensibilità all'insulina, riduce la glicemia, migliora i livelli di emoglobina glicosilata, riduce la pressione sanguigna, i livelli circolanti di acidi grassi e di trigliceridi, aumenta l'attività fibrinolitica, migliora la funzione endoteliale, riduce i processi infiammatori e riduce l'ispessimento dell'intima-media a livello delle arterie carotidi (30,36). Tutto questo senza che geni direttamente coinvolti nel metabolismo glucidico siano direttamente attivati.

I PPAR γ sono prevalentemente espressi a livello intestinale e nel tessuto adiposo. Sono inoltre presenti nelle cellule della parete vascolare: monociti/macrofagi, endotelio, cellule muscolari lisce (4).

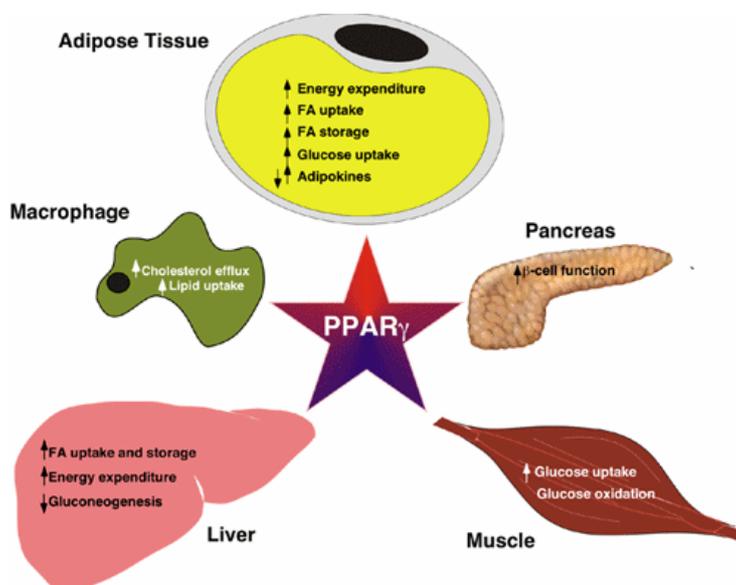


Figura 3: Organi bersaglio del PPAR γ (www.nurse.org/template; Auwerx et al.).

Il fatto che importanti organi bersaglio dell'azione insulinica, come fegato e tessuto muscolare scheletrico non presentino un contenuto abbondante di PPAR γ , suggerisce che gran parte dell'azione antidiabetica deve esplicarsi in altri organi e solo di riflesso agire su questi. Inoltre, il loro effetto a livello delle cellule della parete vascolare può in parte spiegare alcuni degli effetti metabolici osservati. Infatti, sebbene dal punto di vista quantitativo, fegato, tessuto muscolare scheletrico e tessuto adiposo, rappresentino i bersagli principali dell'azione dell'insulina, altri organi, come l'albero vascolare appunto, possono modulare qualitativamente tale azione (6,7,25).

Il riscontro, in condizioni di insulino-resistenza, di alterazioni vascolari quali ridotto utilizzo periferico di trigliceridi, ipertensione, ridotta capacità vasorilassante endoteliale, propensione all'aterosclerosi, conferma questa analisi (37).

Mentre gli attivatori del PPAR γ esplicano a livello del fegato gran parte dei loro effetti grazie alla trascrizione di geni connessi con il metabolismo ossidativo lipidico, l'attivazione del PPAR γ , in questa sede, modula solo indirettamente il metabolismo glucidico (28,38).

Analogo discorso è valido per il tessuto muscolare scheletrico. Esperimenti *in vitro* non hanno dimostrato un'azione diretta su geni coinvolti nel metabolismo glucidico. Infatti, solo in esperimenti *in vivo* e solo tardivamente si sono dimostrati effetti indiretti. In tali condizioni si è, infatti, riscontrato un aumento della captazione di glucosio nelle cellule muscolari ed un aumento del loro metabolismo (38-41).

Gran parte dell'effetto degli attivatori dei PPAR γ e di PPAR γ stesso si esplica a livello del tessuto adiposo. Essi inducono la trascrizione di geni in grado di indurre differenziazione degli adipociti (42), di aumentare l'assorbimento e l'accumulo dei lipidi circolanti, di inibire i processi di lipolisi. Tra i geni attivati si possono ricordare, l'acil-CoA-ossidasi (14), la fosfoenol-piruvato-carbossi-chinasi (PEPCK) (43), la lisofosfolipasi (LPL) (11) e la proteina di trasporto degli acidi grassi (FATP) (115). L'attivazione di tali geni comporta un aumento della captazione e un accumulo di trigliceridi a livello cellulare. Conseguenza invece dell'inibizione della lipolisi è la riduzione degli acidi grassi liberi circolanti. Dato il ruolo degli acidi grassi liberi nella genesi dei fenomeni di insulino-resistenza, risulta evidente il ruolo benefico che tale riduzione svolge (13,44).

Il tessuto adiposo è altresì una sede importante nella produzione del fattore di necrosi tumorale (TNF α) (45,46). Questa citochina è in grado di indurre sia *in vitro* che *in vivo* insulino-resistenza. L'attivazione del PPAR γ riduce la sintesi di TNF α e concorre in questo modo a migliorare la sensibilità insulinica (47).

Discorso analogo è valido per l'ormone "resistina", prodotto sempre dal tessuto adiposo e per la leptina, che modulano in senso negativo la sensibilità tissutale all'insulina (48,49).

Altro meccanismo recentemente dimostrato è l'effetto insulino-sensibilizzante svolto dagli aumentati livelli plasmatici di "adipocyte-related complement protein" (30), prodotto dal tessuto adiposo, ed indotto dagli attivatori del PPAR γ (50-52).

La modulazione del metabolismo glucidico ad opera dei tiazolidindioni avverrebbe quindi non per attivazione diretta di geni connessi con tale metabolismo, ma per azione indiretta: essi agirebbero sul tessuto adiposo modulandone alcune funzioni (metabolismo lipidico, livelli circolanti di lipidi, citochine ed altro) le quali a loro volta regolerebbero l'insulino-sensibilità a livello del fegato e del tessuto muscolare. L'assenza di effetto antidiabetico osservato in animali privi di tessuto adiposo confermerebbe questa ipotesi (53).

Il diabete aumenta di quasi 5 volte il rischio aterosclerotico (54) ed è opinione ormai consolidata che l'attivazione dei processi infiammatori sia coinvolta nella genesi del danno aterosclerotico (5). L'attivazione del PPAR γ è stata dimostrata essere in grado di inibire la sintesi di importanti citochine coinvolte in questo processo come l'IL-2, IL-6, IL-8, TNF α , proteina C reattiva, citochine chemiotattiche per i monociti e proteine importanti nei processi di invasione tissutale e nella rottura della placca aterosclerotica come le metalloproteinasi, ed in particolare la MMP-9 (34,55).

L'attivazione dei PPAR γ inibisce inoltre l'attività di altri fattori di trascrizione importanti nei processi infiammatori ed immunitari, come il sistema di NF-kB (Nuclear Factor-kB), di AP-1 (activator protein-1) e STAT (signal transducer and activator of transcription) (5,56,57).

Ricerche recenti hanno dimostrato la capacità di attivatori del PPAR γ di inibire l'espressione degli antigeni del complesso maggiore di istocompatibilità di classe II nelle cellule presenti nelle placche ateromasiche, condizionando così i processi immunitari in tale sede (58). Tutte queste azioni, sommate a quelle sul tessuto adiposo, sul fegato e sul tessuto muscolare scheletrico, sarebbero responsabili dell'effetto antidiabetico osservato.

Il meccanismo attraverso cui i tiazolidindioni abbassano la pressione arteriosa, non è ancora chiaro. Alcuni studi *in vitro* hanno dimostrato la capacità del rosiglitazone di ridurre la disfunzione endoteliale indotta dall'angiotensina II (3,59), ma il preciso meccanismo attraverso cui il farmaco esplica tale azione non è noto. Una possibile spiegazione potrebbe essere che l'aumentata attività della fosfatidil-inositolo 3-chinasi (PI-3K), osservata dopo somministrazione di tiazolidindioni, possa influenzare l'attività del recettore dell'angiotensina. Quest'ultima è, infatti, connessa funzionalmente con l'attività della PI-3K (60).

Alcune vie metaboliche connesse con la traduzione del segnale insulinico potrebbero inoltre essere coinvolte. Pur non essendo dimostrata un'azione diretta degli attivatori del PPAR γ sull'espressione genica di tali proteine, in alcuni sistemi cellulari il rosiglitazone aumenterebbe il trasporto intracellulare del glucosio, aumentando l'espressione del trasportatore GLUT4 (41) e attivando PI-3K, PDK-1 (chinasi fosfoinositolo-dipendente di tipo1), PKB/AKT (proteina chinasi B) e PKC-1 (proteina chinasi C) attraverso un aumento dell'attività di IRS-1, IRS-2 (substrati dei recettori insulinici) e dell'ubiquitina Cbl (61).

È stata altresì dimostrata la capacità del rosiglitazone di attivare la proteina chinasi cAMP-dipendente (PKA) (62). Va ribadito che molte di queste modulazioni sono conseguenza indiretta di altri processi. A causa del fatto che gran parte dell'effetto degli attivatori del PPAR γ si esplica attraverso la stimolazione della deposizione dei lipidi plasmatici a livello del tessuto adiposo, si osserva frequentemente un aumento di peso nei pazienti trattati (63,64). D'altro canto, poiché un aumento di peso riduce la sensibilità all'insulina, le sperimentazioni future a lungo termine dovranno chiarire il risultato finale dei tiazolidindioni nei confronti della sensibilità insulinica. Sperimentazioni a lungo termine dovranno inoltre escludere definitivamente un'eventuale tossicità epatica di questi farmaci, già individuata per il troglitazone.

Inoltre, la comparsa di edemi è tra gli effetti collaterali osservati con l'uso di tali farmaci, quindi va ponderato il loro uso in pazienti con scompenso cardiaco (63,64).

Infine è opportuno menzionare che la terapia con tiazolidindioni comporta frequentemente un'alterazione del quadro lipoproteico con aumento del colesterolo LDL e HDL. Tale effetto è stato osservato più frequentemente con il rosiglitazone che non con il pioglitazone (38,63,64).

Un ultimo importante aspetto della connessione tra PPAR e diabete, è che alcuni polimorfismi genetici dei PPARs o di cofattori possano essere in qualche modo connessi con la genesi del diabete mellito di tipo 2. Questa ipotesi, basata sul fatto che: alcuni polimorfismi sono stati inizialmente trovati associati a condizioni cliniche con differente sensibilità insulinica, che i tiazolidindioni esplicano attività antidiabetica, e che i geni connessi con la genesi del diabete di tipo 2 sono collocati nello stesso segmento cromosomico in cui stanno i geni per il recettore X dell'acido retinoico (cofattore con cui i PPARs eterodimerizzano prima di legarsi ai PPRE), non ha avuto per ora una adeguata conferma (65-67).

Esistono dei ligandi naturali di PPAR γ che esplicano importanti effetti sia fisiologici sia fisiopatologici. Tra questi, meritano menzione, la PGJ2 e soprattutto i componenti delle LDL ossidate, il 9- e il 13-HODE (acido idrossioctadecadienoico) (25). Questi ultimi svolgono una funzione chiave nella genesi delle cellule schiumose a livello delle placche ateromasiche. I macrofagi svolgono un ruolo rilevante nello sviluppo dell'aterosclerosi. Le lesioni aterosclerotiche contengono un elevato numero di cellule schiumose (*foam cells*), derivanti dai monociti circolanti che aderiscono all'endotelio attivato e migrano nella parete arteriosa. I monociti differenziati in macrofagi esprimono così i geni degli *scavenger receptor A*, così come altri recettori che mediano l'*uptake* delle ox-LDL. SR-A e CD36, espressi sulla superficie dei macrofagi, legano e internalizzano il colesterolo LDL. Mentre questi recettori non vengono down-regolati da alti livelli di colesterolo intracellulare, un massivo accumulo di

colesterolo esterificato nei macrofagi porta un differenziamento degli stessi in *foam cells* pro-aterogene. Si induce, quindi, differenziazione in senso adipocitico dei macrofagi ed un ulteriore aumento della captazione e accumulo di lipidi. I lipidi ossidati presenti attivano il PPAR γ con conseguente controllo della trascrizione genica. È da notare che tra i geni attivati ve ne sono alcuni che facilitano un'ulteriore entrata di lipoproteine ossidate, come ad esempio il recettore scavenger CD36 (16). Questo suggerisce un ruolo pro-aterogeno del PPAR γ ma si è visto che il recettore promuove differenti effetti in aterosclerosi. Infatti, l'effetto dovuto all'incremento dell'espressione di CD36 causato dall'attivazione di PPAR γ , è contrastato dalla riduzione dell'espressione di SR-A e dall'aumento dell'attività di altri recettori nucleari, quali gli LXR che sono coinvolti nel trasporto inverso del colesterolo attraverso ABCA1. Ciò dimostra anche un'azione anti-aterogena del PPAR γ .

Inoltre, la capacità di PPAR γ di indurre differenziazione in alcuni sistemi cellulari, così come la loro capacità di influenzare sopravvivenza cellulare ed apoptosi, rendono gli attivatori del PPAR γ dei potenziali farmaci antitumorali (57,68).

È stato dimostrato che i tiazolidindioni sono in grado di indurre differenziazione cellulare e riduzione della crescita di alcuni tumori, specialmente quelli del colon (69,70). Ulteriori studi sono necessari per appurarne appieno l'efficacia.

In questi 10 anni di studio dei PPARs è stato ottenuto un numero enorme di dati che talvolta sono risultati contrastanti. È fuori discussione in ogni modo che la scoperta dei PPARs ha rappresentato e rappresenta tuttora una delle scoperte più interessanti del mondo della ricerca degli ultimi anni.

Peroxisome proliferator activated receptor- γ : studi clinici.

L'uso clinico dei tiazolidindioni è iniziata nel 1997 con l'immissione sul mercato americano del troglitazone, ritirato dal commercio nel 2000 per gravi episodi di tossicità epatica. Negli ultimi anni sono stati pubblicati i risultati di quattro studi clinici pilota con il rosiglitazone ed il pioglitazone (63,64,71,72), che dal 1999 sono disponibili per le terapie.

Raskin et al. (71) hanno valutato l'efficacia e la sicurezza del trattamento con rosiglitazone in pazienti diabetici di tipo 2 non adeguatamente controllati dalla sola terapia insulinica. Sono stati studiati 319 pazienti diabetici trattati per 26 settimane con placebo o con rosiglitazone 4 o 8 mg/die, in associazione al trattamento insulinico. Il trattamento con rosiglitazone migliorava significativamente il controllo glicemico, riduceva i valori di HbA1C di 1.2%, nonostante una riduzione media del 12% della dose di insulina somministrata. I valori del colesterolo HDL e il rapporto LDL/HDL non sono stati modificati.

Khan et al. (64) hanno valutato l'effetto di pioglitazone o rosiglitazone sul controllo glicemico, sui livelli di lipidi circolanti e sul peso, in pazienti precedentemente trattati con troglitazone. Sono stati studiati 186 pazienti trattati per 4 mesi con pioglitazone o rosiglitazone. Non si sono dimostrate differenze significative tra il controllo glicemico, l'HbA1C, il peso corporeo ottenuto con pioglitazone/rosiglitazone rispetto a quello ottenuto precedentemente con troglitazone. Solo il profilo lipidico è stato migliorato dal trattamento con pioglitazone e il colesterolo plasmatico totale è risultato ridotto del 20%.

Boyle et al. (63) hanno valutato le possibili differenze tra il trattamento con rosiglitazone rispetto a quello con pioglitazone, sul controllo glicemico e sui valori di lipidi circolanti, in pazienti diabetici di tipo 2. Sono stati analizzati 605 pazienti in terapia per 6 mesi. Il controllo glicemico è risultato identico con i due farmaci. Il pioglitazone ha dimostrato un profilo terapeutico migliore, essendo in grado di diminuire i trigliceridi e il colesterolo.

Gomez-Perez et al. (72) hanno studiato l'efficacia e la sicurezza del trattamento con rosiglitazone in combinazione con metformina 2.5 mg/die in pazienti diabetici di tipo 2: 116 pazienti sono stati trattati con rosiglitazone 2 o 4 mg/die o placebo più metformina e valutati dopo 26 settimane di terapia. Il rosiglitazone 2 e 4 mg/die riduceva i valori di HbA1C dello 0.7 e 1.2%, rispettivamente. I valori di peptide C così come quelli dell'insulina plasmatica erano diminuiti. I valori di colesterolo LDL e HDL erano aumentati mentre il rapporto LDL/HDL era rimasto inalterato.

È evidente che ulteriori studi sono necessari per trarre delle conclusioni definitive sul ruolo degli agonisti PPAR γ nella prevenzione e terapia delle malattie cardiovascolari. Sarà necessario seguire con la dovuta attenzione le modificazioni dei livelli di lipoproteine plasmatiche indotte da questi farmaci, effetti che potrebbero controbilanciare, in alcuni casi, quelli positivi sulla glicemia.

Scopo della Ricerca

In questo primo anno il progetto si proponeva di valutare l'espressione di PPAR γ e la sua modulazione in monociti e macrofagi di donatori sani allo scopo di identificare PPAR γ come un possibile ulteriore marker di rischio cardiovascolare, per poi continuare negli anni successivi la valutazione dell'espressione di PPAR γ in monocito/macrofagi di pazienti, fumatori e non, affetti da coronaropatia e/o diabete.

Materiali e metodi

U937: linea tumorale umana con caratteristiche monocitiche. Per la coltura di queste cellule è stato utilizzato RPMI-1640 (Sigma) completo contenente 10% FCS.

J774: linea tumorale murina con caratteristiche macrofagiche. Per la coltura di queste cellule è stato utilizzato DMEM (Dulbecco's Minimum Essential Medium, Sigma) completo contenente 10% FCS.

Isolamento monociti: i monociti (M) sono stati isolati da sangue fresco di volontari sani mediante procedura standard (sedimentazione con destrano, centrifugazione su gradiente di Ficoll-Paque) e purificati per adesione (2h, 37°C, 5% CO₂); i macrofagi (MDM: monocyte-derived macrophages) sono stati preparati dai M coltivati per 8-10 gg in RPMI-1640 completo arricchito con FCS 20% e cambiato ogni 2-3 gg.

Immunoblotting: le cellule, incubate con 15d-PGJ2 (5 μ M) e con ciglitazone (50 μ M) per 6 ore in RPMI-1640, sono state lisate con un buffer di lisi contenente inibitori delle proteasi. Stesse quantità di proteina totale, determinata utilizzando il dosaggio proteico Bradford, dopo corsa elettroforetica e blotting, sono state incubate con l'anticorpo primario monoclonale anti-PPAR γ (Santa Cruz Biotechnology), che riconosce il peptide carbossi-terminale del PPAR γ umano (diluizione 1:500, overnight a 4°C). Il secondario anti-mouse è stato diluito 1:5000, e mantenuto per 1h a temperatura ambiente. Gli immunocomplessi sono stati evidenziati con un metodo di intensificazione della chemiluminescenza (ECL, Perkin Elmer) seguito da due distinti metodi di lettura densitometrica: con autoradiografia e programma di analisi dell'immagine (NIH Image 1.52) oppure tramite la lettura al Versadoc (BioRad), strumento in grado di valutare la chemiluminescenza direttamente dalla membrana di nitrocellulosa. Le bande relative a PPAR γ e β -actina sono state quantificate e l'espressione di PPAR γ è stata valutata come rapporto PPAR γ / β -actina per correggere la quantità di proteina cellulare.

MTT: Al termine dell'esperimento il mezzo di coltura è stato rimosso e le cellule sono state incubate 3 ore a 37°C in medium RPMI 1640 privo di rosso fenolo contenente MTT (3-[4,5-dimetiltiazolo-2-il]-2,5-difeniltetrazolio bromuro, Sigma, 1 mg/mL). Il test si basa sull'attività delle deidrogenasi mitocondriali che, nelle cellule vitali sono in grado di idrolizzare il sale di tetrazolio a cristalli di formazano viola insolubili in mezzi acquosi. Per solubilizzare tali cristalli è stato utilizzato isopropanolo e l'intensità della colorazione è stata letta allo spettrofotometro alle lunghezze d'onda: 570-630-690 nm.

Esperimenti preliminari

Sono stati condotti, finora, esperimenti preliminari su linee cellulari (J774 e U937), su monociti e MDM isolati da sacche di sangue periferico fornite dai laboratori del Servizio Immuno-Trasfusionale (S.I.T.) dell'Ospedale SS Trinità di Borgomanero, nonché su M e MDM isolati da sangue fresco di donatori sani (fumatori e non), reclutati in ambito universitario.

Si è inizialmente valutato, tramite test MTT, la concentrazione di 15d-PGJ2 e ciglitazone in grado di incrementare l'espressione di PPAR γ senza alterare la vitalità cellulare. Sulle U937 è stato quindi effettuato un time-course incubando le cellule in terreno al 5% di FCS con la 15d-PGJ2 in concentrazione 5 μ M.

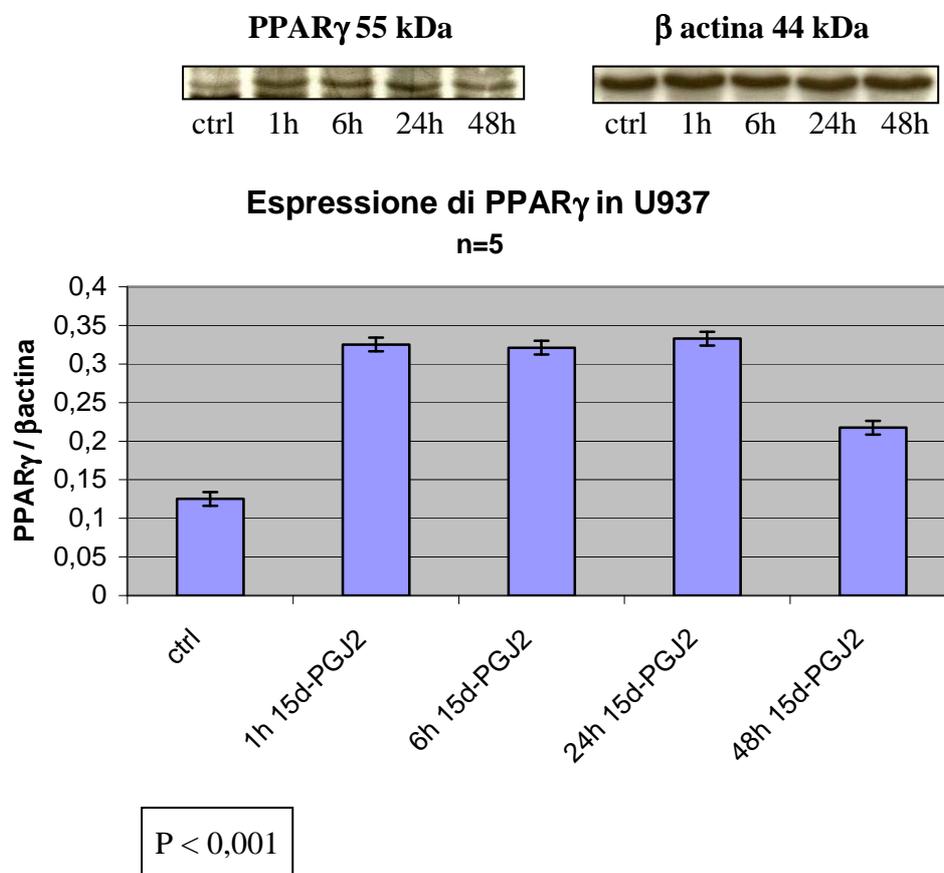


Figura 4: espressione della proteina PPAR γ in cellule U937, fatte differenziare a macrofagi incubandole con PMA (Forbolo 12-miristato, 13-acetato) (10 nM) per 12 ore e poi incubate per tempi diversi con la 15d-PGJ2. Il valore di espressione della proteina è normalizzato con il valore di espressione di una proteina di riferimento, la β -actina.

In presenza di 15d-PGJ2, l'espressione di PPAR γ aumenta in modo non tempo-dipendente (figura 4): già dopo la prima ora di incubazione si ha un aumento dell'espressione della proteina che si mantiene più o meno costante fino alle 24 ore successive, ma che diminuisce

alle 48h. Questo potrebbe dipendere da una diminuita disponibilità dei recettori PPAR γ attivabili o da una diminuita disponibilità dei recettori RXR.

Si è quindi passati a valutare l'espressione del recettore PPAR γ in cellule umane durante il differenziamento da monociti a macrofagi. Le cellule sono state incubate in RPMI 1640 arricchite di FCS al 20%, dal primo giorno dopo l'isolamento per 8-10 giorni, rinnovandolo ogni 2-3 giorni.

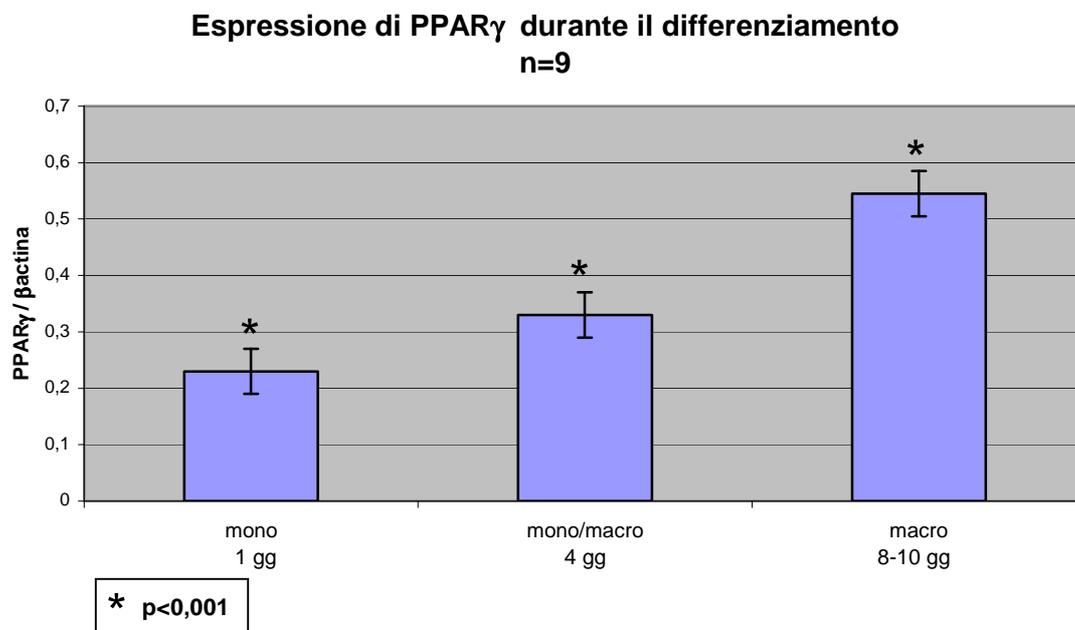


Figura 5: Effetto del differenziamento dei monociti a macrofagi, sull'espressione di PPAR γ valutato come rapporto fra il valore dell'espressione del recettore rispetto al valore di espressione di una proteina di riferimento, la β -actina.

Mentre si assiste ad un cambiamento morfologico delle cellule che acquisiscono mano a mano la conformazione di macrofagi, si è parallelamente osservato un incremento dell'espressione di PPAR γ (figura5) di circa il 30% nei monociti/macrofagi al quarto giorno di differenziamento, rispetto ai monociti del primo giorno dopo l'isolamento, e dell'80% nei macrofagi pienamente differenziati all'ottavo giorno, rispetto a quelli del quarto.

L'espressione basale di PPAR γ è minima nei monociti (rapporto PPAR γ / β actina = 0.23 \pm 0.04; n = 9), già importante dopo 4 gg di differenziamento (0.33 \pm 0.03; n = 9) e assai rilevante negli MDM (0.55 \pm 0.04; n = 9; p < 0.01 vs M e M dopo 4 gg di differenziamento).

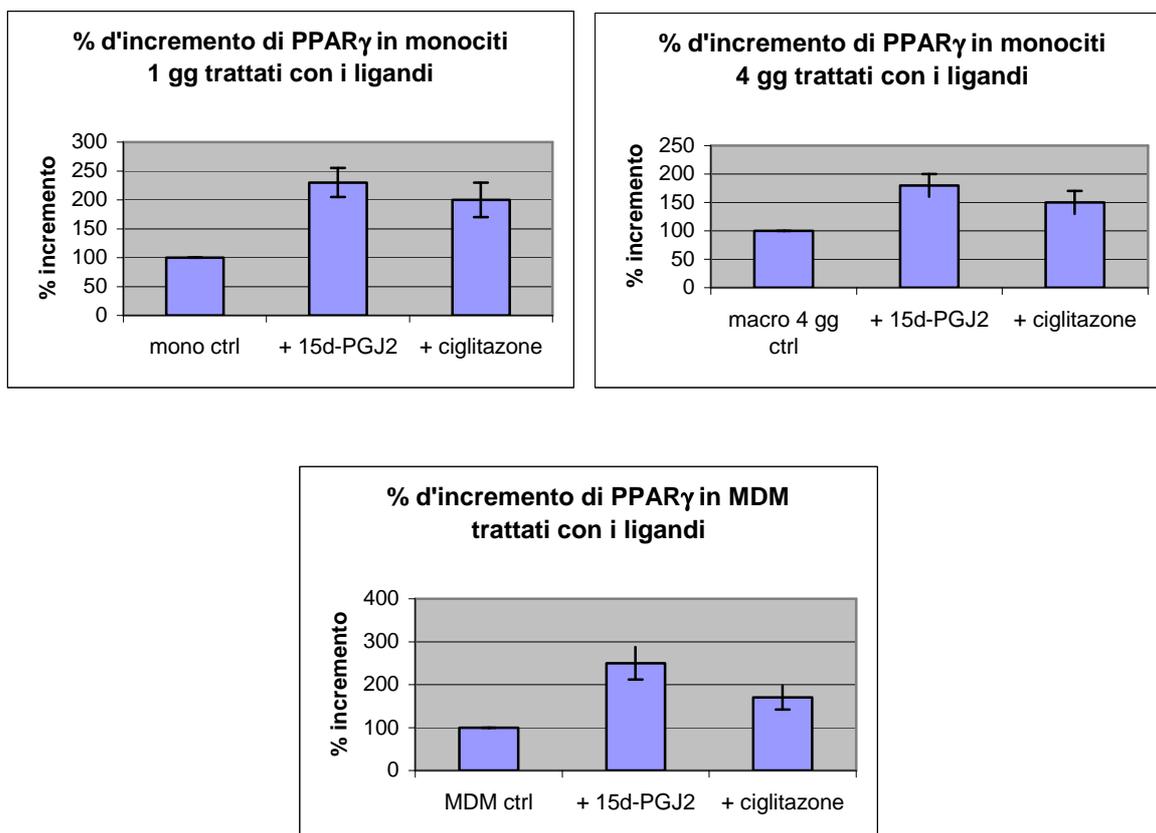


Figura 6: Effetto della 15d-PGJ2 e del ciglitazone sull'incremento dell'espressione di PPAR γ .

Come dimostrato in figura 6, sia nei monociti che negli MDM, l'espressione di PPAR γ è significativamente aumentata quando le cellule sono cimentate con 15d-PGJ₂ (5 μ M, 6h) o con ciglitazone (50 μ M, 6h).

Risultati preliminari (n=3) indicano che l'espressione di PPAR γ , sia basale che indotta, è aumentata di 2.5 – 3 volte nei fumatori sani, rispetto ai non fumatori.

Quindi si può affermare che il recettore PPAR γ ha un'espressione basale nei monociti che aumenta durante il differenziamento a macrofagi, espressione che viene modulata positivamente dalla presenza dei ligandi naturali e sintetici. Sarà, quindi, sicuramente interessante andare a valutare l'espressione del recettore PPAR γ in pazienti con coronaropatie, fumatori e non, e osservarne differenze eventuali rispetto ai donatori sani.

BIBLIOGRAFIA

1. Elangbam CS, Tyler RD, Lightfoot RM. Peroxisome proliferator-activated receptors in atherosclerosis and inflammation *Toxicol Pathol* 2001; 29: 224-31.
2. Jones AB. Peroxisome proliferator-activated receptor (PPAR) modulators: diabetes and beyond. *Med Res Rev* 2001; 21: 540-52.
3. Diep QN, El Mabrouk M, Cohn JS, et al. Structure, endothelial function, cell growth, and inflammation in blood vessels of angiotensin II-infused rats: role of peroxisome proliferator activated receptor-gamma. *Circulation* 2002; 105: 2296-302.
4. Berger J, Moller DE. The mechanisms of action of PPARs. *Annu Rev Med* 2002; 53: 409-35.
5. Delerive P, Fruchart JC, Staels B. Peroxisome proliferator-activated receptors in inflammation control. *J Endocrinol* 2001; 169: 453-9.
6. Plutzky J. Peroxisome proliferator-activated receptors in endothelial cell biology. *Curr Opin Lipidol* 2001; 12: 511-8.
7. Marx N, Libby P, Plutzky J. Peroxisome proliferator-activated receptors (PPARs) and their role in the vessel wall: possible mediators of cardiovascular risk? *J Cardiovasc Risk* 2001; 8: 203-10.
8. Qi C, Zhu Y, Reddy JK. Peroxisome proliferator-activated receptors, coactivators, and downstream targets. *Cell Biochem Biophys* 2000; 32: 187-204.
9. Bocher V, Pineda-Torra I, Fruchart JC, Staels B. PPARs: transcription factors controlling lipid and lipoprotein metabolism. *Ann NY Acad Sci* 2002; 967: 7-18.
10. Staels B, Dallongeville J, Auwerx J, Schoonjans K, Leitersdorf E, Fruchart JC. Mechanism of action of fibrates on lipid and lipoprotein metabolism. *Circulation* 1998; 98: 2088-93.
11. Schoonjans K, Peinado-Onsurbe J, Lefebvre AM, et al. PPARalpha and PPARgamma activators direct a distinct tissue-specific transcriptional response via a PPARE in the lipoprotein lipase gene. *EMBO J* 1996; 15: 5336-48.
12. Chinetti G, Gbaguidi FG, Griglio S, et al. CLA-1/SR-BI is expressed in atherosclerotic lesion macrophages and regulated by activators of peroxisome proliferator-activated receptors. *Circulation* 2000; 101: 2411-7.
13. Chinetti G, Lestavel S, Bocher V, et al. PPAR-alpha and PPAR-gamma activators induce cholesterol removal from human macrophage foam cells through stimulation of the ABCA1 pathway. *Nat Med* 2001; 7: 53-8.
14. Schoonjans K, Watanabe M, Suzuki H, et al. Induction of the acyl-coenzyme A synthetase gene by fibrates and fatty acids is mediated by a peroxisome proliferator response element in the C promoter. *J Biol Chem* 1995; 270: 19269-76.
15. Martin G, Schoonjans K, Lefebvre AM, Staels B, Auwerx J. Coordinate regulation of the expression of the fatty acid transport protein and acyl-CoA synthetase genes by PPARalpha and PPARgamma activators. *J Biol Chem* 1997; 272: 28210-7.
16. Sfeir Z, Ibrahimi A, Amri E, Grimaldi P, Abumrad N. Regulation of FAT/CD36 gene expression: further evidence in support of a role of the protein in fatty acid binding/transport. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids* 1997; 57: 17-21.
17. Delerive P, Gervois P, Fruchart JC, Staels B. Induction of IkappaBalpha expression as a mechanism contributing to the anti-inflammatory activities of peroxisome proliferator activated receptor-alpha activators. *J Biol Chem* 2000; 275: 36703-7.

18. Manninen V, Elo MO, Frick MH, et al. Lipid alterations and the decline in incidence of coronary heart disease risk in the Helsinki Heart Study. *JAMA* 1988; 260: 641-51.
19. Ruotolo G, Ericsson CG, Tettamanti C, et al. Treatment effects on serum lipoprotein lipids, apolipoproteins and lowdensity lipoprotein particle size and relationships of lipoprotein variables to progression of coronary artery disease in the Bezafibrate Coronary Atherosclerosis Intervention Trial (BECAIT). *J Am Coll Cardiol* 1998; 32: 1648-56.
20. Frick MH, Syvanne M, Nieminen MS, et al. Prevention of the angiographic progression of coronary and vein-graft atherosclerosis by gemfibrozil after coronary bypass surgery in men with low levels of HDL cholesterol. Lipid Coronary Angiography Trial (LOCAT) Study Group. *Circulation* 1997; 96: 2137-43.
21. Behar S, Graff E, Reicher-Reiss H, et al. Low total cholesterol is associated with high total mortality in patients with coronary heart disease. The Bezafibrate Infarction Prevention (BIP) Study Group. *Eur Heart J* 1997; 18: 52-9.
22. Downs JR, Clearfield M, Weis S, et al. Primary prevention of acute coronary events with lovastatin in men and women with average cholesterol levels: results of AFCAPS/Tex-CAPS. Air Force/Texas Coronary Atherosclerosis Prevention Study. *JAMA* 1998; 279: 1615-22.
23. Robins SJ, Collins D, Wittes JT, et al. Relation of gemfibrozil treatment and lipid levels with major coronary events: VA-HIT, a randomized controlled trial. *JAMA* 2001; 285: 1585-91.
24. Effect of fenofibrate on progression of coronary-artery disease in type 2 diabetes: the Diabetes Atherosclerosis Intervention Study, a randomised study. *Lancet* 2001; 357: 905-10.
25. Chinetti G, Fruchart JC, Staels B. Peroxisome proliferator-activated receptors (PPARs): nuclear receptors with functions in the vascular wall. *Z Kardiol* 2001; 90 (Suppl 3): 125-32.
26. Cheng-Lai A, Levine A. Rosiglitazone: an agent from the thiazolidinedione class for the treatment of type 2 diabetes. *Heart Dis* 2000; 2: 326-33.
27. Pittas AG, Greenberg AS. Thiazolidinediones in the treatment of type 2 diabetes. *Expert Opin Pharmacother* 2002; 3: 529-40.
28. Martens FM, Visseren FL, Lemay J, de Koning EJ, Rabelink TJ. Metabolic and additional vascular effects of thiazolidinediones. *Drugs* 2002; 62: 1463-80.
29. Wagstaff AJ, Goa KL. Rosiglitazone: a review of its use in the management of type 2 diabetes mellitus. *Drugs* 2002; 62: 1805-37.
30. Parulkar AA, Pendergrass ML, Granda-Ayala R, Lee TR, Fonseca VA. Nonhypoglycemic effects of thiazolidinediones. *Ann Intern Med* 2001; 134: 61-71.
31. Yue TL, Chen J, Bao W, et al. In vivo myocardial protection from ischemia/reperfusion injury by the peroxisome proliferator-activated receptor-gamma agonist rosiglitazone. *Circulation* 2001; 104: 2588-94.
32. Werner AL, Travaglini MT. A review of rosiglitazone in type 2 diabetes mellitus. *Pharmacotherapy* 2001; 21: 1082-99.
33. Haffner SM, Greenberg AS, Weston WM, Chen H, Williams K, Freed MI. Effect of rosiglitazone treatment on nontraditional markers of cardiovascular disease in patients with type 2 diabetes mellitus. *Circulation* 2002; 106: 679-84.
34. Collins AR, Meehan WP, Kintscher U, et al. Troglitazone inhibits formation of early atherosclerotic lesions in diabetic and nondiabetic low-density lipoprotein receptor-deficient mice. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2001; 21: 365-71.

35. Li AC, Brown KK, Silvestre MJ, Willson TM, Palinski W, Glass CK. Peroxisome proliferator-activated receptor gamma ligands inhibit development of atherosclerosis in LDL receptor-deficient mice. *J Clin Invest* 2000; 106: 523-31.
36. Chen Z, Ishibashi S, Perrey S, et al. Troglitazone inhibits atherosclerosis in apolipoprotein E-knockout mice: pleiotropic effects on CD36 expression and HDL. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2001; 21: 372-7.
37. Tomas E, Lin YS, Dagher Z, et al. Hyperglycemia and insulin resistance: possible mechanisms. *Ann NY Acad Sci* 2002; 967: 43-51.
38. Mayerson AB, Hundal RS, Dufour S, et al. The effects of rosiglitazone on insulin sensitivity, lipolysis, and hepatic and skeletal muscle triglyceride content in patients with type 2 diabetes. *Diabetes* 2002; 51: 797-802.
39. Jucker BM, Schaeffer TR, Haimbach RE, et al. Normalization of skeletal muscle glycogen synthesis and glycolysis in rosiglitazone-treated Zucker fatty rats: an in vivo nuclear magnetic resonance study. *Diabetes* 2002; 51: 2066-73.
40. Zierath JR, Ryder JW, Doebber T, et al. Role of skeletal muscle in thiazolidinedione insulin sensitizer (PPARgamma agonist) action. *Endocrinology* 1998; 139: 5034-41.
41. Kramer D, Shapiro R, Adler A, Bush E, Rondinone CM. Insulin-sensitizing effect of rosiglitazone (BRL-49653) by regulation of glucose transporters in muscle and fat of Zucker rats. *Metabolism* 2001; 50: 1294-300.
42. Tontonoz P, Hu E, Spiegelman BM. Stimulation of adipogenesis in fibroblasts by PPAR gamma 2, a lipid-activated transcription factor. *Cell* 1994; 79: 1147-56.
43. Tontonoz P, Hu E, Devine J, Beale EG, Spiegelman BM. PPAR gamma 2 regulates adipose expression of the phosphoenolpyruvate carboxykinase gene. *Mol Cell Biol* 1995; 15: 351-7.
44. Oakes ND, Thalen PG, Jacinto SM, Ljung B. Thiazolidinediones increase plasma-adipose tissue FFA exchange capacity and enhance insulin-mediated control of systemic FFA availability. *Diabetes* 2001; 50: 1158-65.
45. Hotamisligil GS, Shargill NS, Spiegelman BM. Adipose expression of tumor necrosis factor-alpha: direct role in obesity-linked insulin resistance. *Science* 1993; 259: 87-91.
46. Hotamisligil GS, Murray DL, Choy LN, Spiegelman BM. Tumor necrosis factor alpha inhibits signaling from the insulin receptor. *Proc Natl Acad Sci USA* 1994; 91: 4854-8.
47. Miles PD, Romeo OM, Higo K, Cohen A, Rafaat K, Olefsky JM. TNF-alpha-induced insulin resistance in vivo and its prevention by troglitazone. *Diabetes* 1997; 46: 1678-83.
48. Steppan CM, Bailey ST, Bhat S, et al. The hormone resistin links obesity to diabetes. *Nature* 2001; 409: 307-12.
49. Kallen CB, Lazar MA. Antidiabetic thiazolidinediones inhibit leptin (ob) gene expression in 3T3-L1 adipocytes. *Proc Natl Acad Sci USA* 1996; 93: 5793-6.
50. Fruebis J, Tsao TS, Javorschi S, et al. Proteolytic cleavage product of 30-kDa adipocyte complement-related protein increases fatty acid oxidation in muscle and causes weight loss in mice. *Proc Natl Acad Sci USA* 2001; 98: 2005-10.
51. Berg AH, Combs TP, Du X, Brownlee M, Scherer PE. The adipocyte-secreted protein Acrp30 enhances hepatic insulin action. *Nat Med* 2001; 7: 947-53.
52. Combs TP, Wagner JA, Berger J, et al. Induction of adipocyte complement-related protein of 30 kilodaltons by PPARgamma agonists: a potential mechanism of insulin sensitization. *Endocrinology* 2002; 143: 998-1007.

53. Chao L, Marcus-Samuels B, Mason MM, et al. Adipose tissue is required for the antidiabetic, but not for the hypolipidemic, effect of thiazolidinediones. *J Clin Invest* 2000; 106: 1221-8.
54. Muller-Wieland D, Knebel B, Avci H, et al. Insulin-regulated transcription factors: molecular link between insulin resistance and cardiovascular risk factors. *Int J Obes Relat Metab Disord* 2001; 25 (Suppl 1): S35-S37.
55. Jiang C, Ting AT, Seed B. PPAR-gamma agonists inhibit production of monocyte inflammatory cytokines. *Nature* 1998; 391: 82-6.
56. Pasceri V, Wu HD, Willerson JT, Yeh ET. Modulation of vascular inflammation in vitro and in vivo by peroxisome proliferator-activated receptor-gamma activators. *Circulation* 2000; 101: 235-8.
57. Ricote M, Li AC, Willson TM, Kelly CJ, Glass CK. The peroxisome proliferator activated receptor-gamma is a negative regulator of macrophage activation. *Nature* 1998; 391: 79-82.
58. Kwak BR, Myit S, Mulhaupt F, et al. PPARgamma but not PPARalpha ligands are potent repressors of major histocompatibility complex class II induction in atheroma-associated cells. *Circ Res* 2002; 90: 356-62.
59. Ogihara T, Rakugi H, Ikegami H, Mikami H, Masuo K. Enhancement of insulin sensitivity by troglitazone lowers blood pressure in diabetic hypertensives. *Am J Hypertens* 1995; 8: 316-20.
60. Velloso LA, Folli F, Sun XJ, White MF, Saad MJ, Kahn CR. Cross-talk between the insulin and angiotensin signaling systems. *Proc Natl Acad Sci USA* 1996; 93: 12490-5.
61. Standaert ML, Kanoh Y, Sajan MP, Bandyopadhyay G, Farese RV. Cbl, IRS-1, and IRS-2 mediate effects of rosiglitazone on PI3K, PKC-lambda, and glucose transport in 3T3/L1 adipocytes. *Endocrinology* 2002; 143: 1705-16.
62. Fryer LG, Parbu-Patel A, Carling D. The anti-diabetic drugs rosiglitazone and metformin stimulate AMP-activated protein kinase through distinct signaling pathways. *J Biol Chem* 2002; 277: 25226-32.
63. Boyle PJ, King AB, Olansky L, et al. Effects of pioglitazone and rosiglitazone on blood lipid levels and glycemic control in patients with type 2 diabetes mellitus: a retrospective review of randomly selected medical records. *Clin Ther* 2002; 24: 378-96.
64. Khan MA, St Peter JV, Xue JL. A prospective, randomized comparison of the metabolic effects of pioglitazone or rosiglitazone in patients with type 2 diabetes who were previously treated with troglitazone. *Diabetes Care* 2002; 25: 708-11.
65. Deeb SS, Fajas L, Nemoto M, et al. A Pro12Ala substitution in PPARgamma2 associated with decreased receptor activity, lower body mass index and improved insulin sensitivity. *Nat Genet* 1998; 20: 284-7.
66. Wang H, Chu W, Hemphill C, Hasstedt SJ, Elbein SC. Mutation screening and association of human retinoid X receptor gamma variation with lipid levels in familial type 2 diabetes. *Mol Genet Metab* 2002; 76: 14-22.
67. Sramkova D, Kunesova M, Hainer V, Hill M, Vcelak J, Bendlova B. Is a Pro12Ala polymorphism of the PPARgamma2 gene related to obesity and type 2 diabetes mellitus in the Czech population? *Ann NY Acad Sci* 2002; 967: 265-73.
68. Chinetti G, Griglio S, Antonucci M, et al. Activation of proliferator-activated receptors alpha and gamma induces apoptosis of human monocyte-derived macrophages. *J Biol Chem* 1998; 273: 25573-80.
69. Demetri GD, Fletcher CD, Mueller E, et al. Induction of solid tumor differentiation by the peroxisome proliferator-activated receptor-gamma ligand troglitazone in patients with liposarcoma. *Proc Natl Acad Sci USA* 1999; 96: 3951-6.

70. Sarraf P, Mueller E, Jones D, et al. Differentiation and reversal of malignant changes in colon cancer through PPARgamma. *Nat Med* 1998; 4: 1046-52.
71. Raskin P, Rendell M, Riddle MC, Dole JF, Freed MI, Rosenstock J, the Rosiglitazone Clinical Trials Study Group. A randomized trial of rosiglitazone therapy in patients with inadequately controlled insulin-treated type 2 diabetes. *Diabetes Care* 2001; 24: 1226-32.
72. Gomez-Perez FJ, Fanghanel-Salmon G, Antonio Barbosa J, et al. Efficacy and safety of rosiglitazone plus metformin in Mexicans with type 2 diabetes. *Diabetes Metab Res Rev* 2002; 18: 127-34.
73. Guan HP, Li Y, Jensen MV, Newgard CB, Stepan CM, Lazar MA. A futile metabolic cycle activated in adipocytes by antidiabetic agents. *Nat Med* 2002; 8: 1122-8.