



UNIVERSITA' DEGLI STUDI DI PADOVA

Sede Amministrativa: Università degli Studi di Padova

Dipartimento di Farmacologia ed Anestesiologia "Egidio Meneghetti"

DOTTORATO DI RICERCA IN : Farmacologia e Tossicologia, Terapia rianimativa e intensiva
CICLO XX

EFFETTI VASCOLARI DEGLI ESTROGENI: IMPORTANZA DELLA SELETTIVITÀ RECETTORIALE E DELLA DURATA DELLA DEPRIVAZIONE ORMONALE

Coordinatore : Ch.ma Prof.ssa Rosa Maria Gaion

Supervisore : Ch.ma Prof.ssa Rosa Maria Gaion

Cotutore : Ch.mo Dott. Andrea Cignarella

Dottorando : Paola Sanvito

DATA CONSEGNA TESI
31 gennaio 2008

INDICE

I. RIASSUNTO.....	5
<i>Testo inglese</i>	7
II. INTRODUZIONE	10
i. I recettori degli estrogeni	10
ii. Meccanismi d'azione degli estrogeni	12
iii. Fonti e sintesi degli estrogeni.....	14
iv. Ruoli fisiologici degli estrogeni.....	16
<i>Apparato riproduttivo maschile e femminile</i>	17
<i>Tessuto osseo.....</i>	17
<i>Sistema nervoso centrale</i>	17
v. Effetti cardiovascolari degli estrogeni.....	17
<i>Effetti degli estrogeni sulle lipoproteine plasmatiche</i>	18
<i>Effetti antiossidanti degli estrogeni.....</i>	19
<i>Effetti degli estrogeni sulla coagulazione e sulla fibrinolisi.....</i>	19
<i>Effetti degli estrogeni sul cuore</i>	20
<i>Effetti degli estrogeni sui vasi.....</i>	20
vi. Estrogeni e modulazione della NO sintasi endoteliale.....	27
<i>Modulazione genomica della eNOS.....</i>	27
<i>Modulazione non genomica della eNOS.....</i>	29
viii. Effetti cardiovascolari della terapia ormonale sostitutiva	31
<i>Studi osservazionali</i>	31
<i>Studi clinici d'intervento</i>	32
<i>Fattori responsabili del fallimento della terapia ormonale sostitutiva</i>	33
III. SCOPO DEL LAVORO	39
IV. MATERIALI E METODI	40
i. Condizioni di stabulazione degli animali	40
ii. Ovariectomia e trattamento estrogenico sostitutivo	40
iii. Prelievo e preparazione dei vasi.....	41
iv. Esperimenti <i>ex vivo</i>	41
v. Farmaci utilizzati.....	42
vi. Colture cellulari	43

vii.	Isolamento dell'endotelio	43
viii.	Analisi <i>Western Blot</i>	44
ix.	<i>Real-Time</i> PCR quantitativa	44
x.	Immunostochimica	45
xi.	Analisi statistica	46
V.	RISULTATI	47
i.	Effetto dell'ovariectomia e del trattamento con 17 β -estradiolo sul peso corporeo e sul peso degli uteri	47
ii.	Effetto del trattamento acuto con composti estrogenici sull'aorta toracica di ratti femmine	48
iii.	Effetto dell'ovariectomia e del trattamento con 17 β -estradiolo sulle risposte funzionali a breve termine dell'aorta toracica	49
iv.	Effetto dell'endotelio sulle risposte vascolari a breve termine degli estrogeni in preparati di aorta toracica di ratti femmine	50
v.	Effetto degli antagonisti dei recettori degli estrogeni	51
	<i>Effetto dell'antagonista non selettivo ICI 182,780 sulle risposte vascolari degli estrogeni</i>	<i>51</i>
	<i>Effetto dell'antagonista ERα-selettivo MPP sulle risposte vascolari degli estrogeni ...</i>	<i>52</i>
vi.	Espressione di ER α e ER β in cellule endoteliali di aorta di ratto.....	55
vii.	Effetto della durata della deprivazione estrogenica e del trattamento con 17 β -estradiolo sul peso corporeo e sul peso degli uteri	56
viii.	Effetto della durata dell'ovariectomia sulle risposte vascolari indotte dall'acetilcolina	57
ix.	Effetto della durata della deprivazione estrogenica sulle risposte vascolari a breve termine indotte dagli estrogeni in preparati di aorta toracica di ratto	59
	<i>Effetti vascolari del 17β-estradiolo a diversi tempi di deprivazione estrogenica.....</i>	<i>59</i>
	<i>Effetti vascolari dell'agonista ERα-selettivo PPT a diversi tempi di deprivazione estrogenica</i>	<i>59</i>
	<i>Effetti vascolari dell'agonista ERβ-selettivo DPN a diversi tempi di deprivazione estrogenica</i>	<i>60</i>
x.	Effetto della durata della deprivazione estrogenica sulle risposte vascolari all'acetilcolina e agli estrogeni nell'arteria mesenterica superiore	65
xi.	Istologia e valutazione dell'integrità dell'endotelio.....	69
xii.	Espressione di eNOS, peNOS ed ER α nell'endotelio di aorta di ratto.....	71
	<i>Western blotting</i>	<i>71</i>
	<i>Real time PCR.....</i>	<i>73</i>

<i>Immunoistochimica</i>	74
VI. DISCUSSIONE	75
BIBLIOGRAFIA	75

I. RIASSUNTO

Gli estrogeni esercitano molteplici effetti protettivi sul sistema cardiovascolare, come dimostrato dal fatto che nelle donne in età riproduttiva c'è una minore incidenza di patologie cardiovascolari rispetto agli uomini e alle donne in post-menopausa. Tali effetti, confermati da numerose evidenze sperimentali, sono dovuti all'interazione dell'estradiolo con due distinte isoforme recettoriali, ER α ed ER β , entrambe espresse sia nello strato muscolare che in quello endoteliale della parete vascolare. A livello muscolare, l'estradiolo ha effetti anti-infiammatori e antiproliferativi mentre, a livello endoteliale, induce vasodilatazione attraverso la modulazione genomica e non genomica della NO sintasi endoteliale, enzima chiave per la regolazione del tono vascolare.

È stato quindi ipotizzato che la terapia estrogenica sostitutiva potesse ridurre il rischio di patologie cardiovascolari nelle donne in post-menopausa. Tuttavia, recenti studi clinici non hanno evidenziato benefici della terapia estrogenica sostitutiva né per la prevenzione primaria né per la prevenzione secondaria di malattie cardiovascolari nelle donne in post-menopausa. La discrepanza tra i dati sperimentali e gli studi clinici è stata attribuita a diversi fattori, tra i quali la mancata selettività dei composti estrogenici utilizzati in terapia e il ritardo nell'inizio della terapia stessa rispetto all'insorgenza della menopausa. Infatti, è stato dimostrato che ER α media gran parte degli effetti protettivi degli estrogeni a livello vascolare, come il processo di ri-endotelizzazione, la produzione di prostaciclina e NO e gli effetti anti-infiammatori a livello cerebrale. Inoltre, dalle metanalisi degli studi clinici è emerso che il rischio cardiovascolare è ridotto quando la terapia estrogenica sostitutiva inizia entro 10 anni dall'insorgenza della menopausa.

Nella prima parte del lavoro, è stato valutato il coinvolgimento delle due isoforme recettoriali nella vasodilatazione a breve termine indotta dagli estrogeni in segmenti isolati di aorta di ratto. Poiché il ligando endogeno 17 β -estradiolo lega con uguale affinità ER α ed ER β , sono stati utilizzati composti, agonisti ed antagonisti, selettivi per ciascuna isoforma. Inoltre, è stata valutata l'influenza dei livelli di ormoni circolanti sulle risposte funzionali agli agonisti estrogenici, utilizzando animali ovariectomizzati

come modello di deprivazione estrogenica. Infine, è stata approfondito il ruolo dell'endotelio e di NO in tali risposte. Dagli esperimenti *ex vivo* è emerso che solo l'agonista selettivo per ER α è in grado di indurre vasodilatazione a breve termine in preparati vascolari di ratti femmine, in modo sovrapponibile al 17 β -estradiolo, mentre l'agonista selettivo per ER β non presenta effetti vasoattivi. Tanto per l'agonista ER α -selettivo quanto per il ligando naturale tale rilassamento è risultato endotelio-dipendente e NO-dipendente. Utilizzando un antagonista ER α -selettivo, è stato confermato che l'effetto osservato è mediato dall'interazione con ER α , piuttosto che con ER β , sebbene entrambi le isoforme risultino espresse nelle cellule endoteliali di aorta di ratto. La deprivazione da estrogeni negli animali ovariectomizzati ha completamente abolito la capacità dell'agonista ER α -selettivo e dell'estradiolo di indurre rilassamento nei preparati vascolari, evidenziando l'influenza dei livelli ormonali sull'entità delle risposte a breve termine e dunque l'importanza del momento in cui si dà inizio ad una terapia farmacologica con composti estrogenici.

Nella seconda parte del lavoro, è stata valutata l'influenza dalla durata della deprivazione estrogenica prima dell'inizio del trattamento sostitutivo sugli effetti vascolari degli estrogeni. Per valutare questa ipotesi nel modello sperimentale, sono stati condotti degli esperimenti il cui protocollo prevedeva l'utilizzo di animali ovariectomizzati per tempi diversi (1, 4 e 8 mesi), in modo da mimare una deprivazione da estrogeni a medio e lungo termine. Ai diversi tempi di ovariectomia, è stata valutata l'espressione della NO sintasi endoteliale (eNOS) e della sua forma fosforilata (peNOS) nell'endotelio di aorta, come pure i livelli di ER α . I risultati dimostrano che, in seguito ad un periodo prolungato di deprivazione estrogenica (8 mesi), risultano compromesse le risposte funzionali agli estrogeni e ad altri vasodilatatori endotelio-dipendenti, come l'acetilcolina. L'analisi istologica non ha però evidenziato lesioni dell'endotelio nelle sezioni di aorta di animali ovariectomizzati a lungo termine. L'espressione di eNOS e di peNOS viene modulata positivamente in seguito a trattamento estrogenico sostitutivo dopo 1 e 4 mesi di ovariectomia, mentre non viene modificata dopo 8 mesi di deprivazione estrogenica. I livelli di mRNA di ER α risultano drasticamente ridotti dopo 8 mesi di ovariectomia, suggerendo che un pool così ridotto non sia in grado di mediare adeguatamente gli effetti biologici degli estrogeni circolanti. Mediante esperimenti di immunocistochemica è stato possibile apprezzare ancora una volta una

ridotta espressione di peNOS e di ER α nell'endotelio degli animali ovariectomizzati da 8 mesi. Questi dati forniscono quindi una base sperimentale alla cosiddetta "timing hypothesis", che attribuisce al tempo intercorso tra l'inizio della menopausa e l'inizio della terapia estrogenica sostitutiva un ruolo decisivo per avere effetti protettivi a livello cardiovascolare.

Testo inglese

17 β -estradiol exerts beneficial effects on the cardiovascular system, as shown by several epidemiological studies, which have demonstrated a several-fold higher prevalence of coronary heart disease in men compared with women before the age of 65. Experimental results showed that estradiol acts through two estrogen receptor isoforms, ER α and ER β , which are both expressed in the vascular wall, where estrogen displays anti-inflammatory and anti-proliferative activity in smooth muscle cells and causes vasodilation through both genomic and nongenomic activation of endothelial nitric oxide synthase (eNOS).

Experimental evidence and observational studies also suggest that postmenopausal hormone therapy protects against cardiovascular disease, whereas randomized clinical trials are not consistent with these findings, as regards primary and secondary prevention of cardiovascular diseases in post-menopausal women treated with hormone replacement therapy. So, it has been hypothesized that the receptor selectivity of estrogen compounds and the time since menopause are both crucial for cardiovascular protection of estrogen treatment. It is known that ER α mediates the majority of vascular protective effects of estrogen, such as the re-endothelialization process, NO and prostacyclin production and the anti-inflammatory action in the brain. A recent retrospective study also concluded that the time of therapy initiation is likely to have an impact on cardiovascular risk. However, experimental and/or clinical evidence demonstrating this hypothesis is missing.

The involvement of each ER isoform in the short-term responses to estradiol in isolated rat aortas was first evaluated. In order to assess the relative contribution of ER α and ER β to vascular responses, subtype-selective agonists and antagonist were used, because estradiol binds with the same affinity to the two isoforms. The influence

of circulating hormone levels was evaluated using both intact and ovariectomized (OVX) rats. Finally, the role of endothelium and NO in these short-term responses was also studied. Acute treatment with the ER α -agonist PPT dose-dependently relaxed aortic rings from intact females; the response induced by 17 β -estradiol fully overlapped with that elicited by PPT. Conversely, the ER β -agonist had no effects on aortic vasomotion. The vasorelaxation elicited by the selective ER α -agonist as well as by 17 β -estradiol was NO- and endothelium-dependent and was mediated by interaction with ER α , as shown using a selective ER α -antagonist, although the expression of both ER proteins was detected in isolated rat aortic endothelial cells. Levels of circulating hormones influenced the extent of estrogen vascular responses. In aortic rings from estrogen-depleted rats, neither ER α -agonist nor 17 β -estradiol induced acute vascular relaxation. The short-term effect of both compounds was restored in tissues from estrogen-replaced ovariectomized animals, whereas DPN remained ineffective. These findings may have implications for selective targeting of ER subtypes in treating vascular disease.

Next, the influence of prolonged ovarian hormone deprivation on estrogen-induced vascular responses was studied. Experiments were performed in aortic rings from ovariectomized rats at 1, 4 or 8 months since surgery, in order to mimic differential time since hormone deprivation. eNOS and phosphorylated eNOS (peNOS) protein expression, as well as ER α mRNA levels, were also evaluated in the aortic endothelium obtained from each experimental group. The results show that prolonged estrogen deprivation abolished vascular relaxation elicited by ER α and significantly reduced acetylcholine-induced endothelium-dependent vasodilation. Histological analysis provided no evidence for visible injury or gross vascular changes irrespective of ovariectomy duration and estrogen-replacement, suggesting the occurrence of functional rather than morphological impairment of the endothelium after long-term hypoestrogenity. Total eNOS and peNOS protein levels in the aortic endothelium of ovariectomized rats were increased by estrogen treatment after 1 or 4 months from surgery, whereas the expression of both protein was not improved by estrogen treatment after prolonged hormone deprivation. This was associated with a 3-fold decline in ER α mRNA levels in the aortic endothelium from 8-month vs 1-month ovariectomized rats. Immunohistochemical analysis for ER α and peNOS in aortic

tissues from 1-month as compared with 8-months OVX E2-treated animals revealed marked negative regulation of the former proteins. The present findings document that the functional impairment of the ER α /eNOS signaling network after an extended period of hypoestrogenicity was insensitive to estrogen replacement, thus providing experimental support to early initiation of estrogen replacement with preferential ER α drugs to improve cardiovascular outcomes.

II. INTRODUZIONE

Il 17 β -estradiolo, il principale estrogeno femminile, ricopre il ruolo di modulatore di importanti processi fisiologici non solo a livello dell'apparato riproduttivo, ma anche in tessuti non riproduttivi, quali l'osso, il sistema nervoso centrale e il sistema cardiovascolare. Le azioni biologiche degli estrogeni sono per la maggior parte mediate dall'attivazione di specifici recettori intracellulari (Mendelsohn e Karas, 1999).

i. I recettori degli estrogeni

I recettori degli estrogeni (ER) appartengono alla superfamiglia dei recettori nucleari, che agiscono da fattori di trascrizione attivati da ligandi. Esistono due isoforme distinte del recettore degli estrogeni, ER α ed ER β , entrambe distribuite in diversi tessuti ed espresse a livello cardiovascolare (Gustafsson, 2003).

Analogamente ad altri recettori nucleari, i geni che codificano per ER α ed ER β sono organizzati in regioni funzionali indipendenti, ma capaci di interagire tra di loro. L'interazione con un ligando induce cambiamenti conformazionali nel recettore e porta, dopo un serie di eventi, a variazioni della velocità di trascrizione dei geni regolati dagli estrogeni. Questi eventi comprendono la dimerizzazione del recettore, l'interazione con il DNA e il reclutamento di cofattori, fino alla formazione del complesso di inizio della trascrizione (Nilsson et al., 2001).

Il dominio ammino-terminale comprende una zona responsabile della transattivazione ligando-indipendente (TAF-1, *transcriptional-activation function-1*), coinvolta nelle interazioni proteina-proteina e nell'attivazione della trascrizione dei geni bersaglio.

Il dominio centrale o *DNA binding domain* (DBD) contiene il sito responsabile del legame con sequenze specifiche del DNA, gli *estrogen responsive elements* (ERE); inoltre, in questa regione sono presenti due strutture *zinc-finger*, che hanno un ruolo importante nella dimerizzazione del recettore e nel legame con il DNA, e il sito che consente il passaggio dalla conformazione inattiva a quella attiva (*hinge region*).

Il dominio carbossi-terminale forma il sito di legame per il 17 β -estradiolo e altri composti ad azione estrogenica (*ligand binding domain*, LBD); questa regione contiene anche una zona di transattivazione ligando-dipendente (TAF-2, *transcriptional-activation*

function-2). Questo dominio è coinvolto nei processi di dimerizzazione, interazione con le *heat shock proteins*, traslocazione nucleare e modulazione della trascrizione di geni bersaglio, mediante il reclutamento di coattivatori e corepressori. Inoltre, in questo dominio è presente una regione responsabile della diverse risposte dei recettori degli estrogeni al 17 β -estradiolo e ai modulatori selettivi dei recettori degli estrogeni (SERM); questa regione assume conformazioni distinte a seconda del ligando e permette la distinzione tra composti agonisti e antagonisti (Nilsson et al., 2001).

I geni che codificano per le due isoforme si trovano su cromosomi diversi. Il primo recettore, successivamente denominato ER α , è stato clonato nel 1986 da un gene presente sul cromosoma 6 umano (Green et al., 1986); nel 1996 è stato poi identificato ER β sul cromosoma 14 (Kuiper et al., 1996). Di entrambi i recettori esistono diverse varianti di *splicing*. Le due isoforme presentano elevata omologia di sequenza (96%) nella zona che lega il DNA e nel sito di interazione con i ligandi (53%); in particolare, i LBD di ER α ed ER β hanno una struttura terziaria molto simile. Nella regione ammino-terminale i due recettori presentano maggiori differenze di sequenza (Mendelsohn e Karas, 1999).

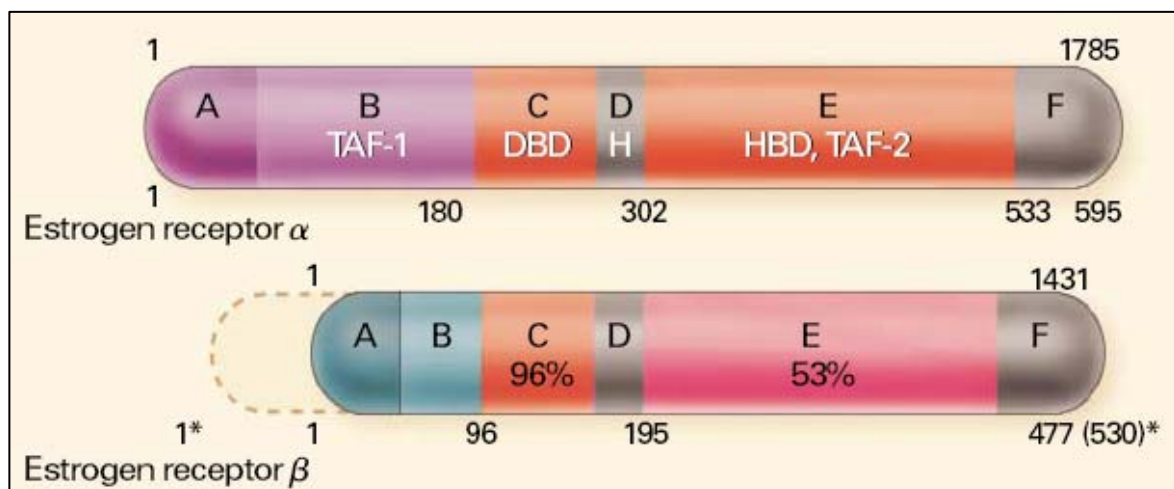


FIGURA 1 *Struttura dei recettori α e β degli estrogeni nell'uomo* TAF-1 = *transcriptional-activation function-1*; DBD = *DNA binding domain*; H = *hinge region*; HBD = *hormone binding domain*; TAF-2 = *transcriptional-activation function-2*. I numeri sopra e sotto ogni recettore si riferiscono al numero di nucleotidi e di amminoacidi, rispettivamente (da Mendelsohn e Karas, 1999).

ii. Meccanismi d'azione degli estrogeni

Meccanismo classico. Nello stato di riposo, il recettore, in equilibrio tra citoplasma e nucleo, è legato a proteine che lo mantengono in uno stato inattivo e ne mascherano il sito di legame con il DNA (*heat shock proteins* o hsp). L'interazione del *ligand binding domain* con un agonista induce un cambiamento conformazionale del recettore che porta alla dissociazione dalle proteine inibitorie hsp e all'esposizione dei siti di dimerizzazione e di legame con il DNA. Gli omodimeri e gli eterodimeri traslocano nel nucleo attraverso un meccanismo non ancora completamente chiarito, ma che coinvolge l'interazione diretta con la caveolina-1. Una volta nel nucleo, i dimeri si legano agli ERE localizzati nella regione dei promotori di geni bersaglio e modulano la trascrizione con il contributo di coattivatori e corepressori, che vengono reclutati in modo diverso dalle due isoforme recettoriali (Fig. 2A). Questa regolazione dell'espressione genica è caratteristica dei recettori nucleari e rappresenta il meccanismo d'azione classico degli estrogeni (Gruber et al., 2002; Bolego et al., 2006).

In aggiunta a questa, sono note anche altre modalità di attivazione dei recettori degli estrogeni (Gruber et al., 2002; Bolego et al., 2006).

Meccanismo ERE-indipendente. La modulazione dell'espressione genica può avvenire anche in modo ERE-indipendente, attraverso l'interazione con altri fattori di trascrizione che regolano geni privi di ERE nella zona dei propri promotori (Fig. 2B). Per esempio, sia ER α che ER β possono legare il fattore di trascrizione nucleare AP-1 (*activating protein-1*), attivando la trascrizione dei suoi geni bersaglio (Peach et al., 1997). Inoltre, ER α è in grado di bloccare l'espressione di interleuchina-6 (IL-6), legando il fattore di trascrizione NF-kB e impedendone l'interazione con i *responsive elements* sul gene di IL-6 (Galien e Garcia, 1997).

Meccanismo ligando-indipendente. La regolazione della trascrizione mediata dai recettori degli estrogeni non è limitata alla sola interazione con ligandi specifici. Per esempio, questi recettori possono venire attivati in seguito alla fosforilazione da parte di protein-chinasi, in risposta all'attivazione dei recettori di fattori di crescita (Fig. 2C). L'esistenza di tale *cross-talk* è stata dimostrata nel caso dell'attivazione ligando-

indipendente dei recettori degli estrogeni da parte dell'insulina, dell'EGF (*epidermal growth factor*) e del TGF- α (*transforming growth factor- α*) (Ignar-Trowbridge et al., 1993).

Meccanismo non genomico. Gli estrogeni hanno anche effetti che non possono essere attribuiti alla modulazione della trascrizione genica a causa della loro rapida insorgenza. Infatti, questi effetti non genomici si verificano nel giro di secondi o minuti dall'esposizione all'estradiolo e sono mediati dall'attivazione di diversi sistemi di trasduzione del segnale, quali la via delle protein chinasi PKA, PKB, PKC, delle MAPK (*mitogen-activated protein kinase*) e della PI3K (*phosphatidylinositol 3-OH kinase*); inoltre, in seguito all'attivazione di ER vengono prodotti secondi messaggeri, quali Ca^{2+} , cAMP e cGMP (Losel et al., 2003; Fig. 2D). L'attivazione di meccanismi non genomici può influenzare anche l'espressione genica; ciò implica che le azioni nucleari e quelle non nucleari degli estrogeni siano integrate (Pedram et al., 2002). Gli effetti non genomici degli estrogeni sono molteplici, ma hanno alcune caratteristiche comuni: sono troppo rapidi per essere compatibili con la sintesi di mRNA e proteine, non vengono bloccati da inibitori della trascrizione o della sintesi proteica e sono indotti anche da molecole che non attraversano la membrana cellulare, quali l'estradiolo complessato con albumina (Simoncini et al., 2002). Questi effetti sembrano essere mediati da recettori degli estrogeni localizzati sulla membrana cellulare. Sebbene non siano ancora stati clonati, i recettori in grado di mediare gli effetti rapidi degli estrogeni potrebbero essere: (a) gli stessi recettori nucleari che traslocano sulla membrana (Razandi et al., 2004); (b) forme troncate del recettore ER α che localizzano di preferenza sulla membrana (Li et al., 2003); (c) recettori per neurotrasmettitori o ormoni peptidici modulati allostericamente dagli estrogeni (Grattan et al., 1996); (d) nuovi componenti della famiglia dei recettori degli estrogeni (Edwards, 2005). In particolare, è stato recentemente descritto un recettore accoppiato a proteina G, GPCR30, in grado non solo di legare gli estrogeni ma anche di attivare rapidamente la via della PI3K (Revankar et al., 2005).

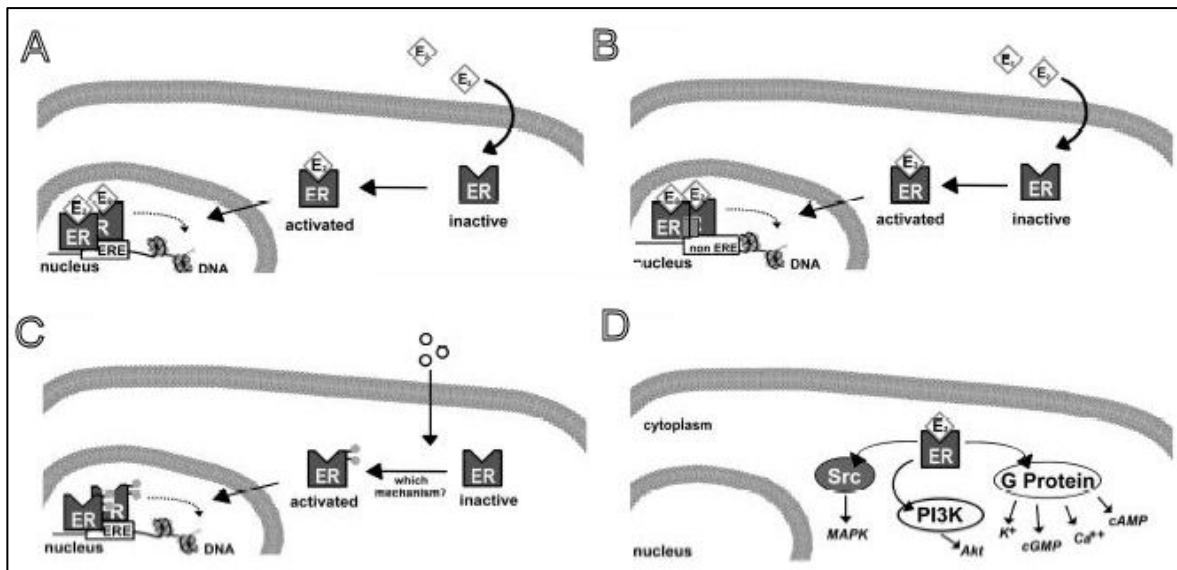


FIGURA 2 *Meccanismo d'azione dei recettori degli estrogeni* (A) meccanismo classico, ligando- e ERE-dipendente, (B) meccanismo ERE-indipendente, (C) meccanismo ligando-indipendente, (D) meccanismo non genomico (*modificato da Bolego et al., 2006*).

iii. Fonti e sintesi degli estrogeni

I composti estrogenici a cui le donne possono essere esposte sono svariati e derivano da fonti sia endogene che esogene. Prima della menopausa, la fonte principale di estrogeni endogeni è rappresentata dal 17 β -estradiolo prodotto dall'ovaio. La sintesi di estradiolo avviene grazie alle cellule della teca, che producono e secernono androgeni a partire dal colesterolo; il testosterone così formato diffonde poi nelle cellule della granulosa, dove viene convertito in 17 β -estradiolo tramite l'enzima aromatasi (Hillier et al., 1994). L'aromatasi è presente anche in altri tessuti, quali la muscolatura, il tessuto adiposo, i testicoli, la placenta, il tessuto nervoso e l'endotelio vascolare; ciascuno di questi tessuti è quindi in grado di sintetizzare estrogeni a livello locale. Una volta sintetizzato, l'estradiolo viene secreto dalle cellule della granulosa nella circolazione sistemica, dove lega in modo reversibile una *sex hormone binding globulin* (SHBG) o l'albumina, che hanno la funzione di veicolare questo ormone lipofilo nel sangue; solo una minima parte è libera, a causa della sua elevata lipofilia. L'estrogeno libero diffonde nei tessuti bersaglio, dove esercita i suoi effetti genomici e non-genomici. L'estradiolo viene poi ulteriormente trasformato nei composti meno attivi estrone e estriolo, prodotti principalmente a livello epatico. Il catabolismo enzimatico porta alla formazione di coniugati solfati o glucuronidati, idrossiestrogeni e metossiestrogeni, escreti con la bile

o le urine (Gruber et al., 2002). Il controllo della sintesi degli estrogeni durante l'età fertile è esercitato dall'asse ipotalamo-ipofisi attraverso la secrezione ciclica di gonadotropine; in particolare, l'ormone follicolo-stimolante regola l'espressione degli enzimi coinvolti nella steroidogenesi insieme ad altri fattori paracrini.

Durante il ciclo mestruale, le concentrazioni plasmatiche di estradiolo variano nella donna da 0.36 a 2.8 nM; i livelli di ormone raggiungono un picco durante la fase preovulatoria, mentre sono più bassi nella fase premestruale. Durante la gravidanza, i livelli ematici di estradiolo arrivano a 70 nM, a causa della produzione placentare, e crescono ulteriormente in prossimità del parto. Nelle donne in post-menopausa, venendo a mancare la funzionalità ovarica, l'estradiolo viene principalmente prodotto dalla conversione di androgeni nel tessuto adiposo; la concentrazione plasmatica di estradiolo scende fino a 0.21 nM, livelli equivalenti a quelli dei maschi (Chambliss et al., 2002).

Oltre a quelle endogene, esistono importanti fonti esogene di molecole ad attività estrogenica, quali i contraccettivi, la terapia ormonale sostitutiva nelle donne in post-menopausa e i fitoestrogeni presenti nei cibi e nelle bevande. Quindi l'organismo può essere esposto a diversi tipi e diverse concentrazioni di estrogeni a seconda del sesso, dell'età, della dieta e delle terapie in corso.

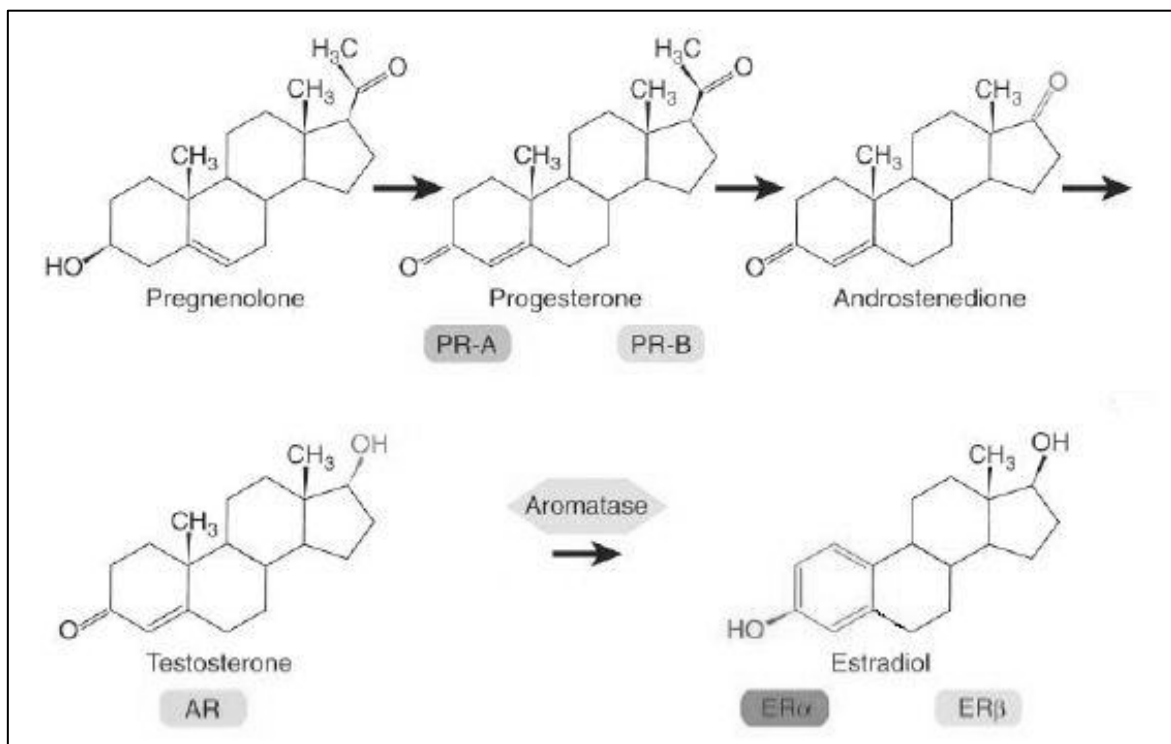


FIGURA 3 Sintesi degli estrogeni (modificata da Mendelshon e Karas, 2005).

iv. Ruoli fisiologici degli estrogeni

In generale, gli estrogeni sono sempre stati considerati ormoni riproduttivi esclusivamente femminili; in realtà possono esercitare un ampio spettro di azioni biologiche in diversi tipi di tessuti anche negli uomini. Infatti, oltre agli effetti sulla crescita e sullo sviluppo dell'apparato riproduttivo femminile, gli estrogeni sono in grado di influenzare il tessuto osseo, il sistema immunitario, il sistema nervoso centrale e il sistema cardiovascolare (Barkhem et al., 2004).

La diversa distribuzione tissutale delle due isoforme recettoriali suggerisce che ER α e ER β mediano funzioni biologiche distinte. Per esempio, ER α è l'isoforma più abbondante nell'ovaio, nella prostata, nella vescica, nel polmone, nel colon, nello stomaco, nel sistema nervoso centrale e nell'apparato cardiovascolare. Inoltre, all'interno di uno stesso tessuto, l'espressione di un sottotipo recettoriale può essere limitata ad uno specifico tipo cellulare; per esempio, l'ovaio esprime entrambe le isoforme, ma ER α è presente nelle cellule della teca, mentre ER β è localizzato sulle cellule della granulosa (Barkhem et al., 2004).

Apparato riproduttivo maschile e femminile

Gli estrogeni sono di fondamentale importanza per la crescita, la differenziazione, lo sviluppo e la funzione dell'apparato riproduttivo femminile; infatti, i principali bersagli dell'azione degli estrogeni sono il tessuto mammario e l'apparato riproduttivo femminile. ER α e ER β sono entrambi espressi nelle ghiandole mammarie, ma solo ER α sembra essere essenziale per lo sviluppo delle ghiandole stesse; inoltre, la sovraespressione di ER α è implicata nel 70% dei casi di cancro della mammella (Gustafsson, 2003). ER α e ER β sono espressi anche nell'utero, nell'ovaio, nei testicoli e nella prostata. La delezione del gene che codifica per ER α nei topi porta all'infertilità sia maschile che femminile, mentre la mancanza di ER β causa difetti riproduttivi solo nelle femmine. Nei topi maschi privi di ER β si osservano, invece, iperplasia della prostata e della vescica, tessuti che esprimono principalmente questo recettore (Gustafsson, 2003).

Tessuto osseo

A livello dello scheletro, gli estrogeni riducono il riassorbimento osseo, inibendo l'attività degli osteoclasti. La carenza di estrogeni che si instaura dopo la menopausa o la mancanza di ER α causano osteoporosi; la terapia estrogenica sostitutiva è però in grado di ridurre il riassorbimento del tessuto osseo nelle donne in post-menopausa (Gruber et al., 2002).

Sistema nervoso centrale

Gli estrogeni influenzano molteplici funzioni del sistema nervoso centrale (SNC), tra cui le funzioni di apprendimento, la memoria, la termoregolazione e le funzioni riproduttive, attraverso il controllo dell'asse ipotalamo-ipofisario, che a sua volta è responsabile della regolazione della produzione e secrezione di estrogeni da parte delle gonadi. L'instaurarsi della menopausa, con il conseguente calo degli estrogeni circolanti, è collegato ad un aumentato rischio di patologie neurodegenerative, come l'Alzheimer; rimane dubbia l'efficacia della terapia estrogenica sostitutiva nel proteggere da queste patologie. Sicuramente ER β , espresso nelle aree del cervello coinvolte nei processi di apprendimento e di memoria, ha un ruolo importante nella modulazione di tali funzioni (Shughrue et al., 1997). È noto anche che l'estradiolo, mediante l'attivazione di ER α , esercita attività anti-infiammatoria e neuroprotettiva (Vegeto et al., 2004; Suzuki et al., 2007).

v. Effetti cardiovascolari degli estrogeni

Dati sperimentali e studi epidemiologici indicano che gli estrogeni esercitano molteplici effetti protettivi sul sistema cardiovascolare. Molti studi hanno dimostrato che le donne sono meno soggette a patologie coronariche, aterosclerosi, ipertensione e ictus fino alla menopausa (Barrett-Connor, 1995). Quando i livelli plasmatici di estrogeni diminuiscono, il rischio di malattie del sistema cardiovascolare diventa paragonabile negli uomini e nelle donne; tuttavia, studi epidemiologici hanno messo in evidenza una minore incidenza di patologie cardiovascolari nelle donne in post-menopausa che fanno uso della terapia

ormonale sostitutiva, sia estrogenica che estrogeno-progestinica, rispetto a quelle che non la utilizzano (Stampfer et al., 1991; Mosca et al., 2001).

Gli estrogeni possono esercitare effetti diretti e specifici sulle cellule della parete vascolare e del cuore oppure possono avere azioni indirette che coinvolgono il metabolismo dei lipidi, il processo della coagulazione e la regolazione di altre proteine vasoattive (Mendelsohn e Karas, 1999; Cignarella et al., 2001).

Effetti degli estrogeni sulle lipoproteine plasmatiche

Gli effetti degli estrogeni sui livelli plasmatici dei lipidi sono in gran parte dovuti alla modulazione dell'espressione dei geni delle apoproteine nel fegato, dove è espressa prevalentemente l'isoforma recettoriale ER α (Kuiper et al., 1997).

Livelli elevati di colesterolo LDL (*low density lipoprotein*) e di lipoproteina (a), insieme alla riduzione del colesterolo HDL (*high density lipoprotein*), costituiscono un importante fattore di rischio per lo sviluppo di patologie cardiovascolari; tali parametri sono fortemente influenzati dagli estrogeni circolanti. Dopo la menopausa, si verifica un aumento marcato del colesterolo totale, dovuto soprattutto all'incremento dei livelli plasmatici di LDL, mentre diminuiscono quelli di HDL; aumentano inoltre i livelli di trigliceridi e di lipoproteina (a) (Jensen et al., 1990). Somministrati come terapia ormonale sostitutiva nelle donne in postmenopausa, gli estrogeni normalizzano i livelli di colesterolo totale, riducendo i livelli plasmatici di LDL, mentre sono in grado di aumentare la produzione di HDL e di trigliceridi; inoltre, abbassano i livelli di lipoproteina (a) (The Writing Group for the PEPI Trial, 1995). La via di somministrazione, il dosaggio e il tipo di formulazione possono influire sugli effetti degli estrogeni. Somministrati per via transdermica, gli estrogeni sono meno efficaci nel normalizzare i livelli delle lipoproteine plasmatiche; inoltre, anche l'associazione con alcuni progestinici può ridurre tali effetti (The Writing Group for the PEPI Trial, 1995). Studi recenti indicano che gli estrogeni equini coniugati (CEE) a basso dosaggio sono in grado di migliorare il quadro lipidico nelle donne in postmenopausa in modo più efficace rispetto al dosaggio *standard* (Mercurio et al., 2003). Tra i composti utilizzati in terapia, il raloxifene, un modulatore selettivo dei recettori degli estrogeni, ha effetti meno pronunciati degli estrogeni ma è più efficace nel ridurre i livelli di lipoproteina (a) (Walsh et al., 1998). Oltre a regolare le concentrazioni

plasmatiche di lipidi, gli estrogeni sono anche in grado di modulare l'espressione dell'enzima chiave per la sintesi di colesterolo endogeno, l'HMG CoA reduttasi, e dei recettori epatici delle LDL (Nathan et al., 1997). Queste osservazioni indicano un ruolo importante dell'estradiolo nel controllo dei livelli delle lipoproteine plasmatiche attraverso ER α .

Effetti antiossidanti degli estrogeni

L'estradiolo possiede effetti antiossidanti. La carenza di estrogeni in animali ovariectomizzati porta ad un aumento della produzione di anione superossido, mentre il trattamento *in vivo* con estrogeni in animali ovariectomizzati è in grado di ridurre la formazione di superossido (Florian et al., 2004); nelle donne in menopausa la carenza di estrogeni produce *stress* ossidativo (Lam et al., 2002). A concentrazioni fisiologiche, l'estradiolo è in grado di inibire l'ossidazione delle LDL *in vitro* (Shweary et al., 1997) e nelle donne in postmenopausa la somministrazione di estradiolo è in grado di ridurre l'ossidazione delle LDL *in vivo*, limitando anche la formazione di esteri del colesterolo e l'*uptake* delle LDL acetilate da parte dei macrofagi durante il processo di formazione della placca aterosclerotica (Sack et al., 1994). Inoltre, gli estrogeni proteggono i fosfolipidi di membrana dalla perossidazione (Dubey et al., 1999). Questi effetti antiossidanti sono probabilmente dovuti alla modulazione degli enzimi che regolano la produzione e la degradazione di anione superossido (Arnal et al., 1996).

Effetti degli estrogeni sulla coagulazione e sulla fibrinolisi

I recettori degli estrogeni modulano i geni epatici delle proteine coinvolte nei processi di coagulazione e di fibrinolisi. Nelle donne che utilizzano la terapia ormonale sostitutiva diminuiscono le concentrazioni plasmatiche di fibrinogeno e di antitrombina III (Seed et al., 2004); gli estrogeni hanno quindi un effetto pro-coagulante. L'estradiolo è anche in grado di ridurre i livelli di fattori anti-fibrinolitici, come il PAI-1 (*plasminogen-activator inhibitor type-1*) (Seed et al., 2004). Inoltre, alcuni studi clinici evidenziano come la terapia estrogenica sostitutiva nelle donne in post-menopausa aumenti sia l'attività coagulativa che quella fibrinolitica (Teede et al., 2000). In generale, l'uso di terapia ormonale sostitutiva e di contraccettivi è associato ad un aumento degli eventi di trombosi venosa.

L'effetto totale dipende dal tipo di estrogeno usato, dal dosaggio e dalla durata della terapia (Mendelsohn e Karas, 2005).

Effetti degli estrogeni sul cuore

Entrambe le isoforme del recettore degli estrogeni sono espresse nei miociti cardiaci, dove attivano la trascrizione di specifici geni bersaglio. È noto da studi clinici che esistono differenze nella funzionalità cardiaca tra i due sessi. Per esempio, nelle donne si osservano una minore massa cardiaca e maggiore contrattilità, che però diminuisce dopo la menopausa (Hayward et al., 2001). Anche le funzioni elettrofisiologiche del cuore differiscono fra uomini e donne; le donne, infatti, hanno una frequenza cardiaca maggiore a riposo (Larsen et al., 1998). È stato dimostrato che la somministrazione di estrogeni riduce il danno cardiaco da ischemia e riperfusione, favorisce la contrattilità, inibisce l'ipertrofia cardiaca e migliora i parametri emodinamici in animali (Kolodgie et al., 1997; Anderson et al., 2005; Booth et al., 2005; Pelzer et al., 2005); questi effetti protettivi sulla funzionalità cardiaca sono stati attribuiti all'attivazione di ER α , ma non di ER β .

Effetti degli estrogeni sui vasi

ER α e ER β sono entrambi presenti sia nello strato endoteliale che in quello muscolare della parete vascolare, dove sono responsabili del controllo del tono vascolare, dell'adesione dei monociti e dei processi di rimodellamento (Mendelsohn e Karas, 1999; Cignarella et al., 2001).

Estrogeni e rimodellamento vascolare. In modelli animali di lesione carotidea, l'asportazione dell'endotelio porta all'esposizione di una superficie in grado di favorire la formazione della placca. L'estradiolo può abolire la risposta vascolare al danno alla carotide in diversi modelli animali, in quanto è in grado di promuovere il processo di ri-endotelizzazione, mediato esclusivamente da ER α , tramite un aumento della concentrazione locale di VEGF (Brouchet et al., 2001). Gli estrogeni prevengono anche l'apoptosi delle cellule endoteliali in modo recettore-mediato (Sypridopoulos et al., 1997). Il processo di ri-endotelizzazione è accompagnato anche da una ridotta formazione della neointima, in conseguenza dell'inibizione della proliferazione e migrazione delle cellule muscolari lisce (Cornwell et al., 1994; Dai-Do et al., 1996; Garcia et al., 2005); in entrambi

i casi, si tratta di effetti recettore-mediati. Inoltre, ER α è coinvolto nei processi di angiogenesi e rivascolarizzazione, come evidenziato in studi con animali *knock-out* oppure utilizzando agonisti selettivi dei recettori degli estrogeni (Johns et al., 1996; Zaitseva et al., 2004).

Estrogeni e molecole di adesione. L'adesione dei leucociti all'endotelio vascolare e la loro migrazione nella tonaca intima è uno dei fattori principali che contribuiscono alla formazione della placca aterosclerotica in seguito a un processo infiammatorio. Molte delle interazioni tra le molecole di adesione dei leucociti e i loro recettori endoteliali sono indotte dalle citochine pro-infiammatorie. Il trattamento con estradiolo è in grado di inibire l'espressione delle molecole di adesione VCAM-1, E-selectina e ICAM-1 indotta dall'interleuchina-1 sulla superficie di cellule endoteliali in coltura (Caulin-Gasler et al., 1996). In modelli animali di aterosclerosi, il rimpiazzo estrogenico dopo ovariectomia riduce in modo significativo l'adesione e la migrazione dei monociti rispetto al placebo, a causa di una ridotta espressione delle molecole di adesione (Nathan et al., 1999).

Estrogeni e tono vascolare. Numerosi studi hanno messo in luce gli effetti cardiovascolari protettivi degli ormoni sessuali femminili, tra cui quelli a livello della parete vasale dove sono espresse entrambe le isoforme dei recettori degli estrogeni ER α ed ER β . In particolare, è stato dimostrato in diversi modelli animali *in vivo* e nell'uomo che l'endotelio vasale rappresenta un'importante bersaglio dell'azione estrogenica. L'estradiolo regola il tono vascolare in diversi modi; infatti, è in grado di modulare in modo negativo l'espressione di proteine con effetto vasocostrittore oppure di aumentare la produzione di sostanze che inducono vasodilatazione.

Durante il ciclo mestruale si osservano variazioni nei livelli dei componenti del sistema renina-angiotensina e nella loro attività (Chidambaram et al., 2002). Nelle donne in post-menopausa, la somministrazione di estrogeni esogeni porta ad una diminuzione dei livelli plasmatici di renina e di enzima di conversione dell'angiotensina (Schunkert et al., 1997); inoltre, l'estradiolo inibisce *in vivo* e *in vitro* la produzione di endotelina-1 stimolata da angiotensina II (Yilikorkala et al., 1995; Morey et al., 1998). Infine, l'estradiolo e altri composti ad attività estrogenica sono in grado di ridurre l'espressione dei recettori AT₁

per l'angiotensina II (Nickenig et al., 1998). Quindi, in generale, gli estrogeni inibiscono l'espressione e l'attività di proteine che inducono vasocostrizione.

L'estradiolo è anche in grado di indurre vasodilatazione, agendo per via recettoriale sia sulle cellule endoteliali che su quelle muscolari della parete vascolare. Nei vasi gli estrogeni inducono vasodilatazione sia attraverso meccanismi d'azione classici (modulazione della NO sintasi endoteliale e della prostaglandino sintasi) sia attraverso l'attivazione non genomica della NO sintasi endoteliale (Case et al., 1999; Chambliss e Shaul, 2002). La somministrazione acuta *in vivo* e *in vitro* di estrogeni induce rilassamento vascolare sia in modelli animali che nelle donne (Gilligan et al., 1994; Kublickiene et al., 2005; Guo et al., 2005). Il trattamento a lungo termine con estrogeni non solo riduce le risposte ad agenti vasocostrittori in arterie isolate, ma è in grado di aumentare il rilascio basale di ossido nitrico e la sintesi di prostaciclina, molecole con attività vasodilatante, e di incrementare la vasodilatazione indotta da acetilcolina nelle donne in post-menopausa (Collins et al., 1994; Herrington et al., 1994; Mikkola et al., 1995). La capacità dell'estradiolo di aumentare la vasodilatazione endotelio-dipendente è parzialmente contrastata dall'associazione con progestinici. L'estradiolo è in grado di indurre vasodilatazione anche in vasi privi di endotelio, mediante l'attivazione dei canali del potassio calcio-dipendenti (Wellman et al., 1996); inoltre, a concentrazioni elevate, l'estradiolo inibisce i canali del calcio di tipo L nelle cellule muscolari lisce, favorendo quindi il rilassamento vascolare (Freay et al., 1997). Infine, l'estradiolo stimola la produzione di AMP ciclico e di adenosina, molecole dotate attività vasodilatante, nelle cellule muscolari lisce (Dubey et al., 2002). Come conseguenza degli effetti degli estrogeni sulla parete vascolare, la pressione arteriosa è inferiore nelle donne rispetto agli uomini; invece, dopo la menopausa l'ipertensione ha una maggiore prevalenza tra le donne che tra gli uomini di pari età (Dubey et al., 2002). Sia la vasodilatazione indotta dagli estrogeni che la pressione arteriosa sono sensibili alle variazioni dei livelli di estradiolo circolante che si verificano durante il ciclo mestruale, la gravidanza e la menopausa. La terapia ormonale sostitutiva non sembra d'altra parte incidere in modo significativo sulla pressione arteriosa delle donne in menopausa (Dubey et al., 2002).

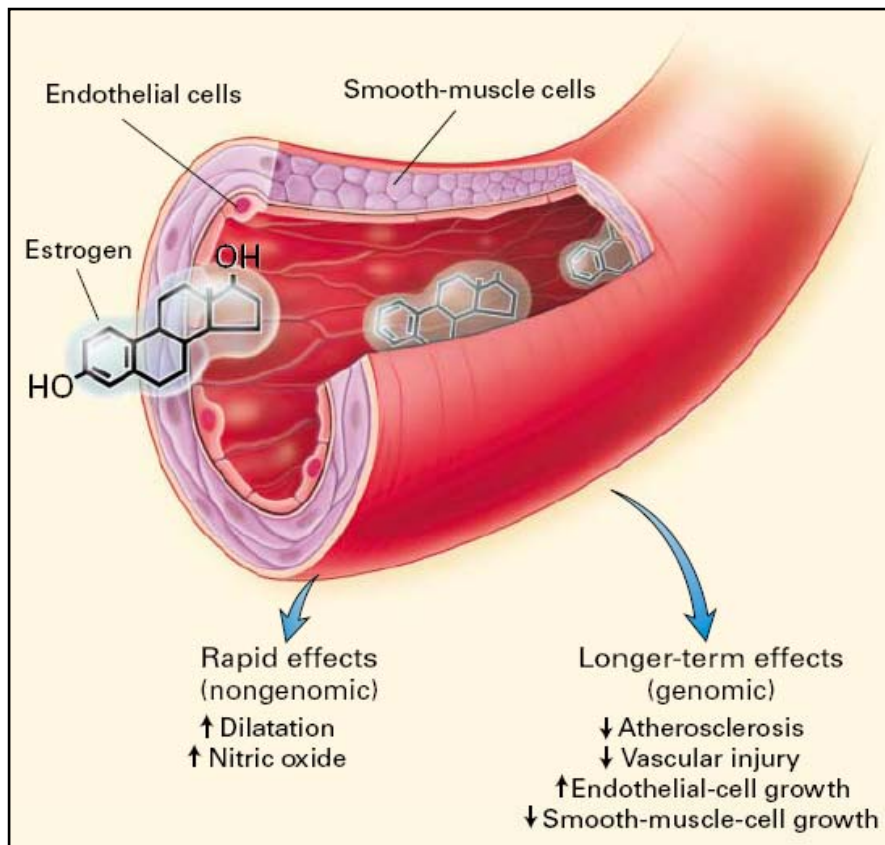


FIGURA 4 Effetti diretti degli estrogeni sulla parete vascolare. L'estradiolo induce sia effetti vasodilatatori rapidi sia azioni a lungo termine, che contribuiscono a ridurre la risposta al danno vascolare e a prevenire il processo di aterosclerosi. Questi effetti avvengono per azione diretta degli estrogeni sulle cellule endoteliali e le cellule muscolari lisce, che esprimono entrambe le isoforme del recettore degli estrogeni (da Mendelsohn e Karas, 1999).

vi. Estrogeni e modulazione della eNOS

Uno degli effetti più rilevanti del 17β -estradiolo a livello vascolare è l'aumento della produzione di ossido nitrico, che avviene attraverso la modulazione dell'espressione e dell'attività della NO sintasi endoteliale (eNOS) (Chambliss e Shaul, 2002).

L'ossido nitrico (NO) è un radicale libero dell'azoto con emivita brevissima (solo pochi millisecondi *in vivo*) che media molteplici effetti biologici. In particolare, NO ha un ruolo importante nella regolazione del tono vascolare, possiede attività anti-trombotica e anti-infiammatoria e inibisce l'apoptosi delle cellule endoteliali. L'ossido nitrico viene sintetizzato a partire dall'aminoacido L-arginina, che viene convertito in citrullina da distinte tre isoforme di NO sintasi, localizzate in diversi distretti. La NO sintasi è costituita da un complesso di attività enzimatiche, intimamente connesse tra di loro, che consistono

in una monoossigenasi tetrabiopeterino-dipendente, una diidropteridina riduttasi NADPH-dipendente e una NADPH ossidasi (Nisticò et al., 1996).

Esistono tre isoforme distinte dell'enzima NO sintasi (NOS), prodotte a partire da tre geni diversi che presentano diversa localizzazione, regolazione, proprietà catalitiche e inibitorie (Alderton et al., 2001). L'isoforma neuronale (nNOS) è stata isolata per prima ed è espressa principalmente nel citosol delle cellule neuronali; l'isoforma inducibile (iNOS) è presente in diversi tessuti; l'isoforma endoteliale (eNOS) è espressa principalmente nelle cellule dell'endotelio vascolare, sia nel citosol che a livello delle membrane cellulari. eNOS e nNOS sono accumulate dal fatto di essere espresse costitutivamente e dal fatto che la loro attività è strettamente regolata dalla concentrazione intracellulare di ioni calcio, oltre che dall'associazione con la calmodulina. Al contrario, l'espressione di iNOS viene indotta da citochine e endotossine in condizioni infiammatorie; la sua attività è indipendente dalla concentrazione intracellulare di ioni calcio o dal complesso calcio-calmodulina (Govers e Oess, 2004).

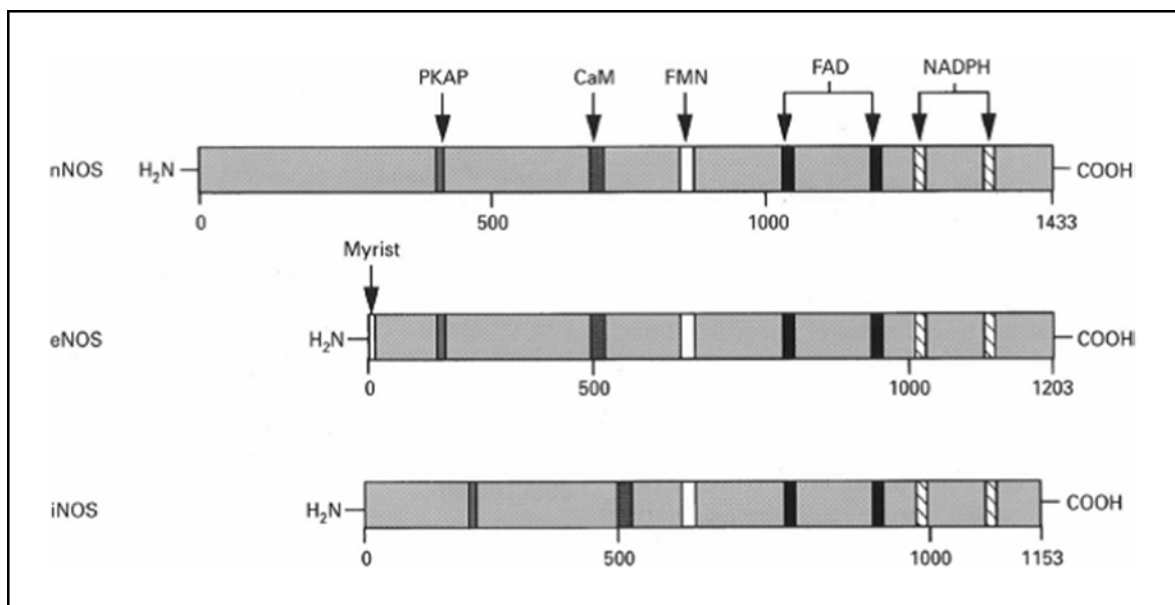


FIGURA 5 *Rappresentazione schematica della struttura primaria delle tre isoforme di NO sintasi.* Sono indicati i siti di fosforilazione (PKAP), di miristoilazione (Myrist), di interazione con la calmodulina (CaM) e di legame con i cofattori (FMN, FAD, NADPH) (da Knowles e Moncada, 1994).

La muscolatura liscia vasale rappresenta uno dei bersagli principali dell'azione biologica dell'ossido nitrico. Nell'endotelio vascolare l'isoforma più espressa è la eNOS, che produce NO in quantità basse, ma biologicamente rilevanti. Prodotto dalle cellule endoteliali, NO penetra per diffusione nelle cellule muscolari lisce dove attiva la guanilato ciclastasi; il conseguente aumento della concentrazione intracellulare di GMP ciclico ha effetti inibitori sulla contrazione delle cellule muscolari lisce ed è quindi responsabile del rilassamento della parete vascolare (Moncada e Higgs, 1993). eNOS viene attivata da diversi agonisti, che interagiscono con recettori di membrana accoppiati a proteine G, oppure da stimoli fisici quali lo *shear stress* (Shaul, 2002). eNOS, attraverso la produzione basale di NO, è un enzima chiave nella regolazione del tono vascolare; è implicato anche nei processi di angiogenesi, rimodellamento e adesione di leucociti e piastrine. Per tali motivi, la sua attività viene finemente regolata mediante molteplici meccanismi, che coinvolgono sia interazioni proteina-proteina sia modificazioni post-traduzionali dell'enzima stesso (Fulton et al., 2001).

L'interazione con la calmodulina è necessaria per l'attività enzimatica della eNOS; inoltre, a differenza dell'enzima inducibile, l'attività di eNOS è strettamente legata anche alla concentrazione intracellulare di ioni calcio (Ca^{2+}). Il legame tra eNOS e calmodulina facilita il trasferimento di elettroni NADPH-dipendente dal dominio con attività reduttasica a quello con attività ossigenasica dell'enzima (Alderton et al., 2001). La necessità dell'interazione con la calmodulina per l'attività della eNOS è stata indirettamente provata, utilizzando sia inibitori della calmodulina sia terreni di coltura privi di Ca^{2+} ; è anche stato dimostrato che eNOS co-immunoprecipita con la calmodulina e è stato ipotizzato che l'affinità di legame tra le due proteine sia modulata da variazioni di Ca^{2+} intracellulare (Russell et al., 2000; Fulton et al., 2001).

L'associazione tra eNOS e *heat shock protein 90* (hsp90) è in grado di aumentare l'attività dell'enzima di circa tre volte. La funzione principale di hsp90 è quella di assicurare il corretto ripiegamento tridimensionale di diverse proteine, come il recettore degli estrogeni; tuttavia, sembra che tale proteina sia coinvolta anche nelle vie di trasduzione del segnale in molti tipi cellulari (Pratt, 1997). Anche hsp90 co-immunoprecipita con eNOS; l'associazione tra le due proteine viene ulteriormente favorita da diversi stimoli in grado di indurre rilascio di NO, quali l'istamina, il VEGF, lo *shear stress* e l'estradiolo (Garcia-Cardena et al., 1998; Russell et al., 2000). È stato

suggerito che hsp90 agisca come modulatore allosterico della eNOS e che possa indurre un cambiamento conformazionale dell'enzima, portando ad un aumento della sua attività oppure ad una stabilizzazione del legame tra eNOS e calmodulina; in alternativa, hsp90 può agire da proteina di ancoraggio (*scaffold*) per il reclutamento di altre proteine regolatorie quali chinasi e fosfatasi (Fulton et al., 2001).

Altre proteine modulano negativamente l'attività di eNOS. Ad esempio, la caveolina-1, proteina strutturale tipica di particolari invaginazioni della membrana dette caveole, interagisce direttamente con eNOS e inibisce il rilascio di NO (Garcia-Cardena et al., 1997). Tale inibizione viene contrastata dalla calmodulina, che favorisce la dissociazione di eNOS dalla caveolina-1 (Michel et al., 1997). Più recentemente è stata identificata una *NOS inhibitor protein* (NOSIP), in grado di inibire il rilascio di NO indotto da ionomicina; ciò è dovuto alla traslocazione di eNOS dalla membrana plasmatica al compartimento intracellulare (Dedio et al., 2001).

Anche le modificazioni post-traduzionali della eNOS concorrono alla regolazione della sua attività. L'acilazione da parte dell'acido miristico e dell'acido palmitico è essenziale per la corretta localizzazione della eNOS nelle caveole nelle cellule endoteliali e quindi per la sua attività (Shaul, 2002). Un altro tipo di modificazione post-traduzionale che può modulare l'attività di eNOS è la fosforilazione da parte di chinasi coinvolte in diverse vie di trasduzione del segnale, quali Erk, RAF e Akt (Fulton et al., 2001; Boo e Jo, 2003). In particolare, è nota l'interazione diretta di eNOS con Akt, attivata dalla fosfatidilinositol 3-chinasi (PI3K) sia *in vitro* che *in vivo*; ciò porta alla fosforilazione dell'enzima in diversi siti, tra cui residui di serina, tirosina e treonina (Fulton et al., 1999; Michell et al., 1999). Akt può fosforilare eNOS in posizione serina 1177 (umana)/1179 (bovina) *in vitro* (Fulton et al., 1999; Michell et al., 1999). In particolare, la co-trasfezione di Akt e eNOS in cellule COS aumenta la fosforilazione di eNOS (Fulton et al., 1999). È anche interessante notare che stimoli quali VEGF e *shear stress* possono fosforilare e attivare Akt, che a sua volta fosforila eNOS in breve tempo (Fulton et al., 1999; Michell et al., 1999). La fosforilazione di eNOS in Ser 1177/1179 porta ad un incremento dell'attività dell'enzima di circa 15-20 volte; inoltre, la eNOS fosforilata risulta sensibile all'attivazione da parte di calmodulina e Ca^{2+} anche a basse concentrazioni (Gallis et al., 1999). Infatti, mutazioni della Ser 1177 in aspartato, che mima la carica negativa della fosforilazione, porta ad attivazione costitutiva della eNOS in presenza di bassi livelli di Ca^{2+} (Dimmeler et al., 1999); al

contrario, la mutazione in alanina, che non può essere fosforilata, impedisce l'attivazione di eNOS e di conseguenza il rilascio di NO (Fulton et al., 1999). Altre chinasi sono in grado di fosforilare eNOS in Ser 1177/1179: la protein chinasi A, la protein chinasi C e la chinasi attivata da AMP (Chen et al., 1999; Butt et al., 2000). Esistono anche altri siti di fosforilazione; per esempio, la fosforilazione in treonina 495 porta ad una ridotta attività catalitica di eNOS (Chen et al., 1999).

Estrogeni e modulazione genomica della eNOS

È stato dimostrato che lo stato ormonale influisce sulla vasodilatazione endotelio-dipendente e NO-mediata. Infatti, la capacità di risposta a vasodilatatori endotelio-dipendenti, quali la bradichinina, varia in modo parallelo alle fluttuazioni dei livelli plasmatici di estradiolo durante il ciclo mestruale, risultando maggiore durante la fase pre-ovulatoria in corrispondenza del picco plasmatico di estrogeni; al contrario, i livelli ormonali non variano la risposta a vasodilatatori endotelio-indipendenti, quali i composti donatori di NO (English et al., 1998; Chan et al., 2001). Inoltre, la diminuzione dei livelli circolanti di estrogeni, che si verifica in menopausa oppure in seguito ad ovariectomia, è correlata ad una ridotta vasodilatazione endotelio-dipendente, sebbene ancora una volta rimanga inalterata la capacità di risposta ai vasodilatatori endotelio-indipendenti (Pinto et al., 1997; Sorensen et al., 1998). In seguito alla terapia estrogenica, aumentano sia la concentrazione plasmatica di NO sia gli effetti dei vasodilatatori endotelio-dipendenti (Herrington et al., 1994; Best et al., 1998). Anche le risposte ad agenti vasocostrittori variano in relazione allo stato ormonale. L-NMMA, che inibisce la produzione di NO, induce una vasocostrizione maggiore nelle donne in età fertile rispetto alle donne in post-menopausa, evidenziando quindi una maggiore produzione di NO prima della menopausa; inoltre, la vasocostrizione indotta da antagonismo della eNOS aumenta in seguito a terapia estrogenica sostitutiva (Majmudar et al., 2000). In sostanza, è stata evidenziata una forte correlazione tra i livelli di estrogeni endogeni e la produzione endoteliale di NO nelle donne (Chambliss e Shaul, 2002).

L'esposizione a lungo termine all'estradiolo aumenta la capacità di produzione di NO anche in animali da esperimento. I livelli basali di NO sono superiori nell'aorta toracica di ratti femmine rispetto ai maschi e il trattamento con estrogeni ripristina la produzione di

NO nei ratti ovariectomizzati (Kauser et al., 1994; Bolego et al., 1997); in seguito a trattamento estrogenico *in vivo* aumenta la vasodilatazione endotelio-dipendente sia in vasi di capacitanza sia in vasi di resistenza in animali ovariectomizzati (Andersen et al., 1999; Sakuma et al., 2002; Moien-Afshari et al., 2003). Utilizzando topi *knockout* per il gene ER α , è stato dimostrata una correlazione tra i livelli di espressione di ER α e la produzione basale di NO (Rubanyi et al., 1997).

Gran parte di queste azioni sono state attribuite alla modulazione dell'espressione genica della eNOS da parte degli estrogeni; questa regolazione di tipo genomico porta, in ultima analisi, all'aumento della produzione della proteina e quindi anche del rilascio basale e/o stimolato di NO. La regolazione della eNOS da parte degli estrogeni comporta un incremento dei livelli di proteina attraverso meccanismi trascrizionali (Weiner et al., 1994). In particolare, esperimenti condotti in cellule endoteliali umane hanno dimostrato che la produzione di NO aumenta dopo un'esposizione di 8 ore all'estradiolo in concomitanza con un incremento dei livelli proteici di eNOS (Hishikawa et al., 1995); l'aumento dell'espressione di eNOS viene bloccato dal pre-trattamento delle cellule con antagonisti dei recettori degli estrogeni, quali tamoxifene e ICI 182,780 (Hayashi et al., 1995). L'aumento dei livelli di proteina nelle cellule endoteliali è correlato ad un incremento dei livelli di mRNA di eNOS (Kleinert et al., 1998). In animali da esperimento è stato osservato che i livelli di mRNA di eNOS aumentano durante la gravidanza e in seguito a trattamento con estrogeni in diversi tessuti (Weiner et al., 1994); anche l'espressione della proteina viene modulata positivamente durante la gravidanza (Jankowski et al., 2005). Inoltre, in diversi modelli sperimentali, è stata dimostrata una correlazione tra l'esposizione cronica all'estradiolo, l'abbondanza di recettori per gli estrogeni e l'espressione della eNOS (McNeill et al., 1999; Darblade et al., 2002). Grazie all'utilizzo di topi *knockout* per i recettori degli estrogeni è stato dimostrato che l'*upregulation* di eNOS nei microvasi cerebrali in seguito a trattamento con estrogeni è mediata solamente dall'isoforma recettoriale ER α (Geary et al., 2001).

Gli estrogeni sono anche in grado di modulare l'espressione di proteine che regolano l'attività di eNOS, come la caveolina-1 (Zhu e Smart, 2003). Studi condotti in animali ovariectomizzati hanno evidenziato una ridotta vasodilatazione endotelio-dipendente associata sia ad una diminuita espressione di eNOS che ad una *upregulation* di caveolina-1 (Pelligrino et al., 2000). Il trattamento estrogenico in questi animali è stato in grado non

solo di ripristinare la vasodilatazione endotelio-dipendente, ma anche di aumentare l'espressione di eNOS e ridurre quella di caveolina-1 (Pelligrino et al., 2000). L'estradiolo è quindi capace di modulare l'attività di eNOS, regolando in senso opposto l'espressione di eNOS e di caveolina-1. Questa proteina risulta di particolare interesse in quanto partecipa anche alla modulazione dell'attività di ER α , in quanto si lega al recettore, ne favorisce la traslocazione in diversi compartimenti cellulari e ne promuove l'attivazione ligando-indipendente (Schlegel et al., 2001; Kiss et al., 2005). Sono quindi molteplici i meccanismi di regolazione dell'attività di eNOS a livello genomico e sono in gran parte mediati dall'attivazione dell'isoforma recettoriale ER α .

Estrogeni e modulazione non genomica della eNOS

La vasodilatazione NO-dipendente è stata osservata sia *in vivo* che *in vitro* anche in seguito all'esposizione acuta agli estrogeni con un meccanismo che, pur essendo mediato dall'attivazione dei recettori per gli estrogeni, non implica variazioni dell'espressione genica (Chambliss e Shaul, 2002).

La somministrazione endovenosa di etinilestradiolo causa una drastica diminuzione del tono vasomotorio a livello coronarico nelle donne in post-menopausa (Reis et al., 1994). Inoltre, l'esposizione a breve termine a livelli fisiologici di estradiolo è in grado di aumentare la vasodilatazione endotelio-dipendente indotta da acetilcolina, lasciando inalterata quella endotelio-indipendente (Gilligan et al., 1994). L'effetto sulla vasodilatazione endotelio-dipendente viene antagonizzato dal trattamento con inibitori della NO sintasi, evidenziando come gli estrogeni possano modificare la produzione di NO anche dopo esposizione a breve termine (Guetta et al., 1997). Quindi, oltre a regolare in modo genomico l'espressione di eNOS, gli estrogeni sono in grado di aumentare la biodisponibilità di NO a breve termine in tempi non compatibili con un aumento dell'attività trascrizionale. Inoltre, la vasodilatazione indotta da estradiolo viene antagonizzata *in vitro* dal pre-trattamento con tamoxifene, evidenziando quindi il coinvolgimento dei recettori degli estrogeni in questi effetti rapidi (Nechmad et al., 1998).

Anche in animali da esperimento l'estradiolo è in grado di indurre vasodilatazione endotelio-dipendente *in vivo*; questo effetto è assente in animali pre-trattati con L-NAME, inibitore della NO sintasi, oppure in topi *knockout* per il gene della eNOS (Guo et al.,

2005). Numerosi studi condotti in arterie isolate da animali da esperimento hanno dimostrato che l'estradiolo induce vasodilatazione a breve termine in modo NO- e endotelio-dipendente (Collins et al., 1994; Bucci et al., 2002). Inoltre, esperimenti condotti su cellule endoteliali in coltura hanno evidenziato come l'estradiolo sia in grado di indurre entro 5 minuti l'attivazione di eNOS, misurata come conversione di [H^3] L-arginina in [H^3] L-citrullina (Chen et al., 1999). Questi effetti, *ex vivo* e *in vitro*, vengono inibiti dalla pre-incubazione dei preparati vascolari o delle colture cellulari con l'antagonista non selettivo dei recettori degli estrogeni ICI 182,780 (Chen et al., 1999; Kim et al., 1999; Bucci et al., 2002). A questo proposito, Chen e collaboratori (1999) hanno dimostrato che l'isoforma recettoriale ER α è sicuramente implicata nell'attivazione a breve termine di eNOS in quanto tale effetto viene accentuato in cellule endoteliali in cui ER α è sovraespresso ed è presente in cellule COS-7 solo dopo la co-trasfezione di ER α

I recettori responsabili degli effetti a breve termine degli estrogeni sarebbero localizzati nelle *caveolae* (Kim et al., 1999; Russell et al., 2000; Razandi et al., 2004). In queste strutture ER α sarebbe in grado di interagire con eNOS, inducendone la fosforilazione e l'attivazione tramite molteplici sistemi di trasduzione del segnale, che comprendono la via delle MAPK e della PI-3K. Infatti, l'inibizione specifica di MEK con PD98059 blocca l'attivazione di eNOS indotta dall'estradiolo in cellule endoteliali di origine ovina (Chen et al., 1999). Ci sono anche prove che indicano il coinvolgimento della via della PI-3K: l'inibitore specifico LY294002, è in grado di bloccare l'attivazione rapida della eNOS indotta dall'estradiolo in cellule endoteliali umane (Simoncini et al., 2002). In seguito all'esposizione cronica ed acuta agli estrogeni aumenta l'attivazione di Akt, che modifica lo stato di fosforilazione di eNOS, incrementandone a sua volta l'attività (Florian et al., 2004). In particolare, è stato riportato che l'estradiolo induce fosforilazione di eNOS in posizione Ser 1177, aumentando l'attività dell'enzima; questo effetto non è presente in cellule che non esprimono Akt. Inoltre, è stato dimostrato che ER α interagisce direttamente con la subunità p85 di PI-3K, causando l'attivazione di Akt (Hisamoto et al., 2001). L'estradiolo è anche in grado di modulare le concentrazioni intracellulari di Ca $^{2+}$ nelle cellule endoteliali e l'attivazione di Akt indotta da estrogeni risulta Ca $^{2+}$ -dipendente (Hisamoto et al., 2001). Infine, gli estrogeni controllano l'interazione di eNOS con hsp90, proteina regolatoria capace di aumentare l'attività dell'enzima; infatti, l'estradiolo favorisce l'associazione tra le due proteine, che viene antagonizzata in presenza di ICI

182,780 (Russell et al., 2000; Garcia-Cardena et al., 1998). La geldanamicina, inibitore di hsp90, è in grado di prevenire il rilascio di NO e la produzione di cGMP stimolati dall'estradiolo (Russell et al., 2000); inoltre, la pre-incubazione con geldanamicina inibisce la vasodilatazione endotelio-dipendente indotta dall'estradiolo nell'aorta di ratto (Bucci et al., 2002). Sono quindi molteplici i meccanismi attraverso i quali gli estrogeni modulano la rapida attivazione di eNOS e la conseguente liberazione di NO; è interessante notare che almeno alcuni di questi meccanismi, come la fosforilazione mediata da Akt, vengono regolati contemporaneamente a livello genomico e non genomico, mettendo in evidenza un controllo integrato delle azioni degli estrogeni (Pedram et al., 2002; Stirone et al., 2005).

vii. Effetti cardiovascolari della terapia ormonale sostitutiva

La terapia ormonale sostitutiva (HRT, *hormonal replacement therapy*) viene prescritta alle donne allo scopo di alleviare i sintomi vasomotori della menopausa e di prevenire l'osteoporosi.

Più controversi sono i dati riguardanti gli effetti cardiovascolari della terapia ormonale sostitutiva. Infatti, mentre i dati sperimentali e gli studi epidemiologici hanno fornito prove convincenti degli effetti protettivi dell'estradiolo sul sistema cardiovascolare, ciò non è stato completamente dimostrato per quanto riguarda l'utilizzo di HRT nelle donne in post-menopausa (Mendelsohn e Karas, 1999; Cignarella et al., 2001; Mosca et al., 2001). Studi osservazionali ed epidemiologici hanno documentato che la terapia ormonale sostitutiva ha effetti protettivi a livello cardiovascolare, riducendo il rischio di patologie coronariche e aterosclerosi nelle donne in menopausa. Gli studi clinici d'intervento non hanno invece rilevato benefici della terapia estrogenica sul sistema cardiovascolare; al contrario sono emersi dati che indicano un aumento dei rischi almeno nel periodo iniziale della terapia (Mosca et al., 2001; Dubey et al., 2004).

Studi osservazionali

Nei Paesi occidentali le malattie cardiovascolari rappresentano la maggior causa di morte sia per gli uomini che per le donne; tuttavia le donne sono sostanzialmente protette fino all'età della menopausa. Infatti, fino a 65 anni la prevalenza di patologie

coronariche è nettamente superiore negli uomini rispetto alle donne, sebbene si registri un aumento in entrambi i sessi con l'avanzare dell'età (Barrett-Connor, 1997). Inoltre, la mortalità per cause cardiovascolari è più frequente dopo la menopausa (Colditz et al., 1987). Da studi autoptici è emerso che le donne sottoposte ad ovariectomia bilaterale vanno incontro ad un maggiore rischio di malattie cardiovascolari, che l'utilizzo di HRT è in grado di diminuire questo rischio (Colditz et al., 1987). Anche nelle donne in cui la menopausa si instaura precocemente il rischio di patologie coronariche aumenta, mentre l'uso di HRT lo riduce (Hu et al., 1999).

Studi osservazionali hanno dimostrato che l'utilizzo di HRT in menopausa è correlato alla riduzione del rischio di patologie cardiovascolari e alla diminuzione della mortalità associata ad esse (Dubey et al., 2004). Una metanalisi che comprende studi osservazionali condotti tra il 1976 e il 1996 mostra come il rischio relativo di patologie coronariche sia complessivamente ridotto nelle donne trattate con HRT rispetto a coloro che non l'hanno mai utilizzata (Barrett-Connor e Grady, 1998).

Lo studio NHS (*Nurses' Health Study*), che ha coinvolto più di 100000 donne di età compresa tra i 30 e i 55 con un *follow-up* di 20 anni, ha messo in luce una riduzione del rischio complessivo di patologie coronariche nelle donne che utilizzano HRT; dopo aver normalizzato i dati per età e fattori di rischio, è emersa una riduzione del rischio relativo di circa il 40%. È interessante notare che i benefici maggiori sono stati evidenziati dopo un utilizzo a breve termine di HRT (Grodstein et al., 2000).

Studi clinici d'intervento

Lo studio HERS (*Heart and Estrogen/progestin Replacement Study*) è stato disegnato per valutare gli effetti della terapia ormonale sul sistema cardiovascolare di donne in menopausa con patologie coronariche pre-esistenti. In questo studio sono state coinvolte 2763 donne con un'età media di 67 anni, a cui sono stati somministrati estrogeni coniugati equini (CEE) in associazione con medrossiprogesterone acetato (MPA) oppure placebo. Dopo più di 6.8 anni di follow-up, non sono stati evidenziati effetti protettivi della terapia ormonale sostitutiva in termini di riduzione del rischio di infarto del miocardio o di morte. È emerso invece un aumento del 52% per quanto riguarda gli eventi cardiovascolari durante il primo anno di trattamento (Hulley et al., 1998; Grady et al.,

2002). L'HERS è stato quindi il primo importante studio clinico randomizzato a mettere in dubbio gli effetti protettivi di HRT a livello cardiovascolare; tuttavia, è stato evidenziato che questo studio riguardava la prevenzione secondaria di eventi cardiovascolari in donne con patologie coronariche pre-esistenti, che rappresentano un ulteriore fattore di rischio.

Un altro importante studio clinico, il WHI (*Women's Health Initiative*), ha interessato donne "sane" con un'età media di 63 anni, a cui sono stati somministrati CEE associati con MPA, CEE da soli oppure placebo. Lo studio è stato interrotto anzitempo a causa dell'aumentata incidenza di cancro alla mammella nelle donne trattate con estrogeni e progestinici. Nelle donne trattate con CEE e MPA è stato anche osservato un incremento del rischio di infarto del miocardio e ictus. Inoltre, nelle donne trattate con estrogeni non sono stati osservati benefici cardiovascolari rispetto al gruppo controllo; è stata invece notata una maggiore incidenza di ictus e di trombosi venosa (Writing Group for the WHI, 2002). Pertanto la terapia ormonale sostitutiva non è risultata efficace nemmeno nella prevenzione primaria degli eventi cardiovascolari.

Fattori responsabili del fallimento della terapia ormonale sostitutiva

I risultati contrastanti ottenuti dagli studi clinici d'intervento rispetto alle indicazioni fornire dagli studi osservazionali e dai lavori sperimentali possono essere spiegati in diversi modi. Per esempio, esistono prove sperimentali che la dose e la modalità di somministrazione della terapia ormonale possono influire sui suoi effetti; più dubbio è il ruolo dei progestinici utilizzati in associazione. Oltre a ciò il tipo di estrogeno utilizzato e la selettività recettoriale di quest'ultimo sono sicuramente di fondamentale importanza per determinare gli effetti cardiovascolari della terapia. Infine, è plausibile che un intervento farmacologico precoce, quando la funzionalità vascolare non è ancora alterata, potrebbe risultare più efficace nel determinare effetti protettivi sul sistema cardiovascolare.

Via di somministrazione e dosaggio. Evidenze sperimentali indicano che il tipo, la dose e il metodo di somministrazione di ormoni esogeni possono modificare o annullare gli effetti della terapia ormonale sostitutiva. Per esempio, gli estrogeni sono più efficaci nel normalizzare il quadro lipidico quando vengono somministrati per via orale (The Writing Group for the PEPI Trial, 1995); inoltre, è stato evidenziato come il rapporto tra fattori vasodilatatori (NO e prostaciclina) e vasocostrittori (endotelina-1) aumenti solo in seguito

a somministrazione di estradiolo *per os* (Maffei et al., 2006). Al contrario, se somministrati per via orale, ma non per via transdermica, gli estrogeni aumentano i livelli di proteina C-reattiva e di IL-6, favorendo l'instaurarsi di uno stato pro-infiammatorio (Davison e Davis, 2003). Somministrando gli estrogeni per via transdermica, si evitano anche eccessive fluttuazioni dei livelli plasmatici di ormoni e sono necessari dosaggi minori, perché si evita il metabolismo epatico (Turgeon et al., 2006; Modena et al., 2005).

A questo proposito, è importante ricordare che la somministrazione *per os* di dosi bassissime di estradiolo (0.25 mg vs 1 mg di terapia *standard*) è in grado di ridurre i livelli di proteina C-reattiva (Birge, 2006). Un altro lavoro riporta che l'estradiolo a bassi dosaggi riduce l'espressione di molecole di adesione e i livelli di trigliceridi (Goudev et al., 2002). Infine, CEE somministrati al dosaggio di 0.3 mg (rispetto ad un dosaggio *standard* di 0.625 mg) mantengono gli effetti protettivi sulle lipoproteine plasmatiche e sulla vasodilatazione, senza alterare i livelli di proteina C-reattiva (Koh et al., 2004).

Associazione con progestinici. Un'altra variabile è costituita dall'associazione con progestinici, che vengono utilizzati per ridurre il rischio di tumori all'endometrio. Alcuni progestinici possono indurre *downregulation* dei recettori ER α ed ER β , contrastando i benefici dell'estrogeno, come nel caso del medrossiprogesterone acetato (MPA) (Turgeon et al., 2006; Grodstein et al., 2003). Nello studio PEPI è stato osservato che la terapia estrogenica ha effetti benefici sulle lipoproteine plasmatiche, che però vengono attenuati dall'associazione con MPA (The Writing Group or the PEPI trial, 1995). Nello studio NHS è emerso, invece, un rischio di patologie coronariche simile per coloro che utilizzavano CEE oppure CEE associati a MPA (Grodstein et al., 2000). Altrettanto contrastanti sono i dati che riguardano la vasodilatazione endotelio-dipendente, che in alcuni studi non viene influenzata e in altri viene ridotta dal progestinico (Dubey et al., 2004). È perciò difficile definire il ruolo dei progestinici, e in particolare di MPA, sugli effetti cardiovascolari della terapia ormonale sostitutiva.

Tipo di estrogeni utilizzati in terapia. Gli estrogeni equini coniugati utilizzati negli studi clinici sono costituiti da un miscuglio di composti a composizione variabile, che però non comprendono l'estradiolo; perciò la terapia con CEE non supplisce alla mancanza fisiologica di estradiolo. Infatti, i composti che fanno parte dei CEE differiscono

dall'estradiolo per quanto riguarda le proprietà farmacologiche, che possono in ultima analisi influenzare gli effetti cardiovascolari del trattamento (Dubey et al., 2004; Turgeon et al., 2006). I CEE hanno diverse affinità di legame, selettività recettoriale e attività da agonisti; poiché le azioni biologiche degli estrogeni sono in parte mediate dall'interazione con i loro recettori, i CEE non possono mimare in modo completo gli effetti cardiovascolari dell'estradiolo. Al contrario degli studi che prevedevano la somministrazione di CEE, dove non osservavano effetti protettivi a livello cardiovascolare, nello studio clinico EPAT, la somministrazione di estradiolo ha ridotto la progressione dell'aterosclerosi nelle donne in post-menopausa (Hodis et al., 2001), evidenziando quindi che il tipo di estrogeno utilizzato in terapia può influenzare gli effetti osservati.

Selettività recettoriale. Le due isoforme recettoriali possono contribuire in modo diverso agli effetti complessivi degli estrogeni utilizzati in terapia. La maggior parte delle azioni protettive a livello cardiovascolare è infatti mediata dall'attivazione di ER α . L'attivazione di questo recettore promuove il processo di ri-endotelizzazione vascolare e inibisce la proliferazione delle cellule muscolari lisce (Brouchet et al., 2001; Pare et al., 2002); riduce la sintesi di LDL circolanti a livello epatico, aumentando invece quella delle HDL (Mendelsohn e Karas, 2005); rallenta la progressione dell'aterosclerosi e attiva meccanismi di protezione da danni vascolari (Booth et al., 2005; Bolego et al., 2006; Turgeon et al., 2006); ha effetti anti-infiammatori a livello cerebrale (Vegeto et al., 2004); regola la pressione arteriosa, stimolando la produzione di prostaciclina ed NO (Darblade et al., 2002; Geary et al., 2001). ER β modula l'attività di ER α in diversi tessuti e spesso i due recettori mediano effetti contrastanti (Gustafsson, 2003). A causa del diverso coinvolgimento delle due isoforme recettoriali nell'indurre protezione vascolare, sarebbe auspicabile un intervento farmacologico con agenti selettivi per ER α .

Fin dalla scoperta di un secondo recettore degli estrogeni, si è cercato di sintetizzare composti in grado di interagire in modo specifico con l'una o l'altra delle isoforme recettoriali. Finalmente, negli ultimi anni si sono resi disponibili sia agonisti che antagonisti selettivi per ER α o ER β . Tra i composti di sintesi che hanno presentato selettività maggiore per ER β , il più studiato *in vivo* e *in vitro* è il DPN (2,3-bis(4-idrossifenil)propionitrile), un potente agonista che presenta un'affinità di legame circa 70

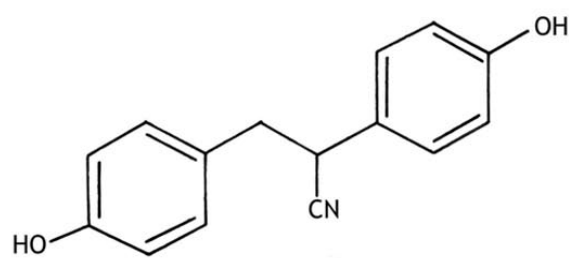
volte superiore per ER β rispetto a ER α (Harrington et al., 2003). Il composto ER β -selettivo DPN è allo studio per i suoi possibili effetti neuroprotettivi (Harris et al., 2007).

Per quanto riguarda ER α , sono stati sintetizzati e parzialmente caratterizzati *in vivo* due agonisti potenti e altamente selettivi; questi composti sono il PPT (1,3,5-(4-idrossifenil)-4-propil-1H-pirazolo), 400 volte più selettivo per ER α rispetto a ER β , e il 16 α -LE2, 250 volte più selettivo (Sun et al., 1999; Hillisch et al., 2004). Introducendo una catena laterale basica, sono stati sintetizzati anche antagonisti selettivi per ER α , come MPP (1,3-bis(4-idrossifenil)-4-metil-5-[4-(2-piperidiniletossi)fenol]-1H-pirazolo) (Sun et al., 2002). Il PPT è già stato valutato *in vivo* su animali ovariectomizzati, dove ha mostrato effetti simili a quelli dell'estradiolo: aumento della densità ossea e del trofismo dell'utero, riduzione del peso corporeo e dei livelli plasmatici di LDL (Harris et al., 2002). A livello cardiovascolare, sia PPT che 16 α -LE2 hanno mostrato effetti cardioprotettivi *in vitro* e entrambi sono stati in grado di indurre vasodilatazione, anche se a concentrazioni molto elevate (Widder et al., 2003; Montgomery et al., 2003; Booth et al., 2005; Peltzer et al., 2005).

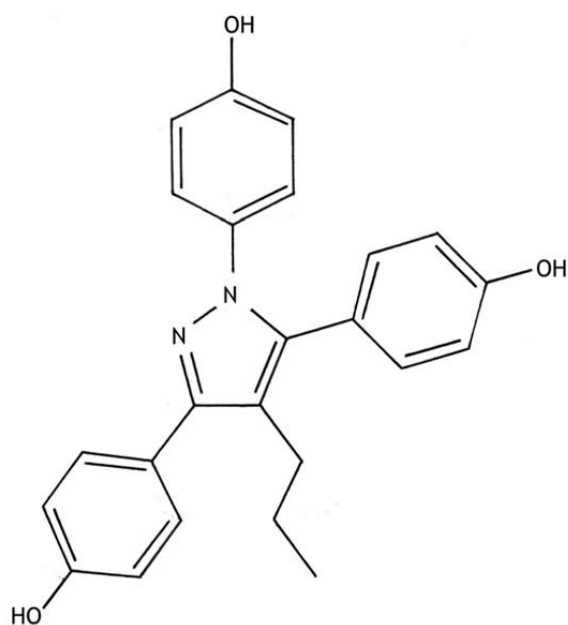
I composti selettivi per le due isoforme sono in grado di indurre cambiamenti conformazionali specifici nel recettore, portando all'esposizione di siti di interazione con co-regolatori diversi da quelli indotti dall'estradiolo (Kraichely et al., 2000).

Età e tempo di inizio della terapia. L'efficacia della terapia estrogenica sostitutiva dipende anche dalla tempestività di inizio del trattamento (Dubey et al., 2005). Tale concetto è stato sviluppato a partire dalle metanalisi di studi clinici precedenti, che hanno messo in luce come i benefici della terapia estrogenica dipendano almeno in parte dall'età e dal tempo intercorso dall'inizio della menopausa (Grodstein et al., 2003). È stato evidenziato come sia nello studio clinico HERS sia nel WHI l'età media di inizio della terapia fosse molto più elevata rispetto a quella degli studi osservazionali; negli studi clinici le pazienti erano in post-menopausa da almeno un decennio. Al contrario, quando la terapia estrogenica sostitutiva viene intrapresa subito dopo l'inizio della menopausa, emerge una riduzione complessiva del rischio cardiovascolare (Grodstein et al., 2006). Nello studio NHS, che ha fornito prove degli effetti benefici di HRT e livello cardiovascolare, l'80% delle donne aveva iniziato la terapia entro 2 anni dalla menopausa; negli studi HERS e WHI, data l'età media, è probabile che le partecipanti fossero in

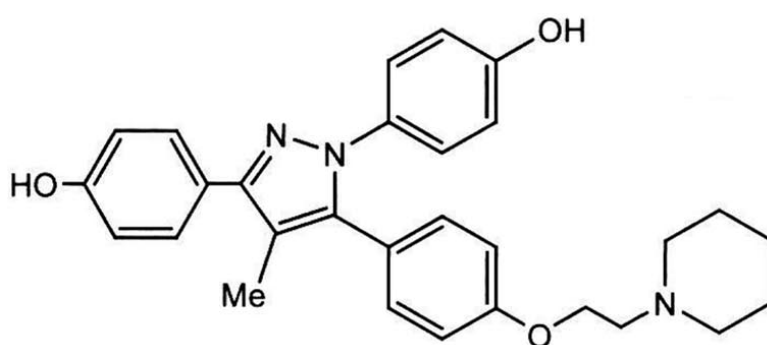
menopausa da oltre dieci anni (Hulley et al., 1998; Grodstein et al., 2000; Writing Group for the WHI, 2002) È stato quindi suggerito che la terapia ormonale risulti efficace se iniziata in presenza di una normale funzionalità vascolare, mentre un endotelio danneggiato potrebbe non essere più sensibile agli effetti vasoprotettivi degli estrogeni (Mendelsohn e Karas, 2005; Turgeon et al., 2006). Ad esempio, studi condotti in primati ovariectomizzati hanno dimostrato che la progressione della placca aterosclerotica è rallentata solo se il trattamento sostitutivo con estrogeni inizia precocemente (Clarkson et al., 2005). Sulla base dei dati ottenuti nei primati, un ritardo di 6 anni nell'inizio della terapia sarebbe sufficiente a ridurre gli effetti protettivi degli estrogeni. Analogamente, i pochi studi clinici randomizzati che hanno preso in considerazione donne relativamente giovani hanno confermato che la terapia estrogenica rallenta lo sviluppo e la calcificazione della placca (Clarkson et al., 2005). Un recente studio retrospettivo ha concluso che, probabilmente, la scelta dell'inizio della terapia ha un impatto sul rischio cardiovascolare (Grodstein et al., 2006). Un concetto emergente per spiegare i risultati negativi dei *trial* clinici con la terapia ormonale sostitutiva è la variazione ciclica o permanente del profilo di ER a livello vasale in pre- e post-menopausa (Stirone et al., 2003). Questa teoria, la cosiddetta *timing hypothesis*, propone che il successo del trattamento con agenti estrogenici in menopausa sia correlato alla tempestività d'inizio del medesimo (Mendelsohn e Karas, 2005). Per valutare l'efficacia della terapia ormonale in relazione all'età di inizio del trattamento sono attualmente in corso due studi clinici, il *Kronos Early Estrogen Prevention Study* (KEEPS) e il *Early versus Late Intervention Trial with Estradiol* (ELITE) (Harman et al., 2005; Mendelsohn e Karas, 2005).



DPN (2,3-bis(4-idrossifenil)propionitrile)



PPT (1,3,5-(4-idrossifenil)-4-propil-1H-pirazolo)



MPP (1,3-bis(4-idrossifenil)-4-metil-5-[4-(2-piperidiniletossi)fenol]-1H-pirazolo)

FIGURA 6 Agonisti ed antagonisti selettivi per i recettori degli estrogeni. DPN, agonista ER β -selettivo; PPT, agonista ER α -selettivo; MPP, antagonista ER α -selettivo.

III. SCOPO DEL LAVORO

In questa tesi sono stati inizialmente approfonditi gli effetti a breve termine indotti dall'agonista ER α -selettivo PPT e dall'agonista ER β -selettivo DPN sulle risposte funzionali di anelli di aorta toracica provenienti da ratti femmine intatti ed ovariectomizzati.

La seconda parte del lavoro è stata volta a determinare l'influenza della durata della deprivazione estrogenica sugli effetti a breve termine del 17 β -estradiolo e dell'agonista ER α -selettivo PPT in preparati vascolari (aorta e arteria mesenterica) di ratti ovariectomizzati e sottoposti a trattamento con estrogeni oppure con placebo dopo 1, 4 e 8 mesi dall'operazione, valutando contemporaneamente nei rispettivi lisati endoteliali l'espressione di proteine coinvolte nella vasodilatazione indotta da estrogeni: l'enzima NO sintasi endoteliale (eNOS), la sua forma fosforilata (peNOS) e il recettore α degli estrogeni (ER α).

IV. MATERIALI E METODI

i. Condizioni di stabulazione degli animali

In questa ricerca sono stati utilizzati ratti Sprague-Dawley di sesso femminile, aventi un peso corporeo di 200-225 g all'arrivo (Charles River Italia). Gli animali sono sempre stati alimentati con mangime standard ed acqua *ad libitum*.

Prima dell'inizio dei trattamenti, gli animali sono stati stabulati per circa una settimana in condizioni controllate di temperatura (22 ± 1 °C) e di umidità ($60\% \pm 5\%$); la durata del ciclo luce/buio è stata fissata in 12 ore.

Ai fini della pianificazione degli esperimenti, gli animali sono stati suddivisi nei seguenti gruppi: ratti intatti, ratti ovariectomizzati (OVX), ratti ovariectomizzati trattati con estrogeno (OVX + E₂). Gli animali OVX ed OVX + E₂ sono stati ulteriormente suddivisi in relazione alla durata della deprivazione estrogenica prima dell'inizio del trattamento *in vivo*.

ii. Ovariectomia e trattamento estrogenico sostitutivo

Gli animali sono stati anestetizzati con chetamina (Imalgene[®], 40 mg/Kg i.p.) e xilazina (Rompum[®], 20 mg/Kg i.p.) e sottoposti ad ovariectomia bilaterale. Sono state praticate due incisioni dorsali, il tessuto adiposo sottocutaneo è stato staccato dalla cute ed aperto, quindi il tessuto muscolare sottostante è stato perforato con una pinzetta; infine, l'ovaio è stato isolato ed asportato. La muscolatura e la cute sono state poi richiuse con filo da sutura sterile non riassorbibile (n° 4.0).

Dopo un mese dall'operazione, gli animali ovariectomizzati hanno ricevuto un impianto sottocutaneo di due capsule di silicone (diametro interno: 1.6 mm, diametro esterno: 3.1 mm; Dow Corning) contenenti 25 µl di veicolo (olio di arachidi) oppure di 17β-estradiolo (0.86 mmol/L, corrispondenti a 5.87 µg in ciascuna capsula) per 5 giorni, al termine dei quali gli animali sono stati sacrificati per asfissia da CO₂. In seguito a questo trattamento estrogenico le concentrazioni plasmatiche di 17β-estradiolo risultano paragonabili ai livelli normalmente osservati nel ratto durante il proestro (Lapchack, 1991).

In un altro set di esperimenti, gli animali ovariectomizzati hanno ricevuto gli impianti sottocutanei di veicolo oppure di 17β -estradiolo, sempre per 5 giorni, dopo 1, 4 oppure 8 mesi dall'operazione, in modo da riprodurre diversi tempi di privazione estrogenica. In tutti i gruppi sperimentali, gli uteri sono stati prelevati e pesati, per valutarne il trofismo, come controllo preliminare dell'avvenuto rimpiazzo estrogenico.

iii. Prelievo e preparazione dei vasi

Gli esperimenti sono stati condotti anelli di aorta toracica provenienti da ratti intatti ed ovariectomizzati; negli animali ovariectomizzati è stata prelevata anche l'arteria mesenterica superiore. Dopo laparotomia, i vasi sono stati isolati, prelevati e posti immediatamente in un becker contenente una soluzione di Krebs con la seguente composizione (mM): NaCl 118, KCl 4.7, $\text{CaCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 2.5, NaHCO_3 25, KH_2PO_4 1.2, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 1.1, glucosio 5.5, pH 7.4 a temperatura ambiente. Dopo un'accurata pulizia delle arterie, sono stati ottenuti segmenti lunghi circa 5 mm. Quando il protocollo sperimentale lo richiedeva, l'endotelio è stato rimosso mediante delicato raschiamento del lume delle arterie.

I preparati sono stati sospesi tra due filamenti di tungsteno e immersi in bagni per organi isolati da 5 ml, contenenti la soluzione di Krebs ossigenata con una miscela di carbossigeno (95% O_2 e 5% CO_2) e mantenuta alla temperatura costante di 37 °C. Un'estremità dei tessuti è stata fissata ad un gancio posto sul fondo del bagnetto, mentre l'altra estremità è stata legata per mezzo di un filo di seta ad un trasduttore isometrico Fort 10 (World Precision Instruments), connesso ad un sistema di registrazione digitale PowerLab 8SP (ADInstruments) ed ad un computer IBM compatibile (Olidata). Per l'acquisizione dei dati è stato utilizzato il programma Chart v4.2.4 (ADInstruments). Per ottenere una risposta ottimale, i preparati sono stati sottoposti ad un tiraggio iniziale di 1.5 g per gli anelli di aorta e di 0.5 g per i segmenti di arteria mesenterica.

iv. Esperimenti *ex vivo*

Dopo un periodo di stabilizzazione di 30 minuti, i tessuti sono stati contratti con noradrenalina (10 μM) fino ad ottenere una risposta massimale, lavati più volte con

Krebs fresco e lasciati a riposo per altri 30 minuti. Dopo precontrazione dei tessuti con noradrenalina (EC_{60} : 0.1 μ M per l'aorta, 0.3 μ M per l'arteria mesenterica) fino ad un *plateau* stabile, sono state ottenute curve cumulative concentrazione-risposta per 17 β -estradiolo, PPT (agonista ER α -selettivo) e DPN (agonista ER β -selettivo) nell'intervallo di concentrazioni 0.01 pM - 0.1 μ M. Tale intervallo è stato selezionato in quanto comprende le concentrazioni fisiologiche di 17 β -estradiolo *in vivo* e contemporaneamente garantisce la selettività di PPT e DPN verso i recettori ER α e ER β . Dopo ogni curva, il Krebs è stato sostituito con soluzione fresca ed il tessuto è stato lasciato riequilibrare per 30 minuti. L'effetto del solvente è stato valutato mediante aggiunte cumulative di etanolo sui tessuti precontratti. La funzionalità endoteliale è stata verificata in base alla risposta indotta dall'acetilcolina (1 nM - 10 μ M).

Al fine di valutare il ruolo dell'endotelio nelle risposte vascolari osservate, sono stati condotti esperimenti specifici in assenza di endotelio oppure dopo incubazione con l'inibitore della NO sintasi L-NAME (3 μ M); in aggiunta, abbiamo verificato il coinvolgimento dei recettori degli estrogeni mediante incubazione dei tessuti con l'antagonista non selettivo ICI 182,780 (0.1-1 μ M) e l'antagonista ER α -selettivo MPP (1-10 μ M).

Alla fine di ogni esperimento i tessuti sono stati asciugati e pesati, allo scopo di determinare la forza di contrazione in rapporto al peso di ogni singolo preparato (mN/mg di tessuto). Questa metodica ha permesso di normalizzare le forze di contrazione sviluppate da tessuti con peso differente. Le risposte rilassanti sono state espresse come percentuale della contrazione residua di noradrenalina.

v. Agenti farmacologici utilizzati

Acetilcolina (ACh), noradrenalina (NA), N^o-nitro-L-arginina metil estere (L-NAME) e 17 β -estradiolo (E₂) sono stati acquistati presso la ditta Sigma (Milano). PPT (1,3,5-(4-idrossifenil)-4-propil-1H-pirazolo), DPN (2,3-bis(4-idrossifenil)propionitrile), ICI 182,780 (7 α ,17 β -[9[(4,4,5,5,5-pentafluoropentil)sulfinil]nonil]estra-1,3,5(10)-triene-3,17-diolo) e MPP (1,3-bis(4-idrossifenil)-4-metil-5-[4-(2-piperidiniletossi)fenol]-1H-pirazolo) sono stati acquistati presso la ditta Tocris (Bristol, UK).

Le soluzioni madre di acetilcolina e noradrenalina (0.1 M) sono state ottenute in acido ascorbico (0.1 mM) e conservate a 4 °C. L-NAME e MPP sono stati solubilizzati in acqua distillata alla concentrazione di 10 mM. Le opportune diluizioni sono state ottenute in acqua distillata al momento dell'esperimento.

Le soluzioni madre di E₂, PPT, DPN e ICI 182,780 (10 mM) sono state ottenute in etanolo assoluto e conservate a -20 °C; ulteriori diluizioni sono state ottenute in etanolo fino a 1 mM e successivamente in acqua distillata. La concentrazione finale di etanolo nei bagnetti non superava lo 0.01%.

vi. Colture cellulari

Le cellule endoteliali di aorta di ratto (RAEC) sono state ottenute mediante blanda tripsinizzazione secondo la metodica di Ding e Vaziri (1998), coltivate a confluenza ed utilizzate al primo passaggio. Le RAEC sono state caratterizzate in base alla loro morfologia e all'espressione di marcatori tipici delle cellule endoteliali (eNOS).

Per l'analisi proteica, le cellule endoteliali di aorta di ratto sono state lavate in PBS (*phosphate-buffered saline*) ed estratte in tampone di lisi (Idel et al, 2002).

vii. Isolamento dell'endotelio

L'aorta toracica è stata prelevata dai ratti ovariectomizzati e subito immersa in un becker contenente PBS fresco. Successivamente l'aorta è stata aperta a libro con l'endotelio rivolto verso l'alto. Lo strato endoteliale è stato quindi asportato mediante delicato raschiamento del lume del vaso. Il preparato ottenuto da due aorte è stato risospeso in una provetta eppendorf contenente 0.5 ml di PBS. Il contenuto è stato centrifugato a 8000 rpm per 10 minuti ed il surnatante è stato eliminato.

Per gli esperimenti di *Western blot*, il *pellet* è stato estratto in 30 µl di tampone di lisi e conservato a -80°C fino al momento dell'analisi proteica (Idel et al, 2002). Per gli esperimenti di *real time PCR*, il *pellet* è stato risospeso in una soluzione di lisi dell'RNA e conservato a -80°C fino al momento dell'utilizzo.

viii. Analisi Western Blot

Dopo 4 cicli di congelamento-scongelo, i lisati proteici sono stati bolliti per 5 minuti e centrifugati a 13200 rpm per 15 minuti. Il contenuto totale di proteine è stato determinato mediante dosaggio spettrofotometrico di Lowry (1951). Un volume adeguato di lisato proteico è stato caricato su gel di poliacrilammide al 10% e le proteine sono state separate tramite SDS-PAGE.

Al termine della corsa elettroforetica le proteine sono state trasferite su membrane ECL Hybond (GE HealthCare) per chemiluminescenza. L'uniformità del caricamento delle proteine e l'efficienza del trasferimento sono state verificate mediante colorazione di Ponceau.

Successivamente le membrane sono state incubate in TBS contenente 0.1% Tween e 5% di latte scremato in polvere (Bio-Rad), al fine di saturare i siti di legame aspecifici, quindi sono state incubate *overnight* con gli opportuni anticorpi primari (anti-eNOS 1:800, Santa Cruz Biotechnology Inc; anti-peNOS specifico per pS1177 1:1000, BD Transduction Laboratories; anti-ER α 1:800, Santa Cruz Biotechnology Inc; anti-ER β 1:1000, Calbiochem) a 4 °C. Le membrane sono state ripetutamente lavate con TBS-Tween e successivamente incubate con gli opportuni anticorpi secondari coniugati con HRP (*horse-radish peroxidase*) per 1 h a temperatura ambiente. Dopo un'ulteriore serie di lavaggi con TBS-Tween, il segnale è stato rivelato su lastre fotografiche impressionate tramite chemiluminescenza (GE HealthCare).

Le proteine ricombinanti umane ER α ed ER β (Calbiochem) sono state utilizzate come controllo positivo. Le cellule endoteliali di vena ombelicale umana (HUVEC) e le cellule muscolari lisce di aorta di ratto (RSMC) sono state usate rispettivamente come controllo positivo e controllo negativo dell'espressione di eNOS e peNOS.

ix. Real-Time PCR quantitativa

L'RNA è stato estratto mediante un kit disponibile in commercio (Ambion) ed è poi stato quantizzato tramite analisi spettrofotometrica. 1 μ g di RNA è stato retrotrascritto utilizzando *SuperScript* e *random hexamer primers* (Invitrogen).

Il cDNA così ottenuto è stato amplificato con Taqman 7000 (Applied Biosystems), utilizzando FastStart TaqMan[®] Probe Master (Roche Applied Sciences), sonde e *primer* TaqMan gene-specifici (Applied Biosystems). Per il termociclatore è stato usato un protocollo standard a 2 *step* (95°C per 15 secondi, 60°C per 1 min, ripetuto 40 volte).

La quantificazione relativa dell'espressione genica è stata calcolata mediante comparazione del C_T (ciclo soglia) e normalizzata all'espressione del gene housekeeping 18S.

x. Immunoistochimica

L'aorta toracica è stata prelevata da ratti femmina dopo 1, 4 e 8 mesi dall'ovariectomia, accuratamente pulita ed immersa in PBS contenente saccarosio al 7% per 24 h a 4°C per la crioprotezione. I segmenti di aorta sono stati posti in Tissue-Tek O.C.T. e immediatamente congelati in azoto liquido. Al criostato sono state ottenute sezioni di 10 µm, che sono state fissate con acetone freddo e conservate a -80°C fino al momento dell'utilizzo. Alcune sezioni sono state immediatamente impiegate per valutare l'integrità strutturale dell'endotelio mediante colorazione con ematossilina ed eosina (Mayer's Haematoxylin, Sigma; Eosin Y, BHD).

Per valutare la presenza di eNOS, peNOS ed ERα a livello endoteliale, le sezioni di aorta sono state portate gradualmente a temperatura ambiente e lavate con PBS. Le sezioni sono state quindi incubate con PBS contenente Triton allo 0.1% per 1 minuto, per favorire la permeabilizzazione delle membrane cellulari, e con *blocking buffer* (PBS contenente siero *anti-rabbit* al 10%) per 40 minuti; in seguito sono state incubate *overnight* con gli opportuni anticorpi primari (anti-eNOS e anti-ERα 1:10, Santa Cruz Biotechnology Inc; anti-peNOS 1:10, Zymed). I tessuti sono stati lavati più volte con PBS e incubati in anticorpo secondario biotinilato *anti-rabbit* 1:100 per 40 minuti. Prima della successiva incubazione con streptavidina coniugata con HRP (*horse-radish peroxidase*), l'attività delle perossidasi endogene è stata inibita mediante incubazione con acqua ossigenata per 15 minuti. Come metodo di rivelazione è stata utilizzata la diaminobenzidina. Il legame non specifico è stato valutato sostituendo l'anticorpo primario con *antibody diluting solution* (PBS contenente 1% di siero *anti-rabbit*) nei

vetrini di controllo negativo. I vetrini sono stati osservati al microscopio Axiovert (Zeiss) e le immagini sono state acquisite con il programma Axiovision (Zeiss).

xi. Analisi statistica

I dati sono stati espressi come media \pm SEM (*standard error mean*) di 4-6 esperimenti indipendenti; ciascun valore rappresenta la media \pm SEM di osservazioni in duplicato o triplicato. Le curve concentrazione-risposta sono state ottenute con il *software* Prism v3.0.2 (GraphPad Software Inc.) e sono state confrontate tramite analisi della varianza (ANOVA) a due vie. I valori di pD_2 e le risposte massime (Emax) agli agenti farmacologici sono stati confrontati utilizzando il test ANOVA ad una via, seguito dal test di Bonferroni *post hoc*, mediante il *software* GraphPad InStat (GraphPad Software Inc.).

I dati di *Western blot* e *real-time* PCR rappresentano la media \pm SEM di 3 esperimenti indipendenti. Il confronto tra i gruppi sperimentali (OVX vs OVX + E2) è stato effettuato mediante ANOVA ad una via.

Valori di $P < 0.05$ sono stati considerati significativi.

V. RISULTATI

i. Effetto dell'ovariectomia e del trattamento con 17 β -estradiolo sul peso corporeo e sul peso degli uteri

Per determinare l'influenza dell'estradiolo circolante sulle risposte vasomotorie agli agonisti dei recettori degli estrogeni, gli esperimenti sono stati condotti utilizzando vasi provenienti da ratti ovariectomizzati da 1 mese e sottoposti per 5 giorni a trattamento *in vivo* con 17 β -estradiolo (OVX + E₂) oppure con veicolo (OVX).

Dopo 1 mese dall'ovariectomia è stato riscontrato un aumento significativo del peso corporeo degli animali ovariectomizzati rispetto ai controlli; tuttavia, il trattamento estrogenico sostitutivo non ha modificato questo parametro nei ratti ovariectomizzati (Tab. 1).

Come atteso, gli animali ovariectomizzati e trattati con veicolo presentavano uteri atrofici del peso pari a circa un terzo rispetto a quanto osservato nei controlli (Tab. 1). Il trattamento estrogenico sostitutivo ha riportato alla normalità il peso degli uteri nei ratti ovariectomizzati

GRUPPO	PESO ANIMALI (g)	PESO UTERI (mg)
controllo	252 \pm 16	509 \pm 85
OVX	319 \pm 4*	137 \pm 22*
OVX + E ₂	310 \pm 7*	550 \pm 48†

TABELLA 1 Effetto dell'ovariectomia per 1 mese e del trattamento estrogenico sostitutivo per 5 giorni sul peso corporeo e sul peso degli uteri di ratti femmine intatti, ovariectomizzati (OVX) ed ovariectomizzati trattati con 17 β -estradiolo (OVX +E₂) per 5 giorni. I dati sono espressi come media \pm SEM di 6 esperimenti. *P<0.01 vs controllo; †P<0.01 vs OVX (ANOVA a una via seguita da test di Bonferroni *post hoc*).

ii. Effetto del trattamento acuto con composti estrogenici sul tono vascolare in preparati di aorta toracica di ratti femmine

Preparati di aorta toracica di ratti femmine sono stati precontratti con noradrenalina (0.1 μ M); quando la contrazione ha raggiunto un *plateau* stabile, i tessuti sono stati stimolati con concentrazioni crescenti di 17 β -estradiolo (E_2), dell'agonista ER α -selettivo PPT e dell'agonista ER β -selettivo DPN. L'intervallo di concentrazioni utilizzato è stato selezionato in modo da comprendere concentrazioni di 17 β -estradiolo fisiologicamente rilevanti *in vivo*, garantendo contemporaneamente la selettività degli agonisti per le due isoforme recettoriali.

Il trattamento dei tessuti con 17 β -estradiolo ha indotto rilassamento rapido in modo concentrazione-dipendente (Fig. 7). In modo analogo al ligando fisiologico, anche l'agonista ER α -selettivo PPT ha prodotto una vasodilatazione a breve termine dei preparati vascolari, inducendo un'effetto sovrapponibile a quello del 17 β -estradiolo sia in termini di potenza che di efficacia (Fig. 7). Al contrario, l'agonista ER β -selettivo DPN non ha causato risposte vasomotorie significative (Fig. 7). I parametri farmacologici di efficacia (E_{max}) e di potenza (pD_2) per i diversi composti estrogenici sono riassunti in Tabella 2.

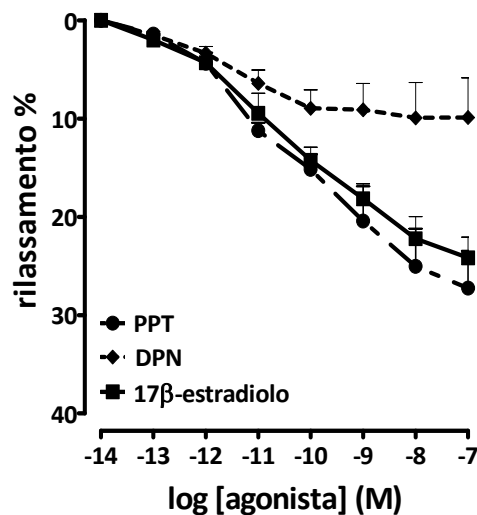


FIGURA 7 Curve concentrazione-risposta per il 17 β -estradiolo (\blacksquare), l'agonista ER α -selettivo PPT (\bullet) e l'agonista ER β -selettivo DPN (\blacklozenge) ottenute in preparati di aorta toracica di ratti femmine. I tessuti sono stati precontratti con NA 0.1 μ M. Ogni punto delle curve rappresenta la media \pm SEM di 5-6 esperimenti. DPN vs E_2 e PPT $P < 0.01$ (ANOVA a due vie).

iii. Effetto dell'ovariectomia e del trattamento con 17 β -estradiolo sulle risposte funzionali a breve termine dell'aorta toracica

Al fine di determinare l'influenza degli estrogeni circolanti sulle risposte vascolari a breve termine indotte dal 17 β -estradiolo e dall'agonista ER α -selettivo PPT, sono stati condotti esperimenti specifici in animali ovariectomizzati, trattati *in vivo* con 17 β -estradiolo (OVX + E₂) oppure con solo veicolo (OVX).

In contrasto con quanto precedentemente osservato nei ratti femmina intatti, l'esposizione acuta sia al ligando fisiologico che all'agonista ER α -selettivo PPT non ha indotto un rilassamento significativo dei preparati di aorta provenienti dagli animali OVX; per entrambi i composti la risposta è risultata non significativamente diversa da quella del DPN (Fig. 8A). Il trattamento estrogenico sostitutivo per 5 giorni ha ripristinato le risposte vasodilatanti a breve termine sia per l'agonista ER α -selettivo PPT che per il 17 β -estradiolo (Fig. 8B). Tuttavia, anche in questo gruppo di animali l'agonista ER β -selettivo DPN non ha mostrato alcun effetto significativo (Fig. 8B) sul tono vascolare. I parametri farmacologici di efficacia (E_{max}) e di potenza (pD₂) per i diversi composti estrogenici sono stati riportati in Tabella 2.

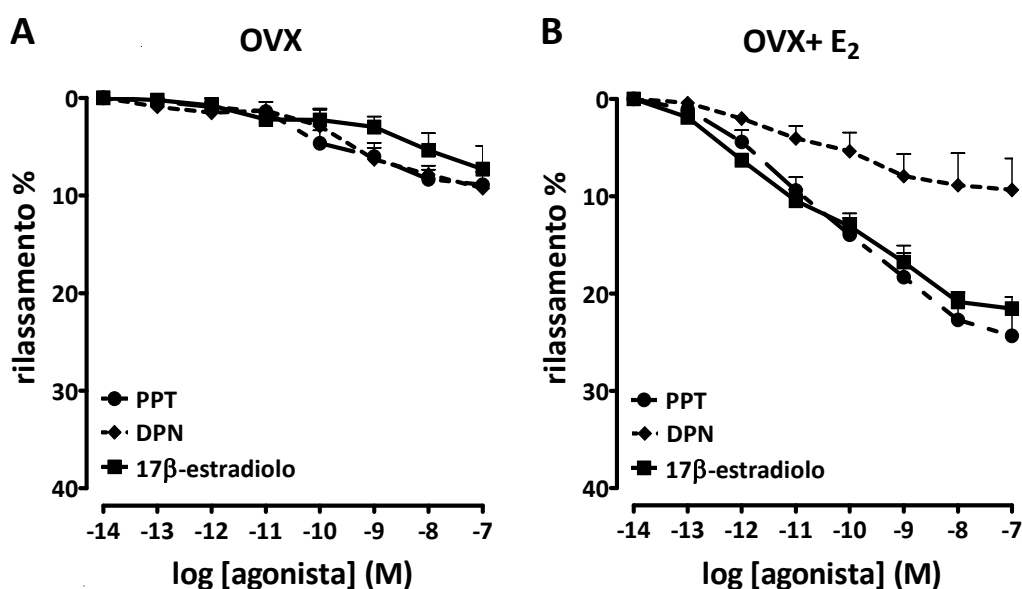


FIGURA 8 Curve concentrazione-risposta per il 17 β -estradiolo (■), l'agonista ER α -selettivo PPT (●) e l'agonista ER β -selettivo DPN (◆) ottenute in anelli di aorta toracica di ratti OVX (A) ed OVX trattati con 17 β -estradiolo (B) per 5 giorni. I tessuti sono stati precontratti con NA 0.1 μ M. Ogni punto delle curve rappresenta la media \pm SEM di 6 esperimenti. (A) E₂ o PPT vs DPN n.s.; (B) E₂ vs DPN $p < 0.01$; PPT vs DPN $p < 0.01$ (ANOVA a due vie).

GRUPPO	17 β -estradiolo		PPT		DPN	
	pD ₂	E _{max} (%)	pD ₂	E _{max} (%)	pD ₂	E _{max} (%)
controllo	10.2±0.4	27.3±3.8	10.4±0.3	24.2±2.1	9.3±0.6	9.9±4.0
OVX	9.2±0.6	7.1±1.1*	9.7±0.5	8.2±0.6*	9.3±0.4	8.7±0.7
OVX + E ₂	10.9±0.2	22.8±1.5†	10.2±0.3	25.6±2.6†	9.8±0.4	9.7±2.2

TABELLA 2 Parametri di efficacia (E_{max}) e di potenza (pD₂) delle curve concentrazione-risposta per il 17 β -estradiolo, l'agonista ER α -selettivo PPT e l'agonista ER β -selettivo DPN in preparati di aorta toracica provenienti da ratti femmine intatti (controllo), ovariectomizzati (OVX) e ovariectomizzati trattati con 17 β -estradiolo (OVX +E₂) per 5 giorni. I dati sono espressi come media \pm SEM di 5-6 esperimenti. *P<0.01 vs controllo; †P<0.01 vs OVX (ANOVA a una via seguita da test di Bonferroni *post hoc*).

iv. Effetto dell'endotelio sulle risposte vascolari a breve termine degli estrogeni in preparati di aorta toracica di ratti femmine

Al fine di valutare il ruolo dell'endotelio nelle risposte vascolari a breve termine indotte dal 17 β -estradiolo e dall'agonista ER α -selettivo PPT, esperimenti specifici sono stati condotti dopo incubazione con l'inibitore non specifico della NO sintasi L-NAME oppure in preparati privi di endotelio.

Come discusso in precedenza, il trattamento con entrambi i composti estrogenici ha indotto un rilassamento concentrazione-dipendente dell'aorta toracica. Nei tessuti senza endotelio, le risposte sono risultate significativamente ridotte sia per l'agonista ER α -selettivo PPT (pD₂ = 10.4 \pm 0.3, E_{max} = 5.0% \pm 2.5; Fig. 9A) sia per il ligando fisiologico 17 β -estradiolo (pD₂ = 9.9 \pm 0.2, E_{max} = 8.1% \pm 2.0; Fig. 9B). Inoltre, dopo incubazione con L-NAME 3 μ M per 20 minuti, né l'agonista ER α -selettivo PPT (pD₂ = 9.1 \pm 0.3, E_{max} = 4.2% \pm 1.4; Fig. 9A) né il 17 β -estradiolo (pD₂ = 9.5 \pm 0.4, E_{max} = 4.8% \pm 1.6; Fig. 9B) sono stati in grado di indurre una risposta vasomotoria significativa. Questi risultati dimostrano un ruolo fondamentale dell'endotelio e del rilascio di NO ad opera della NO sintasi

endoteliale nelle risposte vascolari a breve termine indotte sia dal 17 β -estradiolo che dal PPT.

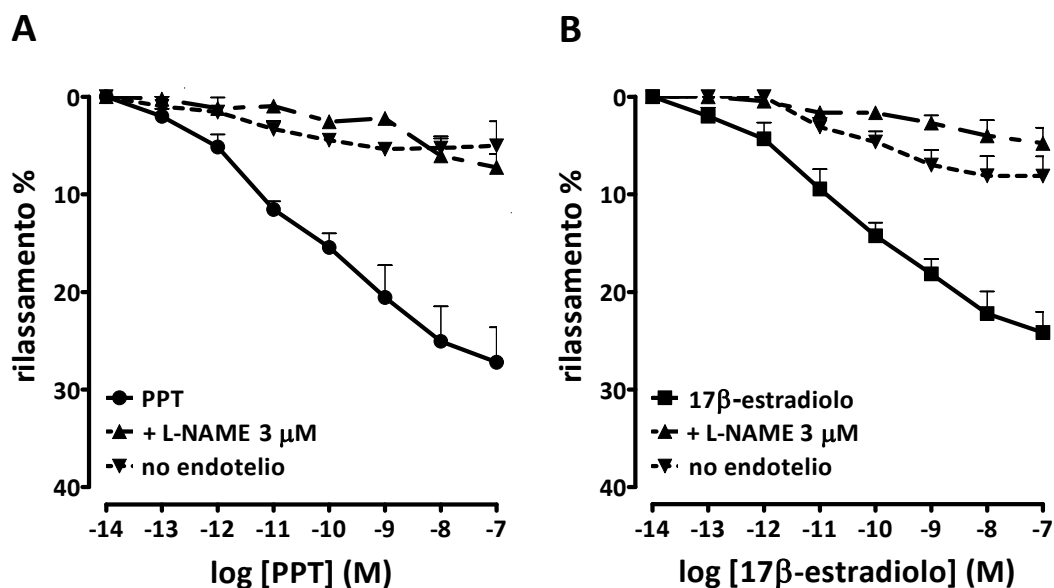


FIGURA 9 Curve concentrazione-risposta per il 17 β -estradiolo (■) e l'agonista ER α -selettivo PPT (●), in assenza di endotelio (▼) o in presenza dell'inibitore della NO sintasi L-NAME (▲), ottenute in anelli di aorta toracica di ratti femmine. I tessuti sono stati precontratti con NA 0.1 μ M. Ogni punto delle curve rappresenta la media \pm SEM di 4-5 esperimenti. E₂ o PPT vs (+L-NAME) $P < 0.01$; E₂ o PPT vs (no endotelio) $P < 0.01$ (ANOVA a due vie).

v. Effetto degli antagonisti dei recettori degli estrogeni

Al fine di valutare il coinvolgimento dei recettori degli estrogeni nelle risposte vasomotorie rapide fin qui osservate, i preparati di aorta di ratti OVX trattati con 17 β -estradiolo sono stati posti in incubazione con l'antagonista non selettivo ICI 182,780 e con l'antagonista ER α -selettivo MPP a due diverse concentrazioni per 20 minuti.

Effetto dell'antagonista non selettivo ICI 182,780 sulle risposte vascolari degli estrogeni

La co-incubazione dei preparati di aorta con l'antagonista non selettivo dei recettori degli estrogeni ICI 182,780 ha ridotto in modo concentrazione-dipendente il rilassamento vascolare a breve termine indotto dall'agonista ER α -selettivo PPT sia in termini di potenza che di efficacia (Fig. 10A). Allo stesso modo, ICI 182,780 è stato in grado di antagonizzare in modo concentrazione-dipendente anche le risposte vascolari del 17 β -estradiolo (Fig. 10B). I parametri farmacologici di efficacia (E_{max}) e di potenza (pD₂) per 17 β -estradiolo e PPT dopo incubazione con ICI 182,780 sono stati riportati in Tabella 3.

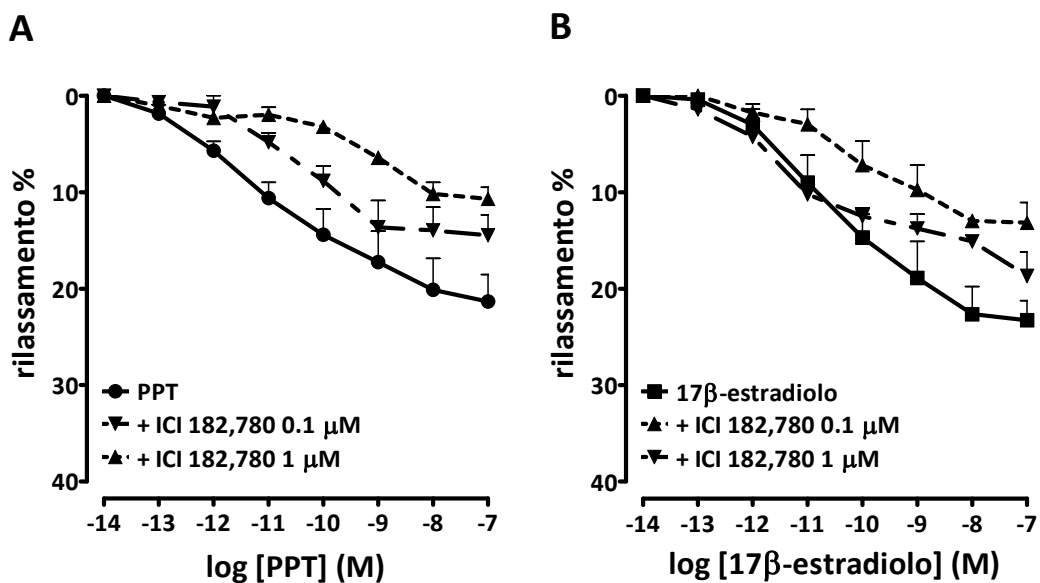


FIGURA 10 Curve concentrazione-risposta per l'agonista ER α -selettivo PPT (●) e il 17 β -estradiolo (■), ottenute in anelli di aorta toracica di ratti OVX trattati con 17 β -estradiolo per 5 giorni, dopo incubazione con ICI 182,780 0.1 μ M (▼) e 1 μ M (▲). I tessuti sono stati precontratti con NA 0.1 μ M. Ogni punto delle curve rappresenta la media \pm SEM di 5-6 esperimenti. (A) PPT vs (PPT + ICI 182,780 1 μ M) $P < 0.01$; (B) E $_2$ vs (E $_2$ + ICI 182,780 1 μ M) $P < 0.01$ (ANOVA a due vie).

Effetto dell'antagonista ER α -selettivo MPP sulle risposte vascolari degli estrogeni

In un'altra serie di esperimenti, i preparati di aorta toracica sono stati co-incubati con MPP, antagonista selettivo per l'isoforma recettoriale ER α . Tale trattamento è stato efficace nel ridurre in modo concentrazione-dipendente la vasodilatazione a breve termine indotta dall'agonista ER α -selettivo PPT (Fig. 11A). Analogamente, MPP ha antagonizzato la risposta vasodilatante rapida indotta dal 17 β -estradiolo (Fig. 11B). I parametri farmacologici di efficacia (E $_{max}$) e di potenza (pD $_2$) per 17 β -estradiolo e PPT dopo incubazione con l'antagonista ER α -selettivo MPP sono stati riportati in Tabella 3.

Ulteriori esperimenti sono stati condotti utilizzando arterie mesenteriche superiori isolate da ratti OVX trattati con 17 β -estradiolo *in vivo*. Anche in questi vasi si osserva un rilassamento a breve termine indotto in modo concentrazione-dipendente sia dall'agonista ER α -selettivo PPT (Fig. 12A) che dal ligando naturale 17 β -estradiolo (Fig. 12B). L'antagonista ER α -selettivo MPP ha ridotto l'effetto vasodilatante di entrambi i composti estrogenici (Fig. 12A-B). I parametri farmacologici di efficacia (E $_{max}$) e di potenza (pD $_2$) per 17 β -estradiolo e PPT dopo incubazione con l'antagonista ER α -selettivo MPP sono stati riportati in Tabella 4.

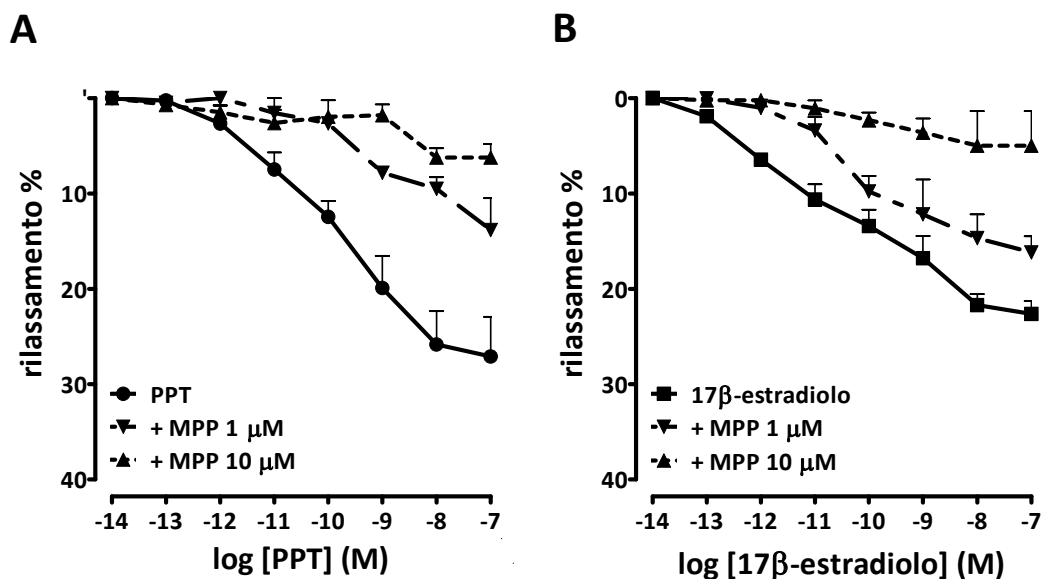


FIGURA 11 Curve concentrazione-risposta per l'agonista ER α -selettivo PPT (●) e il 17 β -estradiolo (■), ottenute in anelli di aorta toracica di ratti OVX trattati con 17 β -estradiolo per 5 giorni, dopo incubazione con MPP 1 μ M (▼) e 10 μ M (▲). I tessuti sono stati precontratti con NA 0.1 μ M. Ogni punto delle curve rappresenta la media \pm SEM di 5-6 esperimenti. (A) PPT vs (PPT + MPP 10 μ M) $p < 0.01$; (B) E $_2$ vs (E $_2$ + MPP 10 μ M) $p < 0.01$ (ANOVA a due vie).

	17 β -estradiolo		PPT	
	pD $_2$	E $_{max}$ (%)	pD $_2$	E $_{max}$ (%)
+ solvente	10.9 \pm 0.2	22.8 \pm 1.5	10.2 \pm 0.3	25.6 \pm 2.6
+ ICI 182,780 1 μ M	11.0 \pm 0.3	17.0 \pm 1.2	10.4 \pm 0.3	14.7 \pm 1.3*
+ ICI 182,780 0.1 μ M	9.6 \pm 0.2*	13.8 \pm 1.8*	8.8 \pm 0.7*	13.8 \pm 2.9*
+ MPP 1 μ M	10.9 \pm 0.2	14.2 \pm 1.7*	9.0 \pm 0.2*	13.8 \pm 3.3*
+ MPP 10 μ M	9.2 \pm 0.8*	5.0 \pm 3.6*	8.6 \pm 0.5*	6.2 \pm 1.4*

TABELLA 3 Parametri di efficacia (E $_{max}$) e potenza (pD $_2$) delle curve concentrazione-risposta per il 17 β -estradiolo e l'agonista ER α -selettivo PPT in preparati di aorta toracica dopo incubazione con gli antagonisti dei recettori degli estrogeni. Sono stati utilizzati tessuti provenienti da ratti ovariectomizzati trattati con 17 β -estradiolo per 5 giorni. I dati sono espressi come media \pm SEM di 5-6 esperimenti. * $P < 0.01$ vs solvente (ANOVA a una via seguita da test di Bonferroni *post hoc*).

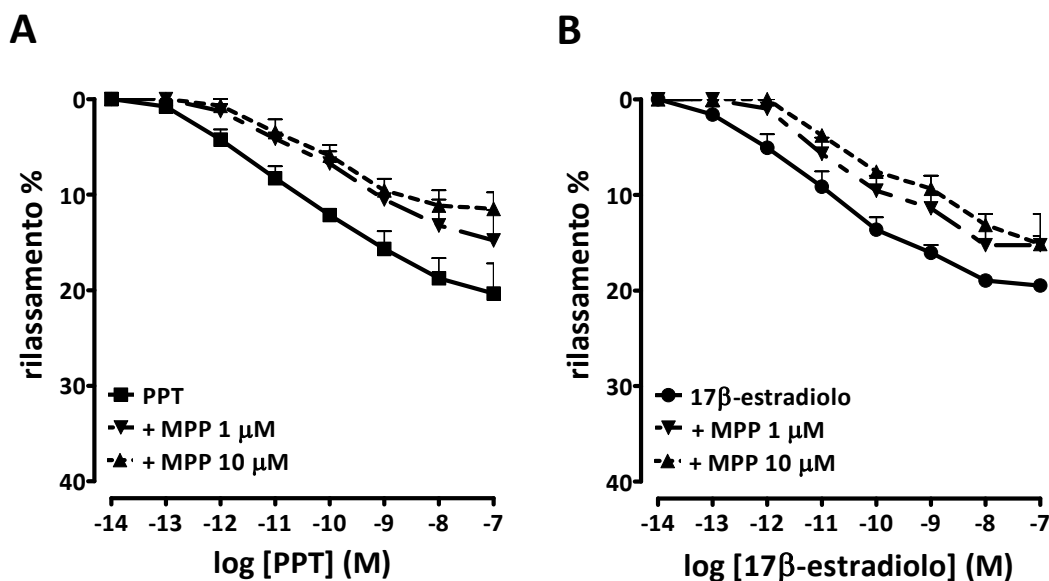


FIGURA 12 Curve concentrazione-risposta per l'agonista ER α -selettivo PPT (●) e il 17 β -estradiolo (■), ottenute in anelli di arteria mesenterica superiore di ratti OVX trattati con 17 β -estradiolo per 5 giorni, dopo incubazione con MPP 1 μ M (▼) e 10 μ M (▲). I tessuti sono stati precontratti con NA 0.1 μ M. Ogni punto delle curve rappresenta la media \pm SEM di 3-4 esperimenti. (A) PPT vs (PPT + MPP 10 μ M) $P < 0.01$; (B) E $_2$ vs (E $_2$ + MPP 10 μ M) $P < 0.01$ (ANOVA a due vie).

	17 β -estradiolo		PPT	
	pD $_2$	E $_{max}$ (%)	pD $_2$	E $_{max}$ (%)
+ solvente	10.9 \pm 0.1	20.6 \pm 0.6	10.5 \pm 0.1	22.4 \pm 1.0
+ MPP 1 μ M	10.5 \pm 0.2	15.1 \pm 3.3	9.8 \pm 0.1	14.8 \pm 3.2*
+ MPP 10 μ M	9.7 \pm 0.4	15.1 \pm 0.9*	10.1 \pm 0.1	11.9 \pm 0.4*

TABELLA 4 Parametri di efficacia (E $_{max}$) e potenza (pD $_2$) delle curve concentrazione-risposta per il 17 β -estradiolo e l'agonista ER α -selettivo PPT in preparati di arteria mesenterica superiore dopo incubazione con gli antagonisti dei recettori degli estrogeni. Sono stati utilizzati tessuti provenienti da ratti ovariectomizzati trattati con 17 β -estradiolo per 5 giorni. I dati sono espressi come media \pm SEM di 3-4 esperimenti. * $P < 0.01$ vs solvente (ANOVA a una via seguita da test di Bonferroni *post hoc*).

vi. Espressione di ER α e ER β in cellule endoteliali di aorta di ratto

Le cellule endoteliali di aorta di ratto (RAEC) sono state ottenute mediante blanda tripsinizzazione.

Prima degli esperimenti, le RAEC sono state caratterizzate in base alla loro tipica morfologia *cobblestone*, come si può osservare in figura 13A; inoltre, in queste cellule è stata verificata l'espressione della NO sintasi endoteliale (eNOS), marcatore caratteristico dell'endotelio tramite *Western blot* (Fig. 13B). Le cellule endoteliali di vena ombelicale umana (HUVEC) hanno rappresentato il controllo positivo, mentre cellule muscolari lisce di aorta di ratto (RSMC) costituivano il controllo negativo.

Nelle RAEC è stata rilevata l'espressione di entrambe le isoforme del recettore degli estrogeni, utilizzando le proteine (ER α e ER β) ricombinanti umane come standard di peso molecolare e di specificità (Fig. 13C-D).

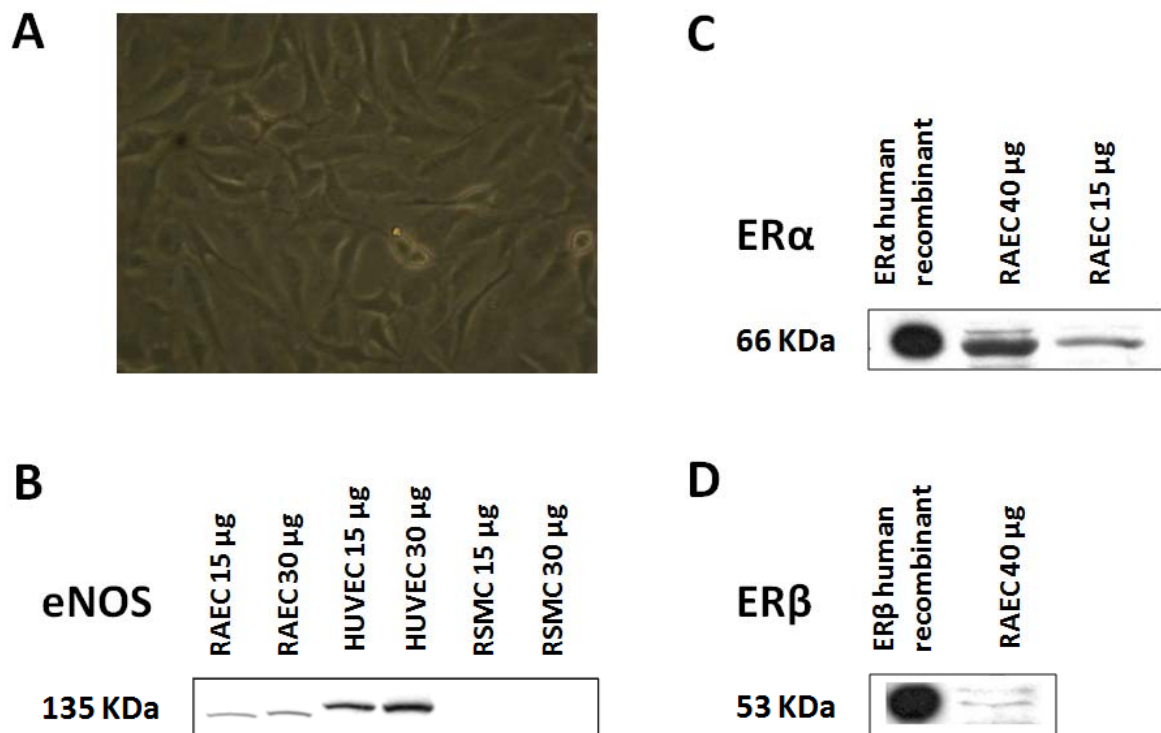


FIGURA 13 *Espressione di ER α e ER β in cellule endoteliali di aorta di ratto.* Le RAEC (A) esprimono la eNOS (B), come il controllo positivo rappresentato dalle HUVEC; le RSMC sono state utilizzate come controllo negativo. Le RAEC esprimono anche entrambi i recettori degli estrogeni (ER α e ER β) (C-D). Il quantitativo di proteine caricate sul gel è riportato in ciascuna *lane*.

vii. Effetto della durata della deprivazione estrogenica e del trattamento con 17 β -estradiolo sul peso corporeo e sul peso degli uteri

Per determinare l'influenza della durata della deprivazione estrogenica sulle funzionalità dell'aorta toracica di ratto in risposta ad agenti vasodilatanti, è stata condotta un'altra serie di esperimenti su preparati vascolari provenienti da ratti sacrificati a diversi tempi dall'ovariectomia. In particolare, sono stati utilizzati animali ovariectomizzati da 4 e 8 mesi, in aggiunta a quelli operati da 1 mese impiegati negli esperimenti descritti in precedenza.

All'aumentare della durata della deprivazione estrogenica è stato riscontrato un aumento significativo del peso corporeo degli animali ovariectomizzati; il trattamento con 17 β -estradiolo per 5 giorni non è stato in grado di modificare questo parametro a nessun tempo dall'ovariectomia (Tab. 5).

Come atteso, gli animali ovariectomizzati e trattati con veicolo presentavano uteri atrofici; in questo caso, il trattamento estrogenico sostitutivo è stato in grado di aumentare, riportandolo alla normalità, il peso degli uteri in tutti i gruppi sperimentali, indipendentemente dalla durata della deprivazione estrogenica (Tab. 5).

mesi	n	PESO ANIMALI (g)		PESO UTERI (mg)	
		OVX	OVX+E ₂	OVX	OVX+E ₂
1	14	316±8	297±5	119±8	335±27*
4	8	379±12†	354±12†	94±6	332±21*
8	12	432±14†	411±10†	105±7	306±12*

TABELLA 5 Effetto della durata della deprivazione estrogenica e del trattamento estrogenico sostitutivo per 5 giorni sul peso corporeo e sul peso degli uteri. I dati sono espressi come media \pm SEM di n esperimenti. *P<0.01 vs OVX; †P<0.01 vs 1 mese (ANOVA ad una via seguita da test di Bonferroni *post hoc*).

viii. Effetto della durata dell'ovariectomia sulle risposte vascolari indotte dall'acetilcolina

L'acetilcolina induce vasodilatazione endotelio-dipendente, stimolando la produzione di NO da parte dell'enzima NO sintasi endoteliale. Il rilassamento in risposta a stimolazione con acetilcolina è stato quindi utilizzato per testare la funzionalità dell'endotelio vascolare nei preparati di aorta utilizzati per gli esperimenti successivi.

Dopo 4 mesi dall'ovariectomia, l'acetilcolina ha indotto vasodilatazione completa dell'aorta toracica sia degli animali trattati con veicolo che di quelli sottoposti a rimpiazzo estrogenico per 5 giorni (Fig. 14B), analogamente a quanto osservato in precedenza negli animali ovariectomizzati da 1 mese (Fig. 14A). Diversamente, dopo 8 mesi dall'ovariectomia è stata riscontrata una riduzione significativa della vasodilatazione indotta dall'acetilcolina nei tessuti degli animali trattati con placebo e tale risposta non è stata ripristinata in seguito al trattamento estrogenico sostitutivo (Fig. 14C). Questi dati indicano che in questo modello sperimentale la funzionalità dell'endotelio nel ratto risulta alterata dopo un periodo prolungato di deprivazione estrogenica.

I parametri farmacologici di efficacia (E_{max}) e di potenza (pD_2) per l'acetilcolina sono stati riportati in Tabella 6.

mesi	Acetilcolina			
	OVX		OVX + E ₂	
	pD_2	E_{max} (%)	pD_2	E_{max} (%)
1	7.6±0.1	94.5±5.5	7.4±0.2	98.8±0.7
4	7.4±0.1	100±0.0	7.3±0.1	99.3±0.7
8	7.3±0.1	73.4±0.1†	7.1±0.2	81.4±0.4†

TABELLA 6 Parametri di efficacia (E_{max}) e potenza (pD_2) delle curve concentrazione-risposta per l'acetilcolina in preparati di aorta toracica provenienti da ratti ovariectomizzati da 1, 4 e 8 mesi trattati con veicolo (OVX) o 17 β -estradiolo (OVX +E₂) per 5 giorni. I dati sono espressi come media \pm SEM di 5-6 esperimenti. † P <0.01 vs (1 mese) (ANOVA a una via seguita da test di Bonferroni *post hoc*).

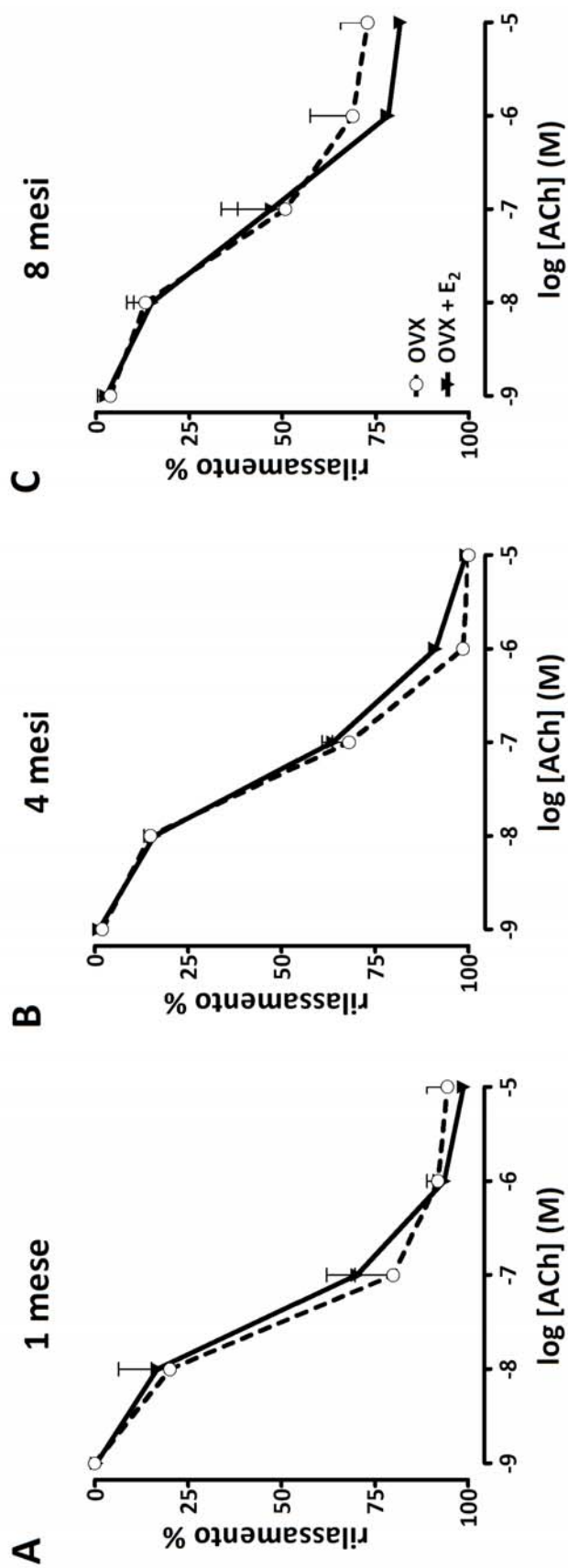


FIGURA 14 Curve concentrazione-risposta per l'acetilcolina ottenute in anelli di aorta toracica di ratti OVX (○) e OVX trattati con 17β-estradiolo (▼) per 5 giorni a diversi tempi di deprivazione estrogenica. I tessuti sono stati precontratti con NA 0.1 μM (EC₆₀). Ogni punto delle curve rappresenta la media ± SEM di 3-5 esperimenti. (A) OVX + E₂ vs OVX n.s.; (B) OVX + E₂ vs OVX n.s.; (C) OVX + E₂ vs OVX n.s.; OVX + E₂ (A) vs OVX + E₂ (C) p<0.01 (ANOVA a due vie).

ix. Effetto della durata della deprivazione estrogenica sulle risposte vascolari a breve termine indotte dagli estrogeni in preparati di aorta toracica di ratto

Al fine di determinare l'influenza della durata della deprivazione estrogenica sulle risposte vascolari a breve termine indotte da agenti estrogenici nell'aorta toracica, sono stati condotti degli esperimenti specifici su preparati vascolari provenienti da ratti sacrificati a diversi tempi dall'ovariectomia.

Effetti vascolari del 17 β -estradiolo a diversi tempi di deprivazione estrogenica

Il trattamento con 17 β -estradiolo non ha indotto vasodilatazione rapida dei preparati vascolari provenienti da animali OVX trattati con veicolo a ciascun tempo di deprivazione estrogenica (Fig. 15). Negli animali sottoposti a rimpiazzo estrogenico dopo 4 mesi dall'ovariectomia, il 17 β -estradiolo ha indotto vasodilatazione a breve termine dell'aorta toracica (Fig. 15B); pertanto, tale effetto è risultato simile a quello precedentemente osservato nei vasi ottenuti da ratti trattati con estrogeno *in vivo* dopo 1 mese dall'operazione (Fig. 15A). Al contrario, non è stata osservata alcuna risposta vascolare significativa in seguito al trattamento con 17 β -estradiolo nei tessuti degli animali dopo 8 mesi di deprivazione estrogenica (Fig. 15C); in questo gruppo la differenza tra le risposte vascolari degli animali trattati con veicolo e con estrogeno non era significativa.

I parametri farmacologici di efficacia (E_{max}) e di potenza (pD_2) per i composti estrogenici sono stati riportati in Tabella 7 .

Effetti vascolari dell'agonista ER α -selettivo PPT a diversi tempi di deprivazione estrogenica

Poiché la vasodilatazione a breve termine indotta dal 17 β -estradiolo nell'aorta toracica di ratto è mediata esclusivamente dall'isoforma recettoriale ER α , sono stati testati anche gli effetti vascolari dell'agonista ER α -selettivo PPT a diversi tempi di deprivazione estrogenica. Analogamente al 17 β -estradiolo, il PPT non ha indotto effetti vasomotori significativi nei tessuti provenienti da animali OVX trattati con veicolo in tutti i gruppi sperimentali (Fig. 16). Come il 17 β -estradiolo, l'agonista ER α -selettivo ha indotto vasodilatazione nei preparati vascolari degli animali sottoposti a rimpiazzo estrogenico

anche dopo 4 mesi dall'ovariectomia (Fig. 16B). Tuttavia, nemmeno l'agonista ER α -selettivo PPT ha causato rilassamento dei segmenti di aorta ottenuti da animali trattati con estrogeno *in vivo* dopo 8 mesi di deprivazione estrogenica (Fig. 16C).

I parametri farmacologici di efficacia (E_{max}) e di potenza (pD_2) per i composti estrogenici sono stati riportati in Tabella 7.

Effetti vascolari dell'agonista ER β -selettivo DPN a diversi tempi di deprivazione estrogenica

Infine, per escludere il coinvolgimento di ER β , sono state ottenute curve concentrazione-risposta per l'agonista ER β -selettivo DPN.

Tale composto non è stato in grado di indurre effetti vasomotori significativi nei diversi gruppi sperimentali, indipendentemente dalla durata della deprivazione estrogenica o dal trattamento farmacologico ricevuto *in vivo* (Fig. 17).

I parametri farmacologici di efficacia (E_{max}) e di potenza (pD_2) per i composti estrogenici sono stati riportati in Tabella 7.

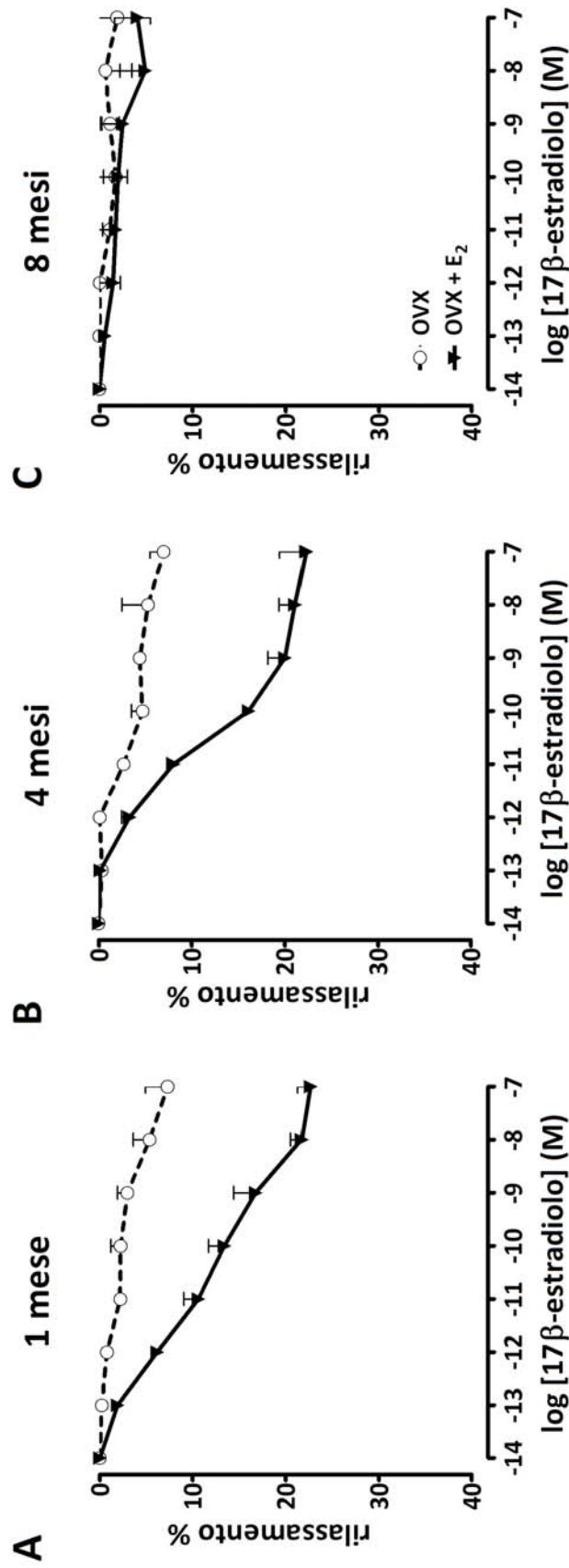


FIGURA 15 Curve concentrazione-risposta per il 17β-estradiolo ottenute in anelli di aorta toracica di ratti OVX (○) ed OVX trattati con 17β-estradiolo (▼) per 5 giorni a diversi tempi di deprivazione estrogenica. I tessuti sono stati precontratti con NA 0.1 μM (EC₆₀). Ogni punto delle curve rappresenta la media ± SEM di 3-5 esperimenti. (A) OVX + E₂ vs OVX p<0.01; (B) OVX + E₂ vs OVX p<0.01; (C) OVX + E₂ vs OVX n.s. (ANOVA a due vie).

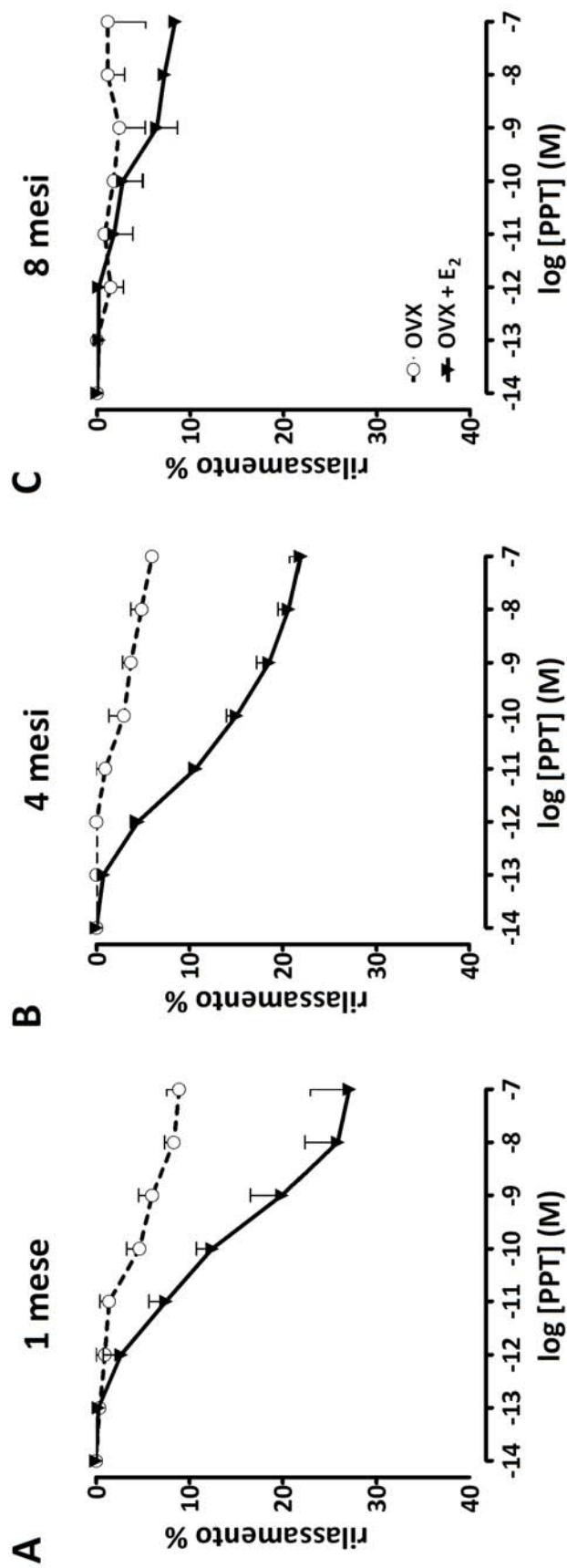


FIGURA 16 Curve concentrazione-risposta per l'agonista ER α -selettivo PPT ottenute in anelli di aorta toracica di ratti OVX (○) ed OVX trattati con 17 β -estradiolo (▼) per 5 giorni a diversi tempi di deprivazione estrogenica. I tessuti sono stati precontratti con NA 0.1 μ M (EC₆₀). Ogni punto delle curve rappresenta la media \pm SEM di 5 esperimenti. (A) OVX + E₂ vs OVX p<0.01; (B) OVX + E₂ vs OVX p<0.01; (C) OVX + E₂ vs OVX n.s. (ANOVA a due vie).

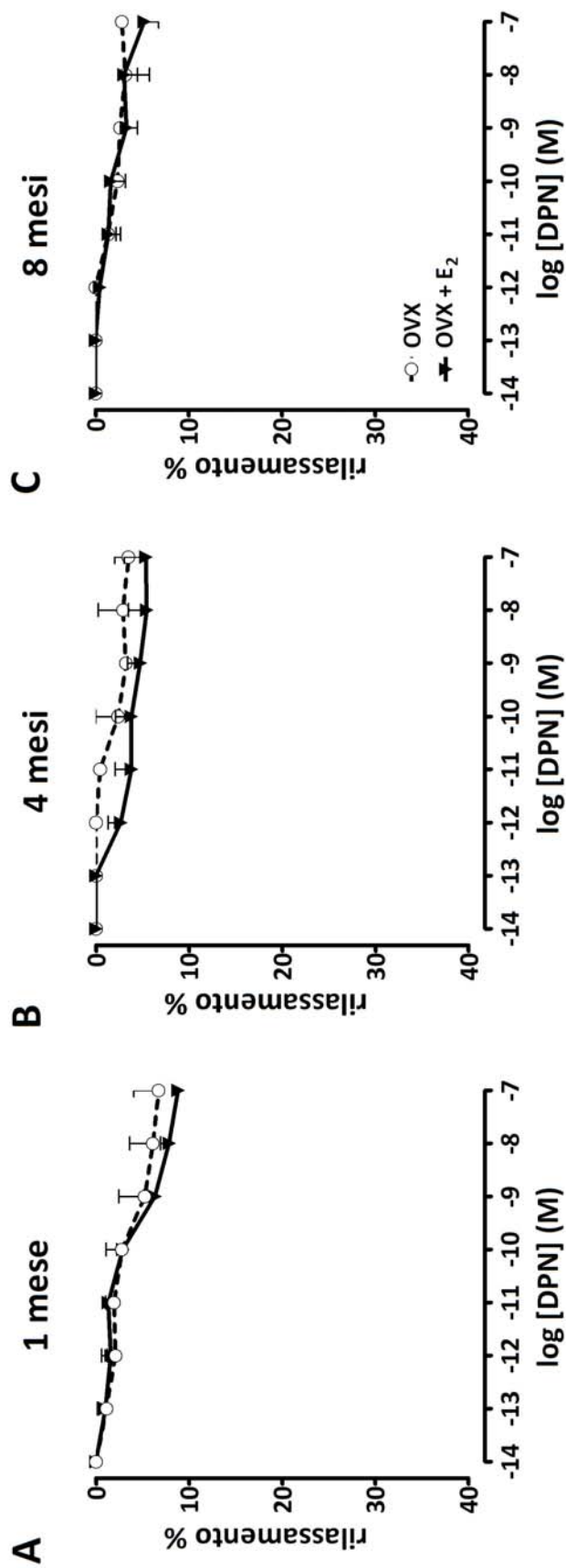


FIGURA 17 Curve concentrazione-risposta per l'agonista ER β -selettivo DPN ottenute in anelli di aorta toracica di ratti OVX (\circ) ed OVX trattati con 17 β -estradiolo (\blacktriangledown) per 5 giorni a diversi tempi dall'ovariectomia. I tessuti sono stati precontratti con NA 0.1 μ M (EC₆₀). Ogni punto delle curve rappresenta la media \pm SEM di 5 esperimenti. (A) OVX + E₂ vs OVX n.s.; (B) OVX + E₂ vs OVX n.s.; (C) OVX + E₂ vs OVX n.s. (ANOVA a due vie).

		17β-estradiolo						PPT						DPN					
		OVX		OVX + E ₂		OVX		OVX + E ₂		OVX		OVX + E ₂		OVX		OVX + E ₂			
mesi		pD ₂	E _{max}	pD ₂	E _{max}	pD ₂	E _{max}	pD ₂	E _{max}	pD ₂	E _{max}	pD ₂	E _{max}	pD ₂	E _{max}	pD ₂	E _{max}		
1		9.2±0.6	7.1±1.1	10.9±0.2	22.8±1.5*	9.7±0.5	8.2±0.6	10.2±0.3	25.6±2.6*	n.a.	8.8±0.1	n.a.	6.7±2.7						
4		10.1±0.4	7.0±1.4	10.6±0.1	22.7±2.8*	9.6±0.3	6.0±0.4	10.8±0.1	21.9±1.2*	n.a.	3.5±1.5	n.a.	5.3±2.3						
8		n.a.	1.9±3.5	n.a.	4.1±2.4†	n.a.	1.4±0.1	9.7±0.3	8.4±0.4†	n.a.	5.2±1.5	n.a.	2.8±0.7						

TABELLA 7 Parametri di efficacia (E_{max}) e potenza (pD₂) delle curve concentrazione-risposta per il 17β-estradiolo, l'agonista ERα-selettivo PPT e l'agonista ERβ-selettivo DPN in preparati di aorta toracica provenienti da ratti OVX e OVX trattati con 17β-estradiolo per 5 giorni a diversi tempi di deprivazione estrogenica. I dati sono espressi come media ± SEM di 4-5 esperimenti. (n.a. = non applicabile) *p<0.01 vs OVX; †p<0.01 vs 1 mese (ANOVA a una via seguita da test di Bonferroni post hoc).

x. Effetto della durata della deprivazione estrogenica sulle risposte vascolari all'acetilcolina e agli estrogeni nell'arteria mesenterica superiore

Sono state valutate le risposte a breve termine al 17 β -estradiolo e all'agonista ER α -selettivo PPT anche nell'arteria mesenterica superiore isolata da ratti OVX trattati *in vivo* con veicolo o con 17 β -estradiolo dopo 1, 4 e 8 mesi dall'ovariectomia. Questo sistema vascolare è stato scelto per verificare se la risposta agli estrogeni fosse simile in vasi di capacitanza, come l'aorta toracica, ed in vasi di resistenza, come l'arteria mesenterica. La funzionalità dell'endotelio vascolare è stata valutata in base alla risposta all'acetilcolina.

Come già osservato, dopo 1 mese dall'ovariectomia, l'acetilcolina ha indotto vasodilatazione completa dell'arteria mesenterica superiore sia degli animali trattati con veicolo che di quelli trattati con estrogeno *in vivo* per 5 giorni (Fig. 18A). Un rilassamento completo è stato osservato anche dopo 4 mesi dall'operazione nei preparati dei ratti trattati con veicolo o con il rimpiazzo estrogenico (Fig. 18B). Diversamente, dopo 8 mesi dall'ovariectomia è stata riscontrata una riduzione significativa della vasodilatazione indotta dall'acetilcolina nei tessuti degli animali trattati con veicolo; tale risposta è stata ripristinata solo in parte in seguito al trattamento estrogenico sostitutivo (Fig. 18C). I parametri farmacologici di efficacia (E_{max}) e di potenza (pD_2) per l'acetilcolina sono stati riportati in Tabella 8.

mesi	Acetilcolina			
	OVX		OVX + E ₂	
	pD_2	E_{max} (%)	pD_2	E_{max} (%)
1	7.5 \pm 0.1	100 \pm 0.1	7.3 \pm 0.1	97.8 \pm 1.8
4	7.3 \pm 0.1	98.1 \pm 1.4	7.3 \pm 0.1	95.9 \pm 2.3
8	7.2 \pm 0.2	65.9 \pm 9.9 [†]	7.0 \pm 0.2	73.1 \pm 8.0 [†]

TABELLA 8 Parametri di efficacia (E_{max}) e potenza (pD_2) delle curve concentrazione-risposta per l'acetilcolina in preparati di arteria mesenterica superiore isolata da ratti ovariectomizzati da 1, 4 e 8 mesi trattati con veicolo (OVX) o 17 β -estradiolo (OVX +E₂) per 5 giorni. I dati sono espressi come media \pm SEM di 3-5 esperimenti. [†] p <0.01 vs OVX (ANOVA a una via seguita da test di Bonferroni *post hoc*).

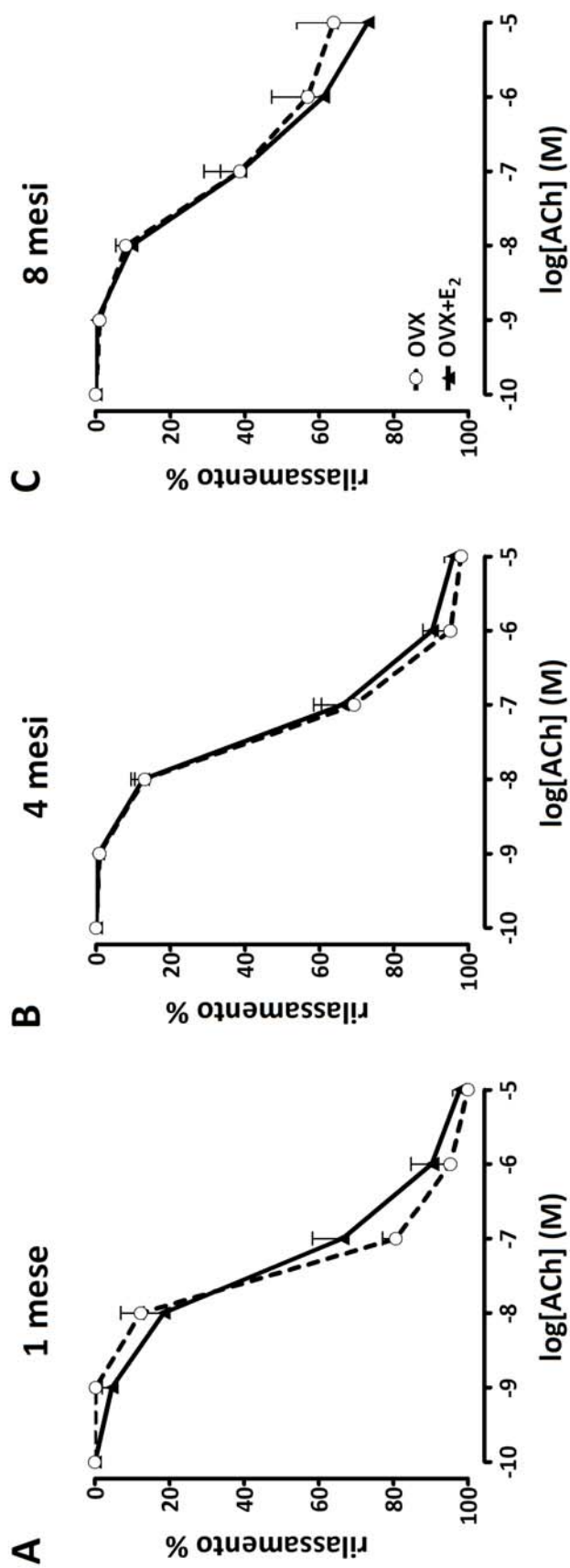


FIGURA 18 Curve concentrazione risposta per l'acetilcolina ottenute in anelli di aorta toracica di ratti OVX (○) e OVX trattati con 17β-estradiolo (▼) per 5 giorni dopo 1, 4 e 8 mesi dall'ovariectomia. I tessuti sono stati precontratti con NA 0.1 μM (EC60). Ogni punto delle curve rappresenta la media ± SEM di 3-5 esperimenti. (A) OVX + E2 vs OVX n.s.; (B) OVX + E2 vs OVX n.s.; (C) OVX + E2 vs OVX n.s. (ANOVA a due vie).

Sono state quindi valutate le risposte a breve termine ai composti estrogenici 17 β -estradiolo e PPT.

Analogamente a quanto osservato nell'aorta, l'esposizione a breve termine al 17 β -estradiolo o all'agonista ER α -selettivo PPT non ha indotto un rilassamento significativo dei preparati vascolari provenienti da animali OVX e trattati con veicolo dopo 1, 4 oppure 8 mesi di deprivazione estrogenica (Fig. 19A). Negli animali sottoposti a trattamento estrogenico sostitutivo dopo 1 e 4 mesi dall'ovariectomia, entrambi i composti estrogenici hanno indotto vasodilatazione a breve termine dei preparati di arteria mesenterica (Fig. 19B). Al contrario, non è stata osservata alcuna modificazione significativa del tono vascolare in seguito ad esposizione acuta al 17 β -estradiolo o al PPT nei tessuti di animali che avevano ricevuto il rimpiazzo estrogenico dopo 8 mesi di deprivazione estrogenica (Fig. 19C). I parametri farmacologici di efficacia (Emax) e di potenza (pD₂) per il 17 β -estradiolo e per l'agonista ER α -selettivo PPT sono riportati in tabella 9.

mesi	17 β -estradiolo				PPT			
	OVX		OVX+E ₂		OVX		OVX+E ₂	
	pD ₂	Emax(%)	pD ₂	Emax (%)	pD ₂	Emax (%)	pD ₂	Emax (%)
1	n.a.	2.6 \pm 1.1	10.2 \pm 0.3	20.0 \pm 1.9	10.6 \pm 1.1	9.6 \pm 1.5	10.1 \pm 0.2	23.8 \pm 2.6
4	n.a.	6.5 \pm 2.9	10.2 \pm 0.4	17.5 \pm 2.1	n.a.	6.4 \pm 2.3	10.6 \pm 0.2	20.4 \pm 1.5
8	n.a.	1.7 \pm 3.2	n.a.	3.1 \pm 1.1*	n.a.	3.0 \pm 1.1	n.a.	1.9 \pm 1.4*

TABELLA 9 Parametri di efficacia (Emax) e potenza (pD₂) delle curve concentrazione-risposta per il 17 β -estradiolo e per l'agonista ER α -selettivo PPT. Sono stati utilizzati preparati di arteria mesenterica provenienti da ratti ovariectomizzati (OVX) e ovariectomizzati trattati con 17 β -estradiolo (OVX +E₂) per 5 giorni dopo 1, 4 e 8 mesi di deprivazione estrogenica. I dati sono espressi come media \pm SEM di 3-5 esperimenti. *p<0.01 vs 1 mese.

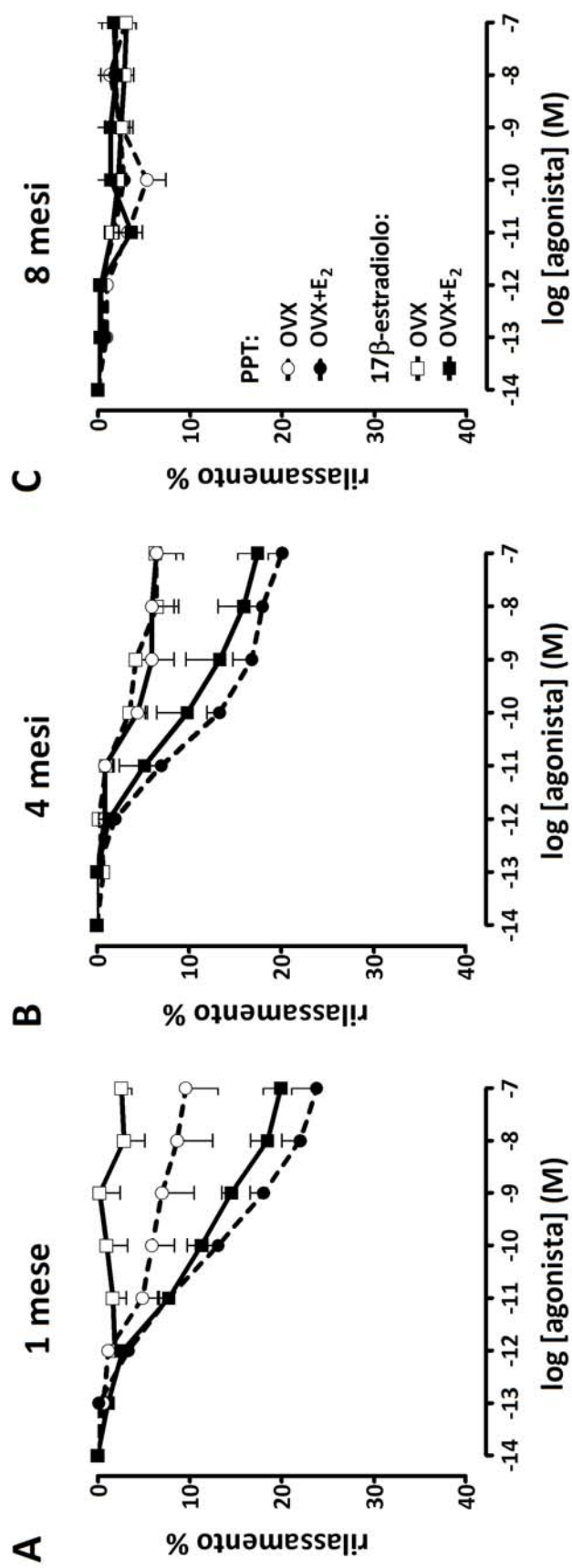
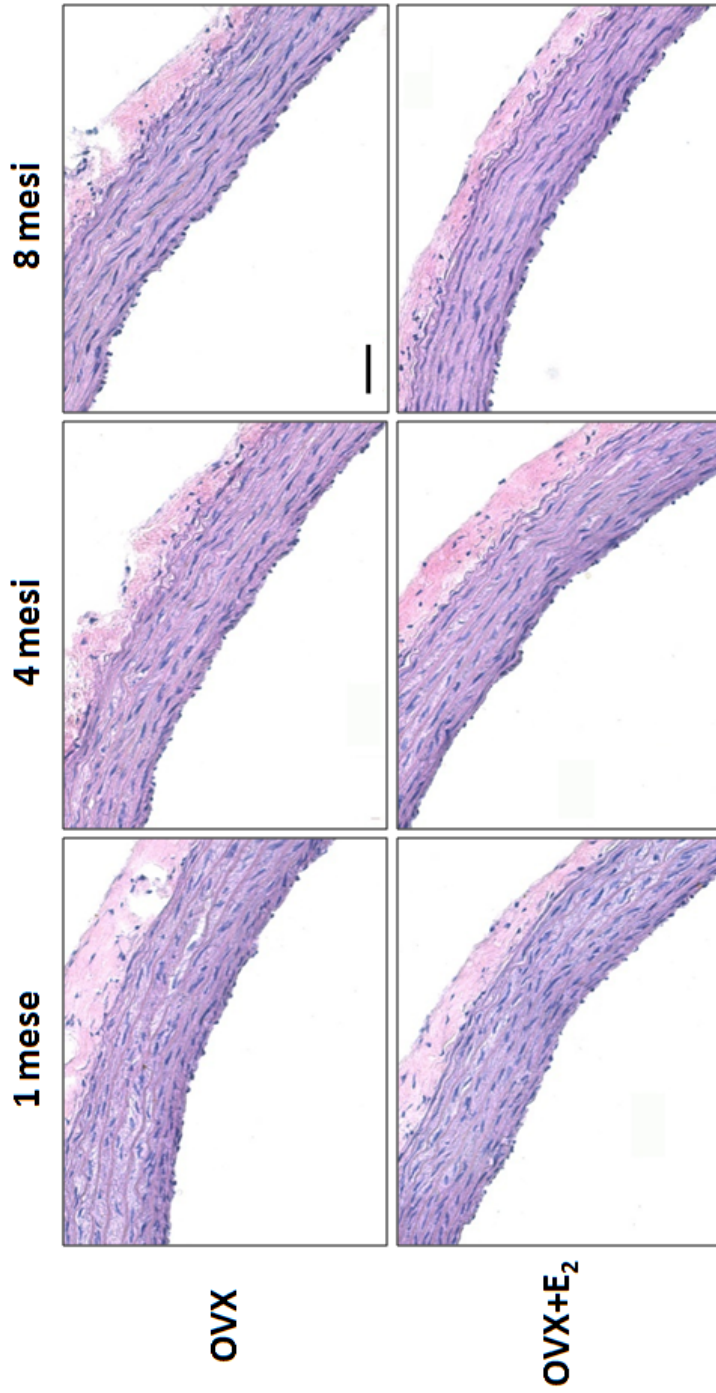


FIGURA 19 Curve concentrazione risposta per il 17β-estradiolo e per l'agonista ERα-selettivo PPT ottenute in anelli di arteria mesenterica superiore di ratti OVX (○) e OVX trattati con 17β-estradiolo (▼) per 5 giorni dopo 1, 4 e 8 mesi di deprivazione estrogenica. I tessuti sono stati precontratti con NA 0.1 μM (EC60). Ogni punto delle curve rappresenta la media ± SEM di 3-5 esperimenti. PPT: OVX + E₂ vs OVX p<0.05; 17β-estradiolo: OVX + E₂ vs OVX p<0.05 a 1 e 4 mesi dall'ovariectomia (ANOVA a due vie).

xi. Istologia e valutazione dell'integrità dell'endotelio

La vasodilatazione rapida indotta dagli estrogeni nei preparati di aorta di ratto dipende dalla presenza dell'endotelio ed è mediata dall'incremento della produzione di NO mediata dalla NO sintasi endoteliale (eNOS); inoltre, le risposte al 17 β -estradiolo e all'agonista ER α -selettivo PPT sono state abrogate dopo un prolungato periodo di deprivazione estrogenica.

Per verificare se la riduzione di tali risposte fosse dovuta a lesioni endoteliali, è stata valutata l'integrità di questo organo in animali ovariectomizzati da tempi diversi (1, 4 e 8 mesi), utilizzando sezioni di aorta toracica sottoposte a colorazione con ematossilina ed eosina. In Figura 20, si può osservare in tutti i tessuti, indipendentemente dal periodo di deprivazione estrogenica e dal trattamento ricevuto *in vivo*, la presenza di un endotelio integro e continuo, senza danni visibili o alterazioni morfologiche. In particolare, non si osservano danni a livello dell'endotelio nei tessuti degli animali trattati con veicolo né in quelli trattati con estrogeni. È perciò verosimile che le variazioni nelle risposte vascolari agli estrogeni osservate negli animali ovariectomizzati da 8 mesi non siano dovute ad alterazioni della morfologia dei vasi, ma a un danno funzionale dell'endotelio.



xii. Espressione di eNOS, peNOS ed ER α nell'endotelio di aorta di ratto

Western blotting

Poichè la vasodilatazione a breve termine indotta dagli estrogeni nei preparati di aorta toracica dipende, oltre che dalla presenza dell'endotelio, dall'incremento della produzione di NO mediata dalla NO sintasi endoteliale (eNOS), è stato verificato se la riduzione della funzionalità endoteliale e delle risposte vascolari degli estrogeni fosse dovuta ad alterazioni dell'espressione della eNOS e della sua forma fosforilata peNOS.

L'espressione di tali enzimi è stata valutata mediante *Western blotting* nei lisati endoteliali di aorta ottenuti da animali trattati con veicolo oppure con 17 β -estradiolo ai diversi tempi di deprivazione estrogenica (Fig. 21). Cellule endoteliali ottenute dalla vena ombelicale (HUVEC) hanno rappresentato il controllo positivo, mentre cellule muscolari lisce ottenute dall'aorta di ratto (RSMC) sono state utilizzate come controllo negativo. Come si può osservare in figura 21A, il trattamento estrogenico sostitutivo ha modulato positivamente l'espressione della proteina eNOS nell'endotelio solo dopo 1 e 4 mesi dall'ovariectomia rispetto al trattamento con veicolo. Al contrario, dopo 8 mesi di deprivazione estrogenica, il rimpiazzo con 17 β -estradiolo non ha indotto un incremento significativo dell'espressione di eNOS. Per quanto riguarda la forma attiva peNOS, l'espressione di questa proteina è aumentata in seguito al trattamento estrogenico *in vivo* dopo 1 e 4 mesi dall'ovariectomia, mentre non è stata modificata dopo 8 mesi di deprivazione estrogenica (Fig. 21B). Le figure riportano l'analisi densitometrica dei livelli delle proteine eNOS e peNOS tramite Western blotting rapportate all'espressione della β -actina.

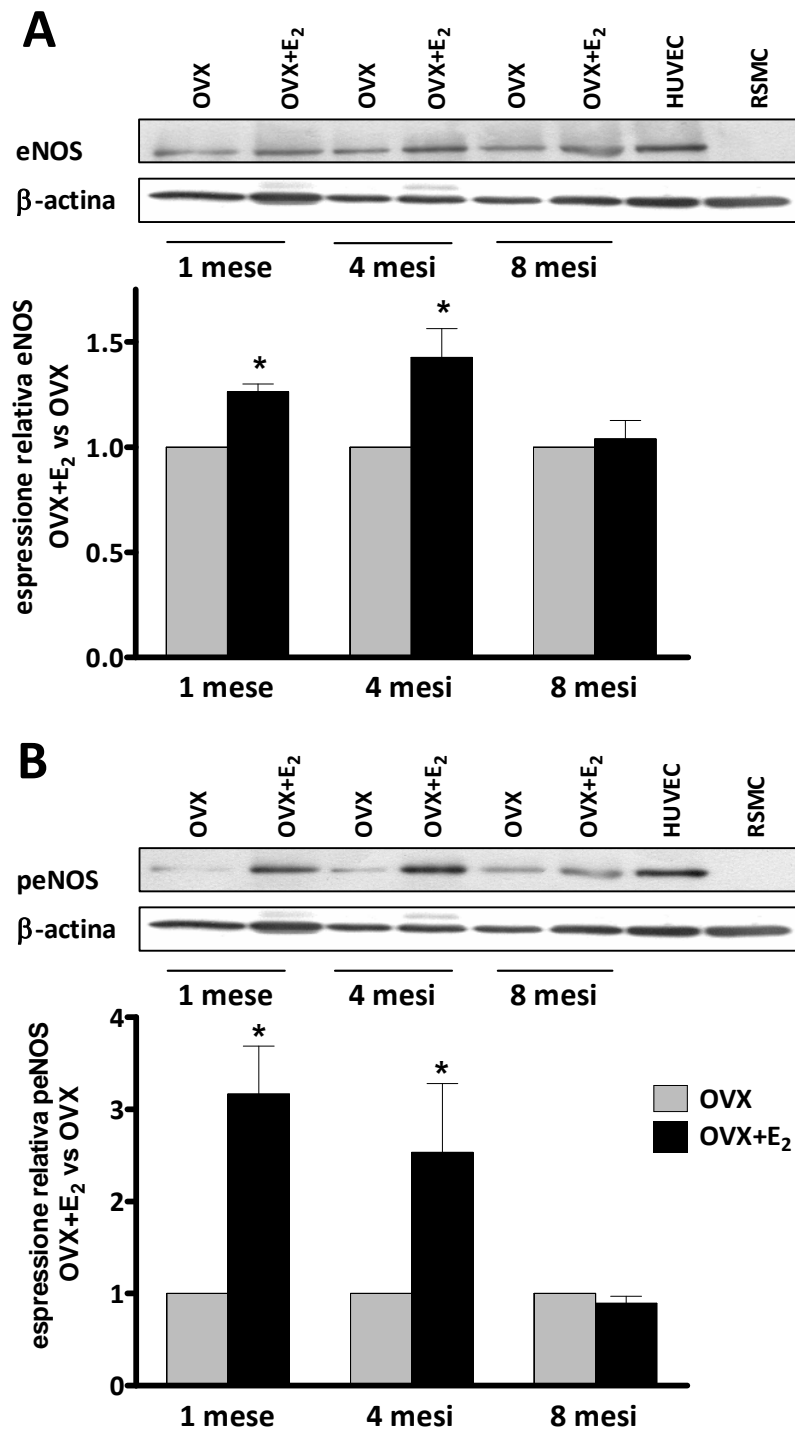


FIGURA 21 *Espressione di eNOS (A) e di peNOS (B) in lisati endoteliali di aorta di ratto ottenuti a diversi tempi dall'ovariectomia.* Nei rispettivi grafici i dati sono stati espressi come incremento relativo dell'espressione delle proteine in seguito a trattamento estrogenico sostitutivo per 5 giorni (OVX+E₂) rispetto al veicolo (OVX). Sono stati caricati 15 μ g di proteina in ciascuna lane.

Real time PCR

L'assenza di risposte vascolari agli estrogeni dopo 8 mesi di deprivazione estrogenica potrebbe anche essere dovuta ad una riduzione dei livelli di espressione di ER α , recettore che in precedenza è stato identificato quale responsabile della vasodilatazione a breve termine indotta dagli estrogeni.

Come si può osservare in figura 22, i livelli di mRNA del recettore ER α , misurati mediante real time PCR quantitativa, sono aumentati nell'endotelio degli animali sottoposti a trattamento estrogenico *in vivo* sia dopo 1 che dopo 8 mesi dall'ovariectomia. Tuttavia, l'espressione di ER α è risultata significativamente ridotta nei lisati endoteliali degli animali sottoposti a deprivazione estrogenica per 8 mesi, indipendentemente dal trattamento ricevuto, rispetto agli animali ovariectomizzati da 1 mese (Fig. 22). È perciò improbabile che un *pool* così ridotto di recettore sia in grado di mediare gli effetti vascolari degli estrogeni dopo un lungo periodo di deprivazione estrogenica. È invece possibile che questi dati riflettano un'interruzione del segnale ER α /eNOS in aorte prive di lesioni morfologiche evidenti.

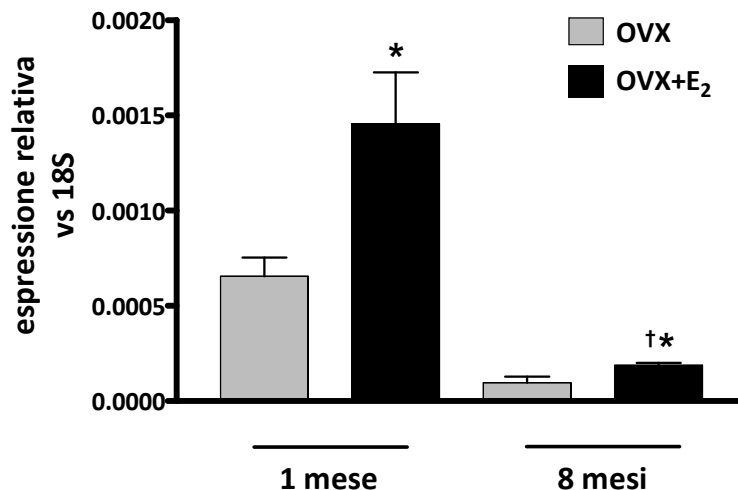


FIGURA 22 *Analisi quantitativa dell'espressione genica di ER α mediante real time PCR.* L'RNA è stato isolato da lisati endoteliali ottenuti da ratti ovariectomizzati da 1 e 8 mesi e trattati con veicolo (OVX) oppure con 17 β -estradiolo (OVX+E₂) per 5 giorni. I dati sono espressi come media \pm SEM rispetto all'espressione del gene *housekeeping* 18S di 3 diversi esperimenti. * p <0.05 vs OVX; † p <0.01 vs (1 mese OVX + E₂).

Immunoistochimica

Infine, l'espressione di eNOS, peNOS e ER α è stata valutata anche tramite analisi immunoistochimica in sezioni di aorta provenienti da ratti OVX trattati con estrogeni *in vivo* dopo 1 e 8 mesi di deprivazione estrogenica.

In figura 23, si può osservare la presenza di eNOS nella parte luminale del vaso sia dopo 1 che dopo 8 mesi di ovariectomia; tuttavia, è difficile rilevare differenze nei due gruppi per quanto riguarda l'espressione di una proteina così abbondante nell'endotelio vascolare. È stata valutata anche l'espressione della forma attiva fosforilata di eNOS (peNOS), che è risultata inferiore negli animali sottoposti a trattamento ormonale dopo 8 mesi di deprivazione estrogenica (fig. 23). Anche la marcatura di ER α , recettore implicato nelle risposte vascolari a breve termine indotte sia dal 17 β -estradiolo che dall'agonista ER α -selettivo PPT, è risultata meno evidente nelle sezioni di animali ovariectomizzati da 8 mesi (fig. 23), a conferma dei risultati ottenuti mediante *real time* PCR.

Il legame non specifico è stato valutato sostituendo l'anticorpo primario con *antibody diluting solution* (ads) nei vetrini di controllo negativo.

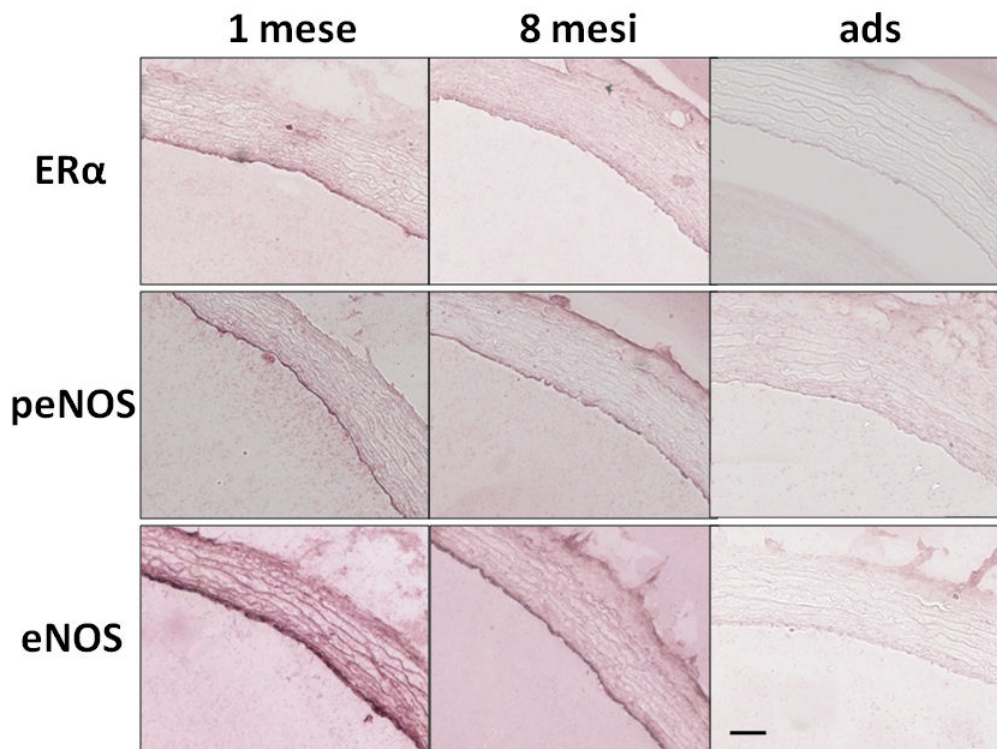


FIGURA 23 *Immunoistochimica per ER α , eNOS e peNOS in sezioni di aorta toracica isolata da ratti a diversi tempi di deprivazione estrogenica (1 e 8 mesi), trattati con 17 β -estradiolo per 5 giorni. Barra = 50 μ m.*

VI. DISCUSSIONE

Nella prima parte di questo studio sono stati approfonditi gli effetti a breve termine indotti dall'agonista ER α -selettivo PPT e dall'agonista ER β -selettivo DPN sulle risposte funzionali di anelli di aorta toracica provenienti da ratti femmine intatti ed ovariectomizzati.

L'agonista ER α -selettivo PPT ha indotto un rilassamento a breve termine dell'aorta e dell'arteria mesenterica di ratti femmine paragonabile al 17 β -estradiolo, ligando naturale dei recettori degli estrogeni. Al contrario, l'agonista ER β -selettivo DPN non ha influenzato in modo significativo il tono vascolare. Questo risultato indica che la vasodilatazione non genomica, già riportata in letteratura per l'estradiolo (Collins et al., 1994; Shaw et al., 2001; Bucci et al., 2002), è mediata solo dal legame con ER α , escludendo quindi il coinvolgimento di ER β . Quanto osservato è in accordo con gli studi di Nilsson e collaboratori (2000), che hanno riportato rilassamenti di maggiore entità nell'aorta di topi *knock-out* per il recettore ER β . Il fenomeno è rilevante sia in vasi di capacitanza, come l'aorta, che in vasi di resistenza, come l'arteria mesenterica superiore.

È inoltre interessante notare che l'effetto, di lieve entità ma comunque significativo, sul tono vascolare è stato qui evidenziato a concentrazioni simili a quelle fisiologiche per quanto riguarda il ligando naturale; anche per il PPT le concentrazioni a cui si verifica la vasodilatazione sono dello stesso ordine di grandezza di quelle usate per l'estradiolo. Queste osservazioni sono in accordo con quanto riportato da Montgomery e collaboratori (2003), che hanno sì evidenziato rilassamenti di notevole entità nell'arteria mesenterica di ratto in seguito a somministrazione acuta di entrambi gli agonisti selettivi, ma hanno utilizzato animali maschi e concentrazioni di farmaci decisamente superiori a quelle fisiologiche.

Alcuni autori hanno attribuito questi effetti all'interazione con recettori degli estrogeni localizzati probabilmente sulla membrana cellulare, come sembrano confermare la rapidità dell'azione, l'inibizione con antagonisti di ER quali ICI182780 e l'utilizzo di composti che non attraversano le membrane, come l'estradiolo coniugato con albumina (Simoncini et al., 2002; Bucci et al., 2002). Altri gruppi sostengono invece che gli effetti vascolari osservati a breve termine non sono ER-dipendenti, ma concordano sul fatto che siano dovuti ad un effetto di membrana (Shaw et al., 2001).

Il coinvolgimento dei recettori degli estrogeni nella vasodilatazione indotta da PPT e 17 β -estradiolo è confermato in questi esperimenti non solo dall'inibizione delle risposte dopo incubazione con l'antagonista non selettivo ICI 162,780, ma soprattutto dal blocco specifico risultante dall'incubazione con l'antagonista ER α -selettivo MPP. Questo composto, divenuto disponibile di recente, ha ridotto in modo concentrazione-dipendente gli effetti vascolari a breve termine degli estrogeni sia nell'aorta che nell'arteria mesenterica superiore di ratto. Questi dati concordano con la recente identificazione di ER di membrana quali dimeri funzionali attivati dal legame con estrogeni (Razandi et al., 2004).

L'effetto vasorilassante riportato in questo lavoro è chiaramente endotelio-dipendente e NO-dipendente, sia per l'agonista ER α -selettivo PPT sia per l'estradiolo, indicando piena sovrapposizione dei meccanismi alla base degli effetti osservati con i due composti. L'attivazione della NO sintasi endoteliale (eNOS) in risposta ad un'esposizione acuta a concentrazioni fisiologiche di estrogeno è già stata documentata in letteratura, sia in vasi isolati (Collins et al., 1994) sia in sistemi di cellule endoteliali (Caulin-Gasler et al., 1996). In un secondo tempo, l'attivazione non genomica della eNOS indotta da estrogeni è stata attribuita all'interazione del ligando con ER α , che attraverso una via di segnale porterebbe alla fosforilazione di eNOS (Chen et al., 1999; Kim et al., 1999); un ruolo di ER α nella modulazione della produzione di NO è stato descritto anche nell'aorta di topi *knock-out* per i recettori degli estrogeni, anche se in questo caso gli effetti sono attribuibili ad un meccanismo genomico (Darblade et al., 2002).

La vasodilatazione indotta da PPT ed estradiolo è stata osservata anche in ratti ovariectomizzati solo dopo trattamento estrogenico sostitutivo per 5 giorni; questo dato indica che i livelli plasmatici di estradiolo influenzano in modo significativo gli effetti a breve termine di agonisti estrogenici. Questa osservazione potrebbe risultare interessante, poiché è stato ipotizzato che il fallimento della terapia ormonale sostitutiva a livello cardiovascolare sia dovuto anche a ritardi nell'inizio del trattamento (Mendelsohn e Karas, 2005). Per questo motivo sono attualmente in corso studi clinici che intendono valutare l'efficacia della terapia estrogenica sostitutiva in relazione al tempo di inizio della stessa.

Alcuni studi hanno mostrato l'importanza dello stato ormonale dell'animale per quanto riguarda le risposte vascolari a breve termine degli estrogeni (Shaw et al., 2001). Questo studio è stato in grado di documentare l'influenza dei livelli di estrogeni circolanti sulla vasodilatazione rapida indotta da PPT ed estradiolo non solo in animali ovariectomizzati, ma

anche in animali che avevano partorito da pochi giorni, in cui le risposte risultavano amplificate (dati non mostrati).

Certamente in questi esperimenti la risposta vascolare osservata è risultata sensibile alla deprivazione da estrogeni; infatti sia PPT che estradiolo hanno completamente perso la loro attività sui vasi dopo l'ovariectomia, ma gli effetti sono stati ripristinati in seguito a trattamento estrogenico sostitutivo per 5 giorni. Il DPN invece non ha mostrato effetti vasoattivi né prima né dopo il trattamento estrogenico, confermando il dato ottenuto in preparazioni provenienti da ratti femmina intatti. L'effetto dell'ovariectomia sulle risposte vascolari potrebbe essere spiegato da una modulazione genomica dell'espressione del recettore ER α oppure della eNOS in relazione ai livelli di ormone fisiologico circolante. Infatti, è interessante notare che concentrazioni fisiologiche di estradiolo modulano l'espressione di entrambe le isoforme dei recettori degli estrogeni in cellule endoteliali (Ihionkhan et al., 2002). D'altra parte è stato anche evidenziato che lo stato ormonale influisce sulla produzione di NO sia nell'uomo che negli animali (Chambliss e Shaul, 2002).

Per approfondire i dati ottenuti nei tessuti *in vitro*, è stato sviluppato un sistema per ottenere colture di cellule endoteliali isolate di aorta di ratto, in cui è stata evidenziata l'espressione di entrambe le isoforme recettoriali e della eNOS tramite *Western blot*.

In conclusione, solo l'agonista ER α -selettivo PPT ha indotto vasodilatazione a breve termine in preparati di aorta e arteria mesenterica di ratti femmine intatti e ovariectomizzati dopo trattamento estrogenico sostitutivo, in modo sovrapponibile al 17 β -estradiolo. Tanto per l'agonista ER α -selettivo quanto per il ligando naturale tale rilassamento è risultato endotelio-dipendente e NO-dipendente. Utilizzando l'antagonista ER α -selettivo MPP, si è dimostrato che l'effetto osservato è mediato dall'interazione con ER α , piuttosto che con ER β , sebbene entrambi le isoforme risultino espresse nelle cellule endoteliali di aorta di ratto. La deprivazione da estrogeni negli animali ovariectomizzati ha completamente abolito la capacità del PPT e dell'estradiolo di indurre rilassamento nei preparati vascolari, evidenziando l'influenza dei livelli ormonali sull'entità delle risposte a breve termine e dunque l'importanza del momento in cui si dà inizio ad una terapia farmacologica con composti estrogenici.

Per valutare questa ipotesi nel nostro modello sperimentale, abbiamo intrapreso esperimenti in cui il protocollo prevedeva l'utilizzo di animali ovariectomizzati per un periodo di tempo maggiore, in modo da mimare una deprivazione da estrogeni a medio e

lungo termine. Abbiamo quindi valutato gli effetti vascolari acuti dei composti estrogenici dopo 4 oppure 8 mesi dall'ovariectomia, paragonandoli con quelli ottenuti in animali ovariectomizzati da 1 mese; inoltre, è stata valutata l'influenza del tempo di ovariectomia anche sulle risposte funzionali agli estrogeni nell'arteria mesenterica superiore. Questo letto vascolare è stato scelto come esempio di sistema vascolare di resistenza, per completare gli esperimenti precedentemente condotti in vasi di capacitanza, come l'aorta. È infatti importante verificare cosa avviene anche in vasi di resistenza, poiché questi contribuiscono in modo determinante all'omeostasi della pressione arteriosa.

In questo modello sperimentale la funzionalità dell'endotelio nel ratto è risultata alterata in seguito ad un periodo prolungato di deprivazione estrogenica. La vasodilatazione indotta da acetilcolina è spesso utilizzata come parametro per determinare la funzionalità endoteliale. Nei ratti ovariectomizzati da 1 e 4 mesi il rilassamento vascolare indotto dall'acetilcolina è stato quasi completo e paragonabile nei ratti trattati con estrogeno e con veicolo, indicando una funzionalità endoteliale preservata. Al contrario, abbiamo osservato una riduzione della vasodilatazione indotta dall'acetilcolina dopo 8 mesi di deprivazione estrogenica, suggerendo una ridotta funzionalità dell'endotelio indipendentemente dal trattamento farmacologico ricevuto. Anche in un sistema vascolare di resistenza, come l'arteria mesenterica superiore, si osserva la riduzione della vasodilatazione indotta dall'acetilcolina dopo 8 mesi di deprivazione estrogenica. A questo proposito, è stato riportato in letteratura che lo stato ormonale può influire sulle risposte vascolari. È stato visto che nelle donne in postmenopausa la somministrazione intracoronarica di estrogeni aumenta la vasodilazione endotelio-dipendente indotta da acetilcolina (Gilligan et al., 1994). Inoltre, la componente NO-dipendente della vasodilatazione indotta da acetilcolina nell'arteria mesenterica di ratto può essere modificata in seguito a variazioni dei livelli ormonali durante la gravidanza, il ciclo estrale e l'ovariectomia (Dalle Lucca et al., 2000; Liu et al., 2001). Diversamente da quanto evidenziato in questa tesi, Sakuma e collaboratori (2002) hanno dimostrato che l'ovariectomia non influisce sulla vasodilatazione indotta da acetilcolina in animali di età paragonabile a quelli utilizzati per questi esperimenti. È stata già osservata comunque una riduzione della vasodilatazione NO-dipendente in seguito ad ovariectomia a lungo termine (6 mesi), anche se il trattamento con estrogeni in questo studio ha corretto tale riduzione (Moien-Afshari et al., 2003). Tali discrepanze possono essere dovute al fatto che il periodo di deprivazione estrogenica era minore oppure al fatto

che il rimpiazzo estrogenico avveniva contestualmente all'ovariectomia. In relazione ai diversi protocolli di ovariectomia e rimpiazzo estrogenico, nonché ai distretti vascolari presi in considerazione, sono state riportate risposte aumentate (Pelligrino et al., 2000) oppure invariate (Bolego et al., 1997; Case e Davison, 1999; Nawate et al., 2005) all'acetilcolina in seguito al trattamento con estrogeni *in vivo*.

Anche la vasodilatazione a breve termine indotta dagli estrogeni è risultata ridotta in seguito a 8 mesi di ovariectomia. Infatti, dopo 4 mesi l'agonista ER α -selettivo PPT ha indotto ancora un rilassamento di entità paragonabile a quello del 17 β -estradiolo solo negli animali sottoposti a rimpiazzo estrogenico, in modo del tutto analogo a quanto osservato dopo 1 mese. Tuttavia, quando la deprivazione estrogenica è stata protratta fino a 8 mesi, il PPT e l'estradiolo non hanno indotto vasodilatazione a breve termine dell'aorta toracica né in assenza né in presenza di estrogeni circolanti, ovvero il rimpiazzo con estrogeni non è stato efficace nel ripristinare le risposte vasodilatanti. Questi dati sono in accordo con le alterazioni della funzionalità endoteliale osservate dopo un lungo periodo di deprivazione estrogenica per quanto riguarda la risposta all'acetilcolina. Anche nell'arteria mesenterica 17 β -estradiolo e PPT hanno indotto vasodilatazione solo negli animali che hanno ricevuto il trattamento con estrogeni *in vivo* dopo 1 e 4 mesi, mentre questo effetto è venuto meno dopo 8 mesi dall'ovariectomia. Si evidenzia perciò un quadro complessivo di alterazioni della funzionalità endoteliale sia nei vasi di capacitanza che nei vasi di resistenza; tali alterazioni non sembrano associate a patologie vascolari, ma sembrano dovute alla semplice riduzione dei livelli fisiologici di estrogeni circolanti per un periodo di tempo prolungato.

Questi risultati potrebbero essere spiegati: 1) da una diversa modulazione genomica della eNOS o della sua attività; 2) da alterazioni dell'espressione del recettore ER α in relazione ai livelli di ormone fisiologico circolante ed alla durata della deprivazione estrogenica. È ormai noto che queste due proteine sono organizzate in un *network* funzionale localizzato sulla membrana delle cellule endoteliali. In particolare, l'attività e l'espressione di eNOS sono modulate in seguito all'attivazione genomica e non genomica di ER α .

L'ovariectomia a lungo termine (3 mesi) non modula direttamente l'espressione di ER α nell'aorta toracica, sebbene modifichi l'espressione del recettore in altri tessuti (Mohamed e Abdel-Rahman, 2000); la riduzione di estrogeni in circolo potrebbe comunque indurre perdita di funzionalità del recettore, ripristinata dalla somministrazione tempestiva del suo ligando fisiologico o di un agonista selettivo, quale Cpd 1471 (Widder et al., 2003). È inoltre

interessante notare che concentrazioni fisiologiche di estradiolo modulano l'espressione di entrambe le isoforme dei recettori degli estrogeni in cellule endoteliali (Ihionkhan et al., 2002). In questi esperimenti, è anche ipotizzabile che un periodo prolungato di deprivazione estrogenica possa infine alterare i livelli di espressione di ER α . Questi risultati potrebbero essere attribuiti, almeno in parte, alla diminuita espressione di ER α osservata nell'endotelio vascolare degli animali ovariectomizzati da 8 mesi rispetto a quelli operati da 1 mese. Infatti, sebbene il trattamento estrogenico sostitutivo sia in grado di modulare positivamente l'espressione di ER α sia dopo 1 che 8 mesi di deprivazione estrogenica, i livelli di mRNA di ER α a 8 mesi sono significativamente inferiori rispetto a quelli osservati dopo 1 mese.

È stato anche evidenziato che lo stato ormonale influisce sulla produzione basale e stimolata di NO (Chambliss e Shaul, 2002). Infatti, il trattamento estrogenico aumenta la sensibilità del microcircolo coronarico a vasodilatatori NO-dipendenti in cavie ovariectomizzate (Thompson et al., 2000). Inoltre, variazioni dell'espressione e dell'attività della eNOS in relazione allo stato ormonale sono state osservate sia a livello vascolare (McNeill et al., 1999; Gonzales et al., 2001) che a livello cardiaco (Jankowski et al., 2005). L'attivazione della eNOS in risposta all'esposizione acuta a concentrazioni fisiologiche di estrogeno è già stata documentata in letteratura, sia in vasi isolati (Collins et al., 1994) sia in sistemi di cellule endoteliali (Caulin-Gasler et al., 1996) ed è stata attribuita all'interazione con ER α (Chen et al., 1999; Kim et al., 1999). È stata perciò valutata l'espressione di eNOS nell'endotelio di aorta di ratto.

Tramite Western blotting sono stati rilevati livelli di espressione di eNOS più elevati nei lisati endoteliali di aorta di ratti ovariectomizzati trattati con estrogeni *in vivo* rispetto a quelli trattati con veicolo dopo 1 e 4 mesi dall'ovariectomia. Questo risultato è in accordo con l'aumentata espressione di eNOS riportata in letteratura in diversi distretti vascolari in seguito a trattamento cronico con estrogeni (McNeill et al., 1999; Gonzales et al., 2001). Al contrario, il trattamento con estrogeni non è risultato efficace dopo 8 mesi di deprivazione estrogenica. La maggiore espressione di eNOS negli animali trattati con estrogeni potrebbe apparire in contrasto con la riduzione delle risposte a vasodilatatori NO-dipendenti, come l'acetilcolina o gli estrogeni. Tuttavia, anche in letteratura l'aumento di espressione di eNOS non è sempre correlato ad un incremento della vasodilatazione NO-dipendente (Cernadas et al., 1998).

Uno dei possibili meccanismi che portano alla rapida attivazione della eNOS indotta da estrogeni è l'aumento del grado di fosforilazione della proteina stessa. Tale modificazione post-trasduzionale porta all'incremento dell'attività dell'enzima, riducendone la dipendenza dalla concentrazione intracellulare di Ca^{2+} e dalla calmodulina (Fulton et al., 2001). È stata quindi verificata l'espressione della eNOS fosforilata (peNOS) in animali a diversi tempi di deprivazione estrogenica. In questo caso il rimpiazzo estrogenico è stato in grado di regolare positivamente l'espressione della peNOS dopo 1 e dopo 4 mesi dall'ovariectomia, mentre non ha influito sulla fosforilazione della eNOS dopo 8 mesi di deprivazione estrogenica. Questi dati biochimici sono in accordo con gli esperimenti di funzionalità e confermano che un periodo prolungato di deprivazione estrogenica prima dell'inizio della terapia ormonale sostitutiva modifica, in modo forse irreversibile, alcuni aspetti della funzionalità endoteliale, in primo luogo l'espressione della proteina responsabile della produzione di NO e quindi la capacità di rispondere ad agenti vaso dilatanti inizialmente attivata da $\text{ER}\alpha$. Complessivamente, ripristinando dopo un breve periodo i livelli fisiologici di estrogeni circolanti, si osserva una modulazione dell'espressione sia di eNOS e peNOS che di $\text{ER}\alpha$; al contrario, quando il rimpiazzo con estrogeni avviene dopo 8 mesi di ovariectomia, il complesso funzionale costituito da eNOS e $\text{ER}\alpha$ sembra compromesso e non sensibile all'intervento farmacologico. Questi dati sono stati poi confermati in esperimenti di immunistochemica utilizzando anelli di aorta toracica di animali ovariectomizzati e trattati con 17β -estradiolo: eNOS e peNOS sono presenti a livello endoteliale sia dopo 1 che dopo 8 mesi di deprivazione estrogenica, mentre la marcatura di $\text{ER}\alpha$ è ridotta dopo 8 mesi. Inoltre, questi risultati sono in accordo con i dati degli esperimenti *ex vivo* condotti sia nell'aorta toracica che nell'arteria mesenterica superiore.

È infine importante ricordare che questi danni funzionali sono stati osservati in vasi sani, privi di lesioni a livello endoteliale, come evidenziato dagli esperimenti di istologia. Infatti, in letteratura è stato riportato che i livelli di ER diminuiscono in vasi aterosclerotici (Losordo et al., 1994), mentre questa è la prima volta che la diminuzione dei livelli di $\text{ER}\alpha$ è stata osservata dopo un periodo prolungato di deprivazione estrogenica in assenza di lesioni macroscopiche.

Questi dati forniscono una base sperimentale alla cosiddetta *timing hypothesis*, che attribuisce al tempo intercorso tra l'inizio della menopausa e l'inizio della terapia estrogenica sostitutiva un ruolo decisivo per osservare effetti protettivi a livello cardiovascolare. Ad

ulteriore conferma dell'importanza del tempo di inizio della terapia estrogenica, un recente lavoro ha evidenziato come anche gli effetti neuroprotettivi ed anti-infiammatori dell'estradiolo siano annullati da una prolungata carenza di estrogeni (Suzuki et al., 2007). Questi risultati mettono in luce come la semplice mancanza di livelli fisiologici di estrogeni, ottenuta mediante ovariectomia, per un periodo prolungato possa indurre un danno funzionale a livello dell'endotelio, che diventa insensibile al trattamento estrogenico sostitutivo. D'altra parte, è interessante notare che il trofismo dell'utero aumenta in modo significativo in tutti i gruppi di animali trattati con estrogeni *in vivo*, confermando quindi l'efficacia della terapia ormonale sostitutiva nel modulare effetti genomici, sebbene in tessuti diversi da quello vascolare, in modo indipendente dalla durata della deprivazione estrogenica. Ulteriori studi sono in corso per stabilire se un intervento farmacologico più aggressivo, caratterizzato da un periodo di rimpiazzo più lungo o un dosaggio superiore, possa ripristinare gli effetti vascolari degli estrogeni dopo 8 mesi dall'ovariectomia in termini di espressione proteica e di risposte funzionali.

BIBLIOGRAFIA

- Al Zubair K, Razak A, Bexis S, Docherty JR (2005) Relaxations to oestrogen receptor subtype selective agonists in rat and mouse arteries *Eur J Pharmacol* **513**:101-8.
- Alderton WK, Cooper CE, Knowles RG (2001) Nitric oxide synthase: structure, function and inhibition *Biochem J* **357**:593-615.
- Andersen HI, Weis JU, Fjalland B, Korsgaard N (1999) Effect of acute and long-term treatment with 17 β -estradiol on the vasomotor responses in the rat aorta *Br J Pharmacol* **126**:159-68.
- Anderson SE, Kirkland DM, Beyschau A, Cala PM (2005) Acute effects of 17 β -estradiol on myocardial pH, Na⁺, and Ca²⁺ and ischemia-reperfusion injury *Am J Physiol Cell Physiol* **288**:C57-64.
- Arnal JF, Clamens S, Pechet C, Negre-Salvayre A, Allera C, Girolami JP, Salvayre R, Bayard F (1996) Ethinylestradiol does not enhance the expression of nitric oxide synthase in bovine endothelial cells but increases the release of bioactive nitric oxide by inhibiting superoxide anion production *Proc Natl Acad Sci USA* **93**:4108-13.
- Barkhem T, Nilsson S, Gustafsson JA (2004) Molecular mechanisms, physiological consequences and pharmacological implications of estrogen receptor action *Am J Pharmacogenomics* **4**:19-28.
- Barrett-Connor E (1997) Sex differences in coronary heart disease: why are women so superior? The 1995 Ancel Keys Lecture *Circulation* **95**:252-64.
- Barrett-Connor E, Grady D (1998) Hormone replacement therapy, heart disease, and other considerations *Annu Rev Public Health* **19**:55-72.
- Best PJ, Berger PB, Miller VM, Lerman A (1998) The effect of estrogen replacement therapy on plasma nitric oxide and endothelin-1 levels in postmenopausal women *Ann Intern Med* **128**:285-8.
- Birge SS (2006) Estrogen and stroke: a case for low-dose estrogen *Menopause* **13**:719-20.
- Bolego C, Cignarella A, Ruzza R, Zaarour C, Messi E, Zanisi M, Puglisi L (1997) Differential effects of low- and high-dose estrogen treatments on vascular responses in female rats *Life Sci* **60**:2291-302.
- Bolego C, Vegeto E, Pinna C, Maggi A, Cignarella A (2006) Selective agonists of estrogen receptor isoforms - new perspectives for cardiovascular disease *Arterioscler Thromb Vasc Biol* **26**:2192-9.
- Boo YC, Jo H (2003) Flow-dependent regulation of endothelial nitric oxide synthase: role of protein kinases *Am J Physiol Cell Physiol* **285**:C499-508.
- Booth EA, Obeid NR, Lucchesi BR (2005) Activation of estrogen receptor- α protects the in vivo rabbit heart from ischemia-reperfusion injury *Am J Physiol Heart Circ Physiol* **289**:H2039-47.
- Brouchet L, Krust A, Dupont S, Chambon P, Bayard F, Arnal JF (2001) Estradiol accelerates reendothelialization in mouse carotid artery injury through estrogen receptor- α but not estrogen receptor- β *Circulation* **103**:423-8.
- Bucci M, Roviezzo F, Cicala C, Pinto A, Cirino G. (2002) 17 β -Oestradiol-induced vasorelaxation in vitro is mediated by eNOS through hsp90 and Akt/PKB dependent mechanism *Br J Pharmacol* **135**:1695-700.
- Butt E, Bernhardt M, Smolenski A, Kotsonis P, Frohlich LG, Sickmann A, Meyer HE, Lohmann SM, Schmidt HH (2000) Endothelial nitric-oxide synthase (type III) is activated and becomes calcium independent upon phosphorylation by cyclic nucleotide-dependent protein kinases *J Biol Chem* **275**:5179-87.
- Case J, Davison CA (1999) Estrogen alters relative contributions of nitric oxide and cyclooxygenase products to endothelium-dependent vasodilation *J Pharmacol Exp Ther* **291**:524-30.
- Caulin-Glaser T, Watson CA, Pardi R, Bender JR (1996) Effects of 17 β -estradiol on cytokine-induced endothelial cell adhesion molecule expression *J Clin Invest* **98**:36-42.
- Cernadas MR, Sanchez de Miguel L, Garcia-Duran M, Gonzalez-Fernandez F, Millas I, Monton M, Rodrigo J, Rico L, Fernandez P, de Frutos T, Rodriguez-Feo JA, Guerra J, Caramelo C, Casado S, Lopez-Farre A (1998) Expression of constitutive and inducible nitric oxide synthases in the vascular wall of young and aging rats *Circ Res* **83**:279-86.
- Chambliss KL, Shaul PW (2002) Estrogen modulation of endothelial nitric oxide synthase *Endocrine Reviews* **23**:665-86.
- Chan NN, MacAllister RJ, Colhoun HM, Vallance P, Hingorani AD (2001) Changes in endothelium-dependent vasodilatation and α -adrenergic responses in resistance vessels during the menstrual cycle in healthy women *J Clin Endocrinol Metab* **86**:2499-504.

- Chataigneau T, Schini-Kerth VB (2005) Vascular effects of ovariectomy and chronic oestrogen treatment in rats: controversy or experimental protocol diversity? *Br J Pharmacol* **144**:161-3.
- Chen Z, Yuhanna IS, Galcheva-Gargova Z, Karas RH, Mendelsohn ME, Shaul PW (1999) Estrogen receptor α mediates the nongenomic activation of endothelial nitric oxide synthase by estrogen *J Clin Investig* **103**:401-6.
- Chen ZP, Mitchelhill KI, Michell BJ, Stapleton D, Rodriguez-Crespo I, Witters LA, Power DA, Ortiz de Montellano PR, Kemp BE (1999) AMP-activated protein kinase phosphorylation of endothelial NO synthase *FEBS Lett* **443**:285-9.
- Chidambaram M, JOHN A, Duncan JA, Lai VS, Cattran DC, Floras JS, Scholey JW, Miller JA (2002) Variation in the Renin Angiotensin System throughout the Normal Menstrual Cycle *J Am Soc Nephrol* **13**: 446-52.
- Cignarella A, Paoletti R, Puglisi L (2001) Direct effects of estrogen on the vessel wall *Med Res Rev* **21**:171-84.
- Clarkson TB, Appt SE (2005) Controversies about HRT--lessons from monkey models *Maturitas* **51**:64-74.
- Colditz GA, Willett WC, Stampfer MJ, Rosner B, Speizer FE, Hennekens CH (1987) Menopause and the risk of coronary heart disease in women *N Engl J Med* **316**:1105-10.
- Collins P, Shay J, Jiang C, Moss J (1994) Nitric oxide account for dose-dependent estrogen-mediated coronary relaxation after acute estrogen withdrawal *Circulation* **90**:1964-8.
- Cornwell TL, Arnold E, Boerth NJ, Lincoln TM. (1994) Inhibition of smooth muscle cell growth by nitric oxide and activation of cAMP-dependent protein kinase by cGMP *Am J Physiol Cell Physiol* **267**:C1405-13.
- Dai-Do D, Espinosa E, Liu G, Rabelink TJ, Julmy F, Yang Z, Mahler F, Luscher TF (1996) 17 β -estradiol inhibits proliferation and migration of human vascular smooth muscle cells: similar effects in cells from postmenopausal females and in males *Cardiovasc Res* **32**:980-5.
- Darblade B, Pendaries C, Krust A, Dupont S, Fouque MJ, Rami J, Chambon P, Bayard F, Arnal JF (2002) Estradiol alters nitric oxide production in the mouse aorta through the α -, but not β -, estrogen receptor *Circ Res* **90**:413-9.
- Davison S, Davis SR (2003) New markers for cardiovascular disease risk in women: impact of endogenous estrogen status and exogenous postmenopausal hormone therapy *J Clin Endocrinol Metab* **88**:2470-8.
- Dedio J, Konig P, Wohlfart P, Schroeder C, Kummer W, Muller-Esterl W (2001) NOSIP, a novel modulator of endothelial nitric oxide synthase activity *FASEB J* **15**:79-89.
- Dimmeler S, Fleming I, Fisslthaler B, Hermann C, Busse R, Zeiher AM (1999) Activation of nitric oxide synthase in endothelial cells by Akt-dependent phosphorylation *Nature* **399**:601-5.
- Ding Y and Vaziri ND (1998) Calcium channel blockade enhances nitric oxide synthase expression by cultured endothelial cells *Hypertension* **32**:718-23.
- Dubey RK, Gillespie DG, Zacharia LC, Imthurn B, Jackson EK, Keller PJ (2000) Clinically used estrogens differentially inhibit human aortic smooth muscle cell growth and MAP kinase activity *Arterioscler Thromb Vasc Biol* **20**:964-72.
- Dubey RK, Imthurn B, Barton M, Jackson EK (2005) Vascular consequences of menopause and hormone therapy: importance of timing of treatment and type of estrogen *Cardiovasc Res* **66**:295-306.
- Dubey RK, Imthurn B, Zacharia LC, Jackson EK (2004) Hormone Replacement Therapy and Cardiovascular Disease What Went Wrong and Where Do We Go From Here? *Hypertension* **44**:789-95.
- Dubey RK, Oparil S, Imthurn B, Jackson EK (2002) Sex hormones and hypertension *Cardiovasc Res* **53**:688-708.
- Dubey RK, Tyurina YY, Tyurin VA, Gillespie DG, Branch RA, Jackson EK, Kagan VE (1999) Estrogen and tamoxifen metabolites protect smooth muscle cell membrane phospholipids against peroxidation and inhibit cell growth *Circ Res* **84**:229-39.
- Edwards DP (2005) Regulation of signal transduction pathways by estrogen and progesterone *Ann Rev Physiol* **67**:335-76.
- English JL, Jacobs LO, Green G, Andrews TC (1998) Effect of the menstrual cycle on endothelium-dependent vasodilation of the brachial artery in normal young women *Am J Cardiol* **82**:256-8.
- Florian M, Freiman A, Magder S (2004) Treatment with 17 β -estradiol reduces superoxide production in aorta of ovariectomized rats *Steroids* **69**:779-87.
- Florian M, Lu Y, Angle M, Magder S (2004) Estrogen induced changes in Akt-dependent activation of endothelial nitric oxide synthase and vasodilation *Steroids* **69**:637-45.

- Freay AD, Curtis SW, Korach KS, Rubanyi GM (1997) Mechanism of vascular smooth muscle relaxation by estrogen in depolarized rat and mouse aorta: role of nuclear estrogen receptor and Ca²⁺ uptake *Circ Res* **81**:242-8.
- Fulton D, Gratton JP, McCabe TJ, Fontana J, Fujio Y, Walsh K, Franke TF, Papapetropoulos A, Sessa WC (1999) Regulation of endothelium-derived nitric oxide production by the protein kinase Akt *Nature* **399**:597-601.
- Fulton D, Gratton JP, Sessa WC (2001) Post-translational control of endothelial nitric oxide synthase: why calcium/calmodulin enough? *J Pharmacol Exp Ther* **299**:818-24.
- Galien R, Garcia T (1997) Estrogen receptor impairs interleukin-6 expression by preventing protein binding on the NF-kappaB site *Nucleic Acids Res* **25**:2424-29.
- Gallis B, Corthals GL, Goodlett DR, Ueba H, Kim F, Presnell SR, Figeys D, Harrison DG, Berk BC, Aebersold R, Corson MA (1999) Identification of flow-dependent endothelial nitric-oxide synthase phosphorylation sites by mass spectrometry and regulation of phosphorylation and nitric oxide production by the phosphatidylinositol 3-kinase inhibitor LY294002 *J Biol Chem* **274**:30101-8.
- Garcia PM, Gimenez J, Bonacasa B, Carbonell LF, Miguel SG, Quesada T, Hernandez I (2005) 17 β -Estradiol exerts a beneficial effect on coronary vascular remodeling in the early stages of hypertension in spontaneously hypertensive rats *Menopause* **12**:453-9.
- Garcia-Cardena G, Fan R, Shah V, Sorrentino R, Cirino G, Papapetropoulos A, Sessa WC (1998) Dynamic activation of endothelial nitric oxide synthase by Hsp90 *Nature* **392**:821-4.
- Garcia-Cardena G, Martasek P, Masters BS, Skidd PM, Couet J, Li S, Lisanti MP, Sessa WC (1997) Dissecting the interaction between nitric oxide synthase (NOS) and caveolin. Functional significance of the NOS caveolin binding domain in vivo *J Biol Chem* **272**:25437-40.
- Geary GG, McNeill AM, Ospina JA, Krause DN, Korach KS, Duckles SP (2001) Genome and hormones: gender differences in physiology. Selected contribution: cerebrovascular NOS and cyclooxygenase are unaffected by estrogen in mice lacking estrogen receptor- α *J Appl Physiol* **91**:2391-9.
- Gewaltig MT, Kojda G (2002) Vasoprotection by nitric oxide: mechanisms and therapeutic potential *Cardiovasc Res* **55**:250-60.
- Gilligan DM, Quyyumi AA, Cannon III RO (1994) Effects of physiological levels of estrogen on coronary vasomotor function in postmenopausal women *Circulation* **89**:2545-51.
- Gonzales RJ, Walker BR, Kanagy NL (2001) 17 β -Estradiol increases nitric oxide-dependent dilation in rat pulmonary arteries and thoracic aorta *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* **280**:L555-64.
- Goudev A, Georgiev DB, Koycheva N, Manasiev N, Kyurkchiev S (2002) Effects of low dose hormone replacement therapy on markers of inflammation in postmenopausal women *Maturitas* **43**:49-53.
- Govers R, Oess S (2004) To NO or not to NO: 'where?' is the question *Histol Histopathol* **19**: 585-605.
- Grady D, Herrington D, Bittner V, Blumenthal R, Davidson M, Hlatky M, Hsia J, Hulley S, Herd A, Khan S, Newby LK, Waters D, Vittinghoff E, Wenger N (2002) Cardiovascular disease outcomes during 6.8 years of hormone therapy: Heart and Estrogen/progestin Replacement Study follow-up (HERS II) *JAMA* **288**:49-57.
- Grattan DR, Rocca MS, Strauss KI, Sagrillo CA, Selmanoff M, McCarthy MM (1996) GABAergic neuronal activity and mRNA levels for both forms of glutamic acid decarboxylase (GAD65 and GAD67) are reduced in the diagonal band of Broca during the afternoon of proestrous *Brain Res* **733**:46-55.
- Green S, Walter P, Kumar V, Krust A, Bornert JM, Argos P, Chambon P (1986) Human oestrogen receptor cDNA: sequence, expression and homology to v-erb-A *Nature* **320**:134-9.
- Grodstein F, Clarkson TB, Manson JE (2003) Understanding the divergent data on postmenopausal hormone therapy *N Engl J Med* **348**:645-50.
- Grodstein F, Manson JE, Colditz GA, Willett WC, Speizer FE, Stampfer MJ (2000) A prospective, observational study of postmenopausal hormone therapy and primary prevention of cardiovascular disease *Ann Intern Med* **133**:933-41.
- Grodstein F, Manson JE, Stampfer MJ (2006) Hormone therapy and coronary heart disease: the role of time since menopause and age at hormone initiation *J Womens Health (Larchmt)* **15**:35-44.
- Gruber CJ, Tschugguel W, Schneeberger C, Huber JC (2002) Mechanisms of disease: production and action of estrogens *N Engl J Med* **346**:340-52.

- Guetta V, Quyyumi AA, Prasad A, Panza JA, Waclawiw M, Cannon III RO (1997) The role of nitric oxide in coronary vascular effects of estrogen in postmenopausal women *Circulation* **96**:2795-801.
- Guo X, Razandi M, Pedram A, Kassab G, Levin ER (2005) Estrogen induces vascular wall dilation *J Biol Chem* **280**:19704-10.
- Gustafsson JÅ (2003) What pharmacologists can learn from recent advances in estrogen signalling *Trends Pharmacol Sci* **24**:479-85.
- Harman SM, Brinton EA, Cedars M, Lobo R, Manson JE, Merriam GR, Miller VM, Naftolin F, Santoro N (2005) KEEPS: The Kronos Early Estrogen Prevention Study *Climacteric* **8**:3-12.
- Harrington WR, Sheng S, Barnett DH, Petz LN, Katzenellenbogen JA, Katzenellenbogen BS (2003) Activities of estrogen receptor alpha- and beta-selective ligands at diverse estrogen responsive gene sites mediating transactivation or transrepression *Mol Cell Endocrinol* **206**:13-22.
- Harris HA (2007) Estrogen Receptor- β : Recent Lessons from in Vivo Studies *Mol Endocrinol* **21**:1-13.
- Harris HA, Katzenellenbogen JA, Katzenellenbogen BS (2002) Characterization of the Biological Roles of the Estrogen Receptors, ER α and ER β , in Estrogen Target Tissues *in Vivo* through the Use of an ER α -Selective Ligand *Endocrinology* **143**:4172-7.
- Hayashi T, Yamada K, Esaki T, Kuzuya M, Satake S, Ishikawa T, Hidaka H, Iguchi A (1995) Estrogen increases endothelial nitric oxide by a receptor-mediated system *Biochem Biophys Res Commun* **214**:847-55.
- Hayward CS, Webb CM, Collins P (2001) Effect of sex hormones on cardiac mass *Lancet* **357**:1354-6.
- Herrington DM, Braden GA, Williams JK, Morgan TM (1994) Endothelial-dependent coronary vasomotor responsiveness in postmenopausal women with and without estrogen replacement therapy *Am J Cardiol* **73**:951-2.
- Hillier SG, Whitelaw PF, Smyth CD (1994) Follicular estrogen synthesis: the "two-cell, two gonadotrophin" model revisited *Mol Cell Endocrinol* **100**:147-72.
- Hillisch A, Peters O, Kosemund D, Muller G, Walter A, Schneider B, Reddersen G, Elger W, Fritzmeier KH (2004) Dissecting physiological roles of estrogen receptor α and β with potent selective ligands from structure-based design *Mol Endocrinol* **18**:1599-609.
- Hisamoto K, Ohmichi M, Kurachi H, Hayakawa J, Kanda Y, Nishio Y, Adachi K, Tasaka K, Miyoshi E, Fujiwara N, Taniguchi N, Murata Y (2001) Estrogen induces the Akt-dependent activation of endothelial nitric-oxide synthase in vascular endothelial cells *J Biol Chem* **276**:3459-67.
- Hishikawa K, Nakaki T, Marumo T, Suzuki H, Kato R, Saruta T (1995) Up-regulation of nitric oxide synthase by estradiol in human aortic endothelial cells *FEBS Lett* **360**:291-3.
- Hodis HN, Mack WJ, Lobo RA, Shoupe D, Sevanian A, Mahrer PR, Selzer RH, Liu CR, Liu CH, Azen SP (2001) Estrogen in the prevention of atherosclerosis. A randomized, double-blind, placebo-controlled trial *Ann Intern Med* **135**:939-53.
- Hu FB, Grodstein F, Hennekens CH, Colditz GA, Johnson M, Manson JE, Rosner B, Stampfer MJ (1999) Age at natural menopause and risk of cardiovascular disease *Arch Intern Med* **159**:1061-6.
- Huang PL, Huang Z, Mashimo H, Bloch KD, Moskowitz MA, Bevan JA, Fishman MC (1995) Hypertension in mice lacking the gene for endothelial nitric oxide synthase *Nature* **377**:239-42.
- Hulley S, Grady D, Bush T, Furberg C, Herrington D, Riggs B, Vittinghoff E (1998) Randomized trial of estrogen plus progestin for secondary prevention of coronary heart disease in postmenopausal women. Heart and Estrogen/progestin Replacement Study (HERS) Research Group *JAMA* **280**:605-13.
- Idel S, Ellinghaus P, Wolfrum C, Nofer JR, Gloerich J, Assmann G, Spener F, Seedorf U (2002) Branched chain fatty acids induce nitric oxide-dependent apoptosis in vascular smooth muscle cells *J Biol Chem* **277**:49319-25.
- Ignar-Trowbridge D, Teng TC, Ross KA, Parker MG, Korach KS, McLachlan JA (1993) Peptide growth factors elicit estrogen receptor-dependent transcriptional activation of an estrogen-responsive element *Mol Endocrinol* **7**:992-8.
- Ihionkhan CE, Chambliss KL, Gibson LL, Hahner LD, Mendelsohn ME, Shaul PW (2002) Estrogen causes dynamic alterations in endothelial estrogen receptor expression *Circ Res* **91**:814-20.
- Jankowski M, Wang D, Mukaddam-Daher S, Gutkowska J (2005) Pregnancy alters nitric oxide synthase and natriuretic peptide systems in the rat left ventricle *J Endocrinology* **184**:209-17.

- Jensen J, Nilas L, Christiansen C (1990) Influence of menopause on serum lipids and lipoproteins *Maturitas* **12**:321-31.
- Johns A, Freay AD, Fraser W, Korach KS, Rubanyi GM (1996) Disruption of estrogen receptor gene prevents 17 β -estradiol-induced angiogenesis in transgenic mice *Endocrinology* **137**:4511-3.
- Kausar K, Rubanyi GM (1994) Gender difference in bioassayable endothelium-derived nitric oxide from isolated rat aortae *Am J Physiol* **267**:H2311-7.
- Kim HP, Lee JY, Jeong JK, Bae SW, Lee HK, Jo I (1999) Nongenomic stimulation of nitric oxide release by estrogen is mediated by estrogen receptor- α localized in caveolae *Biochem Biophys Res Commun* **263**:257-62.
- Kiss AL, Turi A, Mullner N, Kovacs E, Botos E, Greger A (2005) Oestrogen-mediated tyrosine phosphorylation of caveolin-1 and its effect on the oestrogen receptor localisation: an in vivo study *Mol Cell Endocrinol* **245**:128-37.
- Kleinert H, Wallerath T, Euchenhofer C, Ihrig-Biedert I, Li H, Forstermann U (1998) Estrogens increase transcription of the human endothelial NO synthase gene: analysis of the transcription factors involved *Hypertension* **31**:582-8.
- Knowles RG, Moncada S (1994) Nitric oxide synthases in mammals *Biochem J* **298**:249-58.
- Koh KK, Shin MS, Sakuma I, Ahn JY, Jin DK, Kim HS, Kim DS, Han SH, WJ, Shin EK (2004) Effects of Conventional or Lower Doses of Hormone Replacement Therapy in Postmenopausal Women *Arterioscler Thromb Vasc Biol* **24**:1516-21.
- Kolodgie FD, Farb A, Litovsky SH, Narula J, Jeffers LA, Lee SJ, Virmani R (1997) Myocardial protection of contractile function after global ischemia by physiologic estrogen replacement in the ovariectomized rat *J Mol Cell Cardiol* **29**: 2403-14.
- Kraichely DM, Sun J, Katzenellenbogen JA, Katzenellenbogen BS (2000) Conformational changes and coactivator recruitment by novel ligands for estrogen receptor- α and estrogen receptor- β : correlations with biological character and distinct differences among SRC coactivator family members *Endocrinology* **141**:3534-45.
- Kublickiene K, Svedas E, Landgren BM, Crisby M, Nahar N, Nisell H, Poston L (2005) Small artery endothelial dysfunction in post-menopausal women: *in vitro* function, morphology and modification by estrogen and SERMs *J Clin Endocrinol Metab* **90**:6113-22.
- Kuiper GG, Carlsson B, Grandien K, Enmark E, Häggblad J, Nilsson S, Gustafsson JA (1997) Comparison of the ligand binding and transcript tissue distribution of estrogen receptors alpha and beta *Endocrinology* **138**: 863-70.
- Kuiper GGJM, Enmark E, Pelto Huikko M, Nilsson S, Gustafsson JA (1996) Cloning of a novel estrogen receptor expressed in rat prostate and ovary *Proc Natl Acad Sci USA* **93**:5925-30.
- Lam KK, Ho ST, Yen MH (2002) Tetrahydrobiopterin improves vascular endothelial function in ovariectomized rats *J Biomed Sci* **9**:119-125.
- Lapchak PA (1991) Effect of estradiol treatment on β -endorphin content and release in the female rat hypothalamus *Brain Res* **554**:198-202.
- Larsen JA, Kadish AH (1998) Effects of gender on cardiac arrhythmias *J Cardiovasc Electrophysiol* **9**:655-64.
- Li L, Page Haynes MP, Bender JR (2003) Plasma membrane localization and function of the estrogen receptor α variant (ER46) in human endothelial cells *Proc Natl Acad Sci USA* **100**:4807-12.
- Losel RM, Falkstein E, Feuring M, Schultz A, Tillmann HC, Rossol-Haseroth K, Wehling M (2003) Nongenomic steroid action: controversies, questions and answers *Physiol Rev* **83**:955-1016.
- Losordo DW, Kearney M, Kim EA, Jekanowski J, Isner JM (1994) Variable expression of the estrogen receptor in normal and atherosclerotic coronary arteries of premenopausal women *Circulation* **89**:1501-10.
- Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ (1951) Protein measurement with folin phenol reagent. *J Biol Chem* **193**:265-7.
- Maffei S, Mercuri A, Zucchelli GC, Vassalle C (2006) Estrogen therapy effects on different vasoactive factors in recent postmenopausal healthy women *Int J Cardiol* **107**:194-9.
- Majmudar NG, Robson SC, Ford GA (2000) Effects of the menopause, gender, and estrogen replacement therapy on vascular nitric oxide activity *J Clin Endocrinol Metab* **85**:1577-83.

- McNagny SE (1999) Prescribing hormone replacement therapy for menopausal symptoms *Ann Intern Med* **131**:605-16.
- McNeill AM, Kim N, Duckles SP, Krause DN (1999) Chronic estrogen treatment increases levels of endothelial nitric oxide synthase protein in rat cerebral microvessels *Stroke* **30**:2186-90.
- Mendelsohn ME, Karas RH (1999) The protective effects of estrogen on the cardiovascular system *N Engl J Med* **340**:1801-11.
- Mendelsohn ME, Karas RH (2005) Molecular and cellular basis of cardiovascular gender differences *Science* **308**:1583-7.
- Mercurio G, Vitale C, Fini M, Zoncu S, Leonardo F, Rosano GM (2003) Lipid profile and endothelial function with low-dose hormone replacement therapy in postmenopausal women at risk for coronary artery disease: a randomized trial *Int J Cardiol* **89**:257-65.
- Michel JB, Feron O, Sacks D, Michel T (1997) Reciprocal regulation of endothelial nitric-oxide synthase by Ca^{2+} -calmodulin and caveolin *J Biol Chem* **272**:15583-6.
- Michell BJ, Griffiths JE, Mitchelhill KI, Rodriguez-Crespo I, Tiganis T, Bozinovski S, de Montellano PR, Kemp BE, Pearson RB (1999) The Akt kinase signals directly to endothelial nitric oxide synthase *Curr Biol* **9**:845-8.
- Mikkola T, Turunen P, Avela K, Orpana A, Viinikka L, Ylikorkala O. (1995) 17beta-estradiol stimulates prostacyclin, but not endothelin-1, production in human vascular endothelial cells *J Clin Endocrinol Metab* **80**:1832-6.
- Modena MG, Sismondi P, Mueck AO, Kuttann F, de Lignieres B, Verhaeghe J, Foidart JM, Caufriez A, Genazzani AR - The TREAT Collaborative Study Group (2005) New evidence regarding hormone replacement therapies is urgently required. Transdermal postmenopausal hormone therapy differs from oral hormone therapy in risks and benefits *Maturitas* **52**:1-10.
- Mohamed MK, Abdel-Rahman AA (2000) Effect of long-term ovariectomy and estrogen replacement on the expression of estrogen receptor gene in female rats *Eur J Endocrinol* **142**:307-14.
- Moien-Afshari F, Kenyon E, Choy JC, Battistini B, McManus BM, Laher I (2003) Long-term effects of ovariectomy and estrogen replacement treatment on endothelial function in mature rats *Maturitas* **45**:213-23.
- Moncada S, Higgs A (1993) The L-arginine-nitric oxide pathway *N Engl J Med* **329**:2002-12.
- Montgomery S, Shaw L, Pantelides N, Taggart M, Austin C (2003) Acute effects of oestrogen receptor subtype-specific agonists on vascular contractility *Br J Pharmacol* **139**:1249-53.
- Morey AK, Razandi M, Pedram A, Hu RM, Prins BA, Levin ER (1998) Oestrogen and progesterone inhibit the stimulated production of endothelin-1 *Biochem J* **330**:1097-105.
- Mosca L, Collins P, Herrington DM, Mendelsohn ME, Pasternak RC, Robertson RM, Schenck-Gustafsson K, Smith SC, Taubert KA, Wenger NK (2001) Hormone replacement therapy and cardiovascular disease *Circulation* **104**:499-503.
- Mugge A, Riedel M, Barton M, Kuhn M, Lichtlen PR (1993) Endothelium independent relaxation of human coronary arteries by 17 beta-oestradiol in vitro *Cardiovasc Res* **27**:1939-42.
- Nathan L, Chaudhuri G (1997) Estrogens and atherosclerosis *Annu Rev Pharmacol Toxicol* **37**:477-515.
- Nathan L, Pervin S, Singh R, Rosenfeld M, Chaudhuri G (1999) Estradiol inhibits leukocyte adhesion and transendothelial migration in rabbits in vivo: possible mechanisms for gender differences in atherosclerosis *Circ Res* **85**:377-85.
- Nawate S, Fukao M, Sakuma I, Soma T, Nagai K, Takikawa O, Miwa S, Kitabatake A (2005) Reciprocal changes in endothelium-derived hyperpolarizing factor- and nitric oxide-system in the mesenteric artery of adult female rats following ovariectomy *Br J Pharmacol* **144**:178-89.
- Nechmad A, Merin G, Schwab H, Shimon DV, Borman JB, Milgalter E, Mosseri M (1998) Estrogen induces nitric oxide-mediated vasodilation of human mammary arteries in vitro *Nitric Oxide* **2**:460-6.
- Nickenig G, Baumer AT, Grohe C, Kahlert S, Strehlow K, Rosenkranz S, Stäblein A, Beckers F, Smits JF, Daemen MJ, Vetter H, Böhm M (1998) Estrogen modulates AT1 receptor gene expression in vitro and in vivo *Circulation* **97**:2197-201.
- Nilsson BO, Ekblad E, Heine T, Gustafsson JA (2000) Increased magnitude of relaxation to oestrogen in aorta from oestrogen receptor β knock-out mice *J Endocrinol* **166**:R5-9.
- Nilsson S, Makela S, Treuter E, Tujague M, Thomsen J, Andersson G, Enmark E, Pettersson K, Warner M, Gustafsson JA (2001) Mechanisms of estrogen action *Physiol Rev* **81**:1535-65.

- Nisticò G, Bagetta G, Mollace V (1996) Farmacologia del nitrossido (*Farmacologia generale e molecolare* a cura di Francesco Clementi e Guido Fumagalli, pag. 312-21).
- Paech K, Webb P, Kuiper GG, Nilsson S, Gustafsson JA, Kushner PJ, Scanlan TS (1997) Differential ligand activation of estrogen receptors ER α and ER β at AP1 sites *Science* **277**:1508-10.
- Pare G, Krust A, Karas RH, Dupont S, Aronovitz M, Chambon P, Mendelsohn ME (2002) Estrogen receptor- α mediates the protective effects of estrogen against vascular injury *Circ Res* **90**:1087-92.
- Pedram A, Razandi M, Aitkenhead M, Hughes CCW, Levin ER (2002) Integration of the non-genomic and genomic actions of estrogen - Membrane-initiated signaling by steroid to transcription and cell biology *J Biol Chem* **277**:50768-75.
- Pelligrino DA, Ye S, Tan F, Santizo RA, Feinstein DL, Wang Q (2000) Nitric-oxide-dependent pial arteriolar dilation in the female rat: effects of chronic estrogen depletion and repletion *Biochem Biophys Res Commun* **269**:165-71.
- Pelzer T, Jazbutyte V, Hu K, Segerer S, Nahrendorf M, Nordbeck P, Bonz AW, Muck J, Fritzscheier KH, Hegele-hertung C, Ertl G, Neyses L (2005) The estrogen receptor- α agonist 16-LE₂ inhibits cardiac hypertrophy and improves hemodynamic function in estrogen-deficient spontaneously hypertensive rats *Cardiovascular Res* **67**:604-12.
- Pinto S, Viridis A, Ghiadoni L, Bernini G, Lombardo M, Petraglia F, Genazzani AR, Taddei S, Salvetti A (1997) Endogenous estrogen and acetylcholine-induced vasodilation in normotensive women *Hypertension* **29**:268-73.
- Pratt WB (1997) The role of the Hsp90-based chaperone system in signal transduction by nuclear receptors and receptors signaling via MAP kinase *Annu Rev Pharmacol Toxicol* **37**:297-326.
- Razandi M, Pedram A, Merchenthaler I, Greene GL, Levin ER (2004) Plasma membrane estrogen receptors exist and functions as dimers *Mol Endocrinol* **18**:2854-65.
- Reis SE, Gloth ST, Blumenthal RS, Resar JR, Zacur HA, Gerstenblith G, Brinker JA (1994) Ethinyl estradiol acutely attenuates abnormal coronary vasomotor responses to acetylcholine in postmenopausal women *Circulation* **89**:52-60.
- Revankar CM, Cimino DF, Sklar LA, Arterburn JB, Prossnitz ER (2005) A transmembrane intracellular estrogen receptor mediates rapid cell signaling *Science* **307**:1625-30.
- Rubanyi GM, Freay AD, Kauser K, Sukovich D, Burton G, Lubahn DB, Couse JF, Curtis SW, Korach KS (1997) Vascular estrogen receptors and endothelium-derived nitric oxide production in the mouse aorta. Gender difference and effect of estrogen receptor gene disruption *J Clin Invest* **99**:2429-37.
- Russell KS, Haynes MP, Caulin-Glaser T, Rosneck J, Sessa WC, Bender JR (2000) Estrogen stimulates heat shock protein 90 binding to endothelial nitric oxide synthase in human vascular endothelial cells. Effects on calcium sensitivity and NO release *J Biol Chem* **275**:5026-30.
- Russell KS, Haynes MP, Sinha D, Clerisme E, Bender JR (2000) Human vascular endothelial cells contain membrane binding sites for estradiol, which mediate rapid intracellular signaling *Proc Natl Acad Sci USA* **97**:5930-5.
- Sack MN, Rader DJ, Cannon RO III (1994) Oestrogen and inhibition of oxidation of low-density lipoproteins in postmenopausal women *Lancet* **343**:269-70.
- Sakuma I, Liu MY, Sato A, Hayashi T, Iguchi A, Kitabatake A, Hattori Y (2002) Endothelium-dependent hyperpolarization and relaxation in mesenteric arteries of middle-aged rats: influence of oestrogen *Br J Pharmacol* **135**:48-54.
- Schlegel A, Wang C, Pestell RG, Lisanti MP (2001) Ligand-independent activation of oestrogen receptor alpha by caveolin-1 *Biochem J* **359**:203-10.
- Schunkert H, Danser AHJ, Hense HW, Derckx FHM, Kurzinger S, Riegger GAJ (1997) Effects of estrogen replacement therapy on the renin-angiotensin system in postmenopausal women *Circulation* **95**:39-45.
- Seed M, Knopp RH (2004) Estrogens, lipoproteins, and cardiovascular risk factors: an update following the randomized placebo-controlled trials of hormone-replacement therapy *Curr Opin Lipidol* **15**:459-67.
- Shaul PW (2002) Regulation of nitric oxide synthase: Location, Location, Location *Annu Rev Physiol* **64**:749-74.
- Shaw L, Taggart MJ, Austin C (2000) Mechanisms of 17 β -oestradiol induced vasodilatation in isolated pressurized rat small arteries *Br J Pharmacol* **129**:555-65.

- Shaw L, Taggart MJ, Austin C (2001) Effects of oestrous cycle and gender on acute vasodilatory responses of isolated pressurized rat mesenteric arteries to 17 β -oestradiol *Br J Pharmacol* **132**:1055-62.
- Shughrue PJ, Lane MV, Merchenthaler I (1997) Comparative distribution of estrogen receptor-alpha and -beta mRNA in the rat central nervous system *J Comp Neurol* **388**:507-25.
- Shwaery GT, Vita JA, Keaney JF J. (1997) Antioxidant protection of LDL by physiological concentrations of 17 β -estradiol: requirement for estradiol modification *Circulation* **95**:1378-85.
- Simoncini T, Fornari L, Mannella P, Varone G, Caruso A, Liao JK, Genazzani AR (2002) Novel non-transcriptional mechanisms for estrogen receptor signaling in the cardiovascular system. Interaction of estrogen receptor alpha with phosphatidylinositol 3-OH kinase *Steroids* **67**:935-9.
- Smith AR, Visioli F, Hagen TM (2006) Plasma membrane-associated endothelial nitric oxide synthase and activity in aging rat aortic vascular endothelia markedly decline with age *Arch Biochem Biophys* **454**:100-5.
- Sorensen KE, Dorup I, Hermann AP, Mosekilde L (1998) Combined hormone replacement therapy does not protect women against the age-related decline in endothelium-dependent vasomotor function *Circulation* **97**:1234-8.
- Stampfer MJ, Colditz GA, Willett WC, Manson JE, Rosner B, Speizer FE, Hennekens CH (1991) Postmenopausal estrogen therapy and cardiovascular disease. Ten-year follow-up from the Nurses' Health Study. *N Engl J Med* **325**:756-62.
- Stirone C, Boroujerdi A, Duckles SP, Krause DN (2005) Estrogen Receptor Activation of Phosphoinositide-3 Kinase, Akt, and Nitric Oxide Signaling in Cerebral Blood Vessels: Rapid and Long-Term Effects *Mol Pharmacol* **67**:105-13.
- Stirone C, Duckles SP, Krause DN (2003) Multiple forms of estrogen receptor-alpha in cerebral blood vessels: regulation by estrogen *Am J Physiol Endocrinol Metab* **284**:E184-92.
- Sun J, Huang YR, Harrington WR, Sheng S, Katzenellenbogen JA, Katzenellenbogen BS (2002) Antagonists selective for estrogen receptor *Endocrinology* **143**:941-7.
- Sun J, Meyers MJ, Fink BE, Rajendran R, Katzenellenbogen JA, Katzenellenbogen BS (1999) Novel ligands that function as selective estrogens or antiestrogens for estrogen receptor- α or estrogen receptor- β *Endocrinology* **140**:800-4.
- Suzuki S, Brown CM, Dela Cruz CD, Yang E, Bridwell DA, Wise PM (2007) Timing of estrogen therapy after ovariectomy dictates the efficacy of its neuroprotective and antiinflammatory actions. *Proc Natl Acad Sci USA* **104**:6013-8.
- Syridopoulos I, Sullivan AB, Kearney M, Isner JM, Losordo DW (1997) Estrogen-receptor-mediated inhibition of human endothelial cell apoptosis: estradiol as a survival factor *Circulation* **95**:1505-14.
- Teede HJ, McGrath BP, Smolich JJ, Malan E, Kotsopoulos D, Liang YL, Peverill RE (2000) Postmenopausal hormone replacement therapy increases coagulation activity and fibrinolysis *Arterioscler Thromb Vasc Biol* **20**:1404-9.
- The Writing Group for the PEPI Trial (1995) Effects of estrogen or estrogen/progestin regimens on heart disease risk factors in postmenopausal women: the Postmenopausal Estrogen/Progestin Interventions (PEPI) Trial *JAMA* **273**:199-208.
- Tschudi MR, Barton M, Bersinger NA, Moreau P, Cosentino F, Noll G, Malinski T, Luscher TF (1996) Effect of age on kinetics of nitric oxide release in rat aorta and pulmonary artery *J Clin Invest* **98**:899-905.
- Turgeon JL, Carr MC, Maki PM, Mendelsohn ME, Wise PM (2006) Complex actions of sex steroids in adipose tissue, the cardiovascular system, and brain: Insights from basic science and clinical studies *Endocr Rev* **27**:575-605.
- Vegeto E, Belcredito S, Eterri S, Ghisletti S, Brusadelli A, Meda C, Krust A, Dupont S, Ciana P, Chambon P, Maggi A (2003) Estrogen receptor-alpha mediates the brain antiinflammatory activity of estradiol *Proc Natl Acad Sci USA* **100**:9614-9.
- Walsh BW, Kuller LH, Wild RA, Paul S, Farmer M, Lawrence JB, Shah AS, Anderson PW (1998) Effects of raloxifene on serum lipids and coagulation factors in healthy postmenopausal women *JAMA* **279**:1445-51.
- Weiner CP, Lizasoain I, Baylis SA, Knowles RG, Charles IG, Moncada S (1994) Induction of calcium-dependent nitric oxide synthases by sex hormones *Proc Natl Acad Sci USA* **91**:5212-6.

- Wellman GC, Bonev AD, Nelson MT, Brayden JE (1996) Gender differences in coronary artery diameter involve estrogen, nitric oxide, and Ca²⁺-dependent K⁺ channels *Circ Res* **79**:1024-30.
- Widder J, Pelzer T, von Poser-Klein C, Hu K, Jazbutyte V, Fritzscheier KH, Hegele-Hartung C, Neyses L, Bauersachs J (2003) Improvement of endothelial dysfunction by selective estrogen receptor- α stimulation in ovariectomized SHR *Hypertension* **42**:991-6.
- Writing Group for the Women's Health Initiative Investigators (2002) Risks and Benefits of Estrogen Plus Progestin in Healthy Postmenopausal Women: Principal Results From the Women's Health Initiative Randomized Controlled Trial *JAMA* **288**:321-33.
- Ylikorkala O, Orpana A, Puolakka J, Pyorala T, Viinikka L (1995) Postmenopausal hormonal replacement decreases plasma levels of endothelin-1 *J Clin Endocrinol Metab* **80**:3384-7.
- Zaitseva M, Yue DS, Katzenellenbogen JA, Rogers PAW, Gargett CE (2004) Estrogen receptor- α agonists promote angiogenesis in human myometrial microvascular endothelial cells *J Soc Gynecol Investig* **11**:529-35.
- Zeiher AM, Drexler H, Saurbier B, Just H (1993) Endothelium-mediated coronary blood flow modulation in humans. Effects of age, atherosclerosis, hypercholesterolemia, and hypertension *J Clin Invest* **92**:652-62.
- Zhu W, Smart EJ (2003) Caveolae, estrogen and nitric oxide *Trends Endocrinol Metab* **14**:114-7.