

**UNIVERSITA' DEGLI STUDI DI NAPOLI
"FEDERICO II"**



**DOTTORATO DI RICERCA IN
FISIOPATOLOGIA CLINICA E SPERIMENTALE**

XXII Ciclo – 2006 - 2009

COORDINATORE: PROF. GIANNI MARONE

TESI DI DOTTORATO

**Effetti pro atero-trombotici della leptina su cellule
endoteliali coronariche umane**

Tutore

Ch.mo Prof.

Massimo Chiariello

Candidato

Dott.

Salvatore De Rosa

INDICE

Introduzione	pagina 3
Materiali e metodi	pagina 11
Risultati	pagina 28
Discussione	pagina 37
Bibliografia	pagina 50
Legenda alle Figure	pagina 66
Figure	pagina 73

INTRODUZIONE

E' noto che l'obesità rappresenta uno dei principali fattori di rischio per lo sviluppo di patologie cardiovascolari [1,2]. Recenti evidenze sperimentali hanno dimostrato come il tessuto adiposo non sia soltanto impegnato nella regolazione del metabolismo energetico ma svolgerebbe anche un ruolo più complesso, agendo come una sorta di organo endocrino [3, 4]. Questa funzione verrebbe esplicata attraverso la produzione di molecole dotate di attività biologica come il fattore di necrosi tissutale (TNF), l'interleuchina 6 (IL-6) e l'inibitore dell'attivatore del plasminogeno di tipo 1 (PAI-1), oltre ad una classe di molecole note con "adipochine", cui appartengono la leptina, la resistina e l'adiponectina [5]. Tra queste, l'adiponectina eserciterebbe un ruolo protettivo nei confronti dei processi aterosclerotici [6], mentre non esistono dati univoci circa il ruolo relativo della resistina e della leptina nei meccanismi di tale patologia.

La leptina è un polipeptide formato da 167 amminoacidi, codificato dal gene *ob*, implicato nella regolazione del peso corporeo e del bilancio energetico [7]. Negli ultimi anni, numerose evidenze sperimentali e cliniche hanno dimostrato che tale peptide potrebbe essere coinvolto nella patogenesi della sindrome metabolica [8-13]. Infatti, elevati livelli plasmatici di leptina sono solitamente dosabili nel plasma di pazienti obesi. Inoltre, è stato dimostrato che tali pazienti presenterebbero una spiccata resistenza recettoriale per la leptina [14,15].

In particolare, Soderberg et al. hanno osservato concentrazioni plasmatiche di leptina significativamente più elevate rispetto al normale in pazienti con infarto acuto del miocardio o con ictus [16-18]. Inoltre, Wallace et al. hanno evidenziato come l'associazione tra elevati livelli sierici di leptina ed ipercolesterolemia si correli ad un aumentato rischio di andare incontro ad infarto del miocardio e procedure di rivascolarizzazione coronarica [19].

In questo contesto, particolarmente interessante è la correlazione esistente tra obesità, elevati livelli plasmatici di leptina e patologia cardiovascolare aterosclerotica.

La fisiopatologia della malattia aterosclerotica riconosce un ruolo estremamente importante al reclutamento delle cellule mononucleate circolanti sulla parete vasale ed alla loro successiva migrazione nello spazio subendoteliale. Le cellule migrate nel subendotelio andrebbero poi incontro a trasformazione in “cellule schiumose”, responsabili a loro volta della costituzione delle cosiddette strie lipidiche. Queste ultime rappresentano il nucleo iniziale su cui si strutturerebbero poi le placche ateromasiche propriamente dette, caratterizzate da un nucleo lipidico centrale [20,21].

La migrazione cellulare attraverso l’endotelio vasale è mediata dalle molecole di adesione cellulare (CAMs), normalmente non espresse dalle cellule endoteliali. L’espressione di tali molecole sulla superficie luminale avviene infatti soltanto in seguito a stimoli infiammatori ed aterogeni [22,23].

Tra le varie molecole di adesione cellulare, la molecola di adesione intercellulare di tipo 1 (ICAM-1) e la molecola di adesione cellulare vascolare di tipo 1 (VCAM-1), sembrano rivestire un ruolo cardinale nella mediazione di tali fenomeni [22-24].

In fasi più avanzate della malattia aterosclerotica, l'esposizione al flusso di sangue circolante della tromboplastina tissutale, nota anche come fattore tissutale (Tissue Factor, TF) ne determina il legame con il fattore VII della coagulazione (FVII), con conseguente formazione del complesso TF/FVIIa, in grado di innescare fenomeni di trombosi intravascolare, come si verifica nelle sindromi coronariche acute [25].

Il TF è una glicoproteina di membrana responsabile dell'attivazione della via estrinseca della coagulazione: essa, infatti, legandosi al fattore VII (FVII), lo trasforma nella sua forma attiva, FVIIa. Il complesso TF/FVIIa esercita quindi attività enzimatica sul fattore X e sul fattore IX, trasformandoli nelle rispettive forme attive, FXa e FIXa. La via estrinseca prosegue quindi attraverso la cosiddetta via comune fino alla formazione di trombina [26].

Nella parete vascolare il TF è ampiamente rappresentato nell'avventizia e nella tonaca media, laddove si trovano numerose cellule muscolari lisce [27]. Al contrario, tale molecola non è espressa sulla superficie delle cellule endoteliali, normalmente in contatto con il sangue circolante in cui è veicolato il FVII. In tali cellule la trascrizione del RNA messaggero (mRNA) per il TF è virtualmente assente in condizioni fisiologiche, mentre può essere attivata dall'esposizione a specifici stimoli, come il lipopolisaccaride batterico (LPS), alcune citochine, ed i radicali liberi dell'ossigeno, con la conseguente espressione del TF sulla superficie delle cellule endoteliali [28,29]. Tale evento determina infine non soltanto l'attivazione della via estrinseca della coagulazione, con conseguenze deleterie per la pervietà vasale, ma è responsabile dell'attivazione di diversi meccanismi di traduzione del segnale responsabili di fenomeni quali la proliferazione cellulare e l'induzione di nuovi pattern di espressione genica, con effetti proinfiammatori [30,31].

Negli ultimi anni, un crescente numero di evidenze ha evidenziato la presenza di un forte legame tra la malattia

aterosclerotica ed i processi infiammatori nella parete vascolare. Parallelamente, il ruolo della proteina C-reattiva (PCR) quale predittore di futuri eventi cardiovascolari è stato riportato in numerosi studi, sia in soggetti apparentemente sani che in pazienti con note patologie cardiovascolari [32-34]. In seguito a tali osservazioni, la ricerca su questa molecola ha subito un notevole impulso portando ad una crescente mole di evidenze sperimentali sul ruolo di tale proteina nella fisiopatologia dell'aterotrombosi, laddove questa veniva tradizionalmente considerata un semplice indice della reazione infiammatoria di fase acuta [35-37]. La PCR è abitualmente sintetizzata nel fegato, in seguito alla stimolazione da parte di citochine quali l'interleuchina-1 (IL-1), l'interleuchina-6 (IL-6) ed il fattore di necrosi tumorale (TNF) [38]. In aggiunta, recenti evidenze suggeriscono come la PCR possa essere sintetizzata anche da altre popolazioni cellulari, tra cui le cellule muscolari lisce [39] e gli adipociti [40]. Inoltre, livelli elevati di PCR sono stati riportati in arterie [41] ed in bypass venosi [42] di soggetti affetti da aterosclerosi. Infine, elevati livelli plasmatici di PCR sono stati

riscontrati in soggetti obesi [43], suggerendo un potenziale legame tra i processi metabolici, l'infiammazione e la malattia aterosclerotica.

Gli inibitori dell'idrossimetil-glutaril coenzima-A reductasi (HMG-CoA), noti comunemente come "statine", rappresentano attualmente uno dei cardini della prevenzione cardiovascolare primaria e secondaria, grazie alla notevole quantità di evidenze sperimentali accumulate nel corso degli anni [44-47]. In particolare, è stato dimostrato come questi farmaci esercitino il loro effetto protettivo riducendo l'incidenza di eventi cardiovascolari maggiori non solo in pazienti ipercolesterolemici [45], ma anche in pazienti con normali livelli plasmatici di colesterolo [46]. Inoltre, numerose evidenze sperimentali hanno evidenziato, sia in modelli animali che nell'uomo, come tali farmaci siano in grado di agire stabilizzando la placca ateromasica, antagonizzandone la progressione e contrastando lo sviluppo della proliferazione neointimale [48-50]. Tali effetti sono evidentemente indipendenti dalla semplice riduzione dei livelli plasmatici di colesterolo [47-50], tuttavia i meccanismi coinvolti nel

modulare tali effetti cosiddetti “pleiotropici” restano in gran parte sconosciuti.

In tale contesto, scopo del nostro studio è stato di valutare - in vitro - gli effetti della leptina sull'espressione del Tissue Factor, delle molecole di adesione VCAM-1 ed ICAM-1 e della proteina C-reattiva in cellule endoteliali coronariche umane, indagandone i meccanismi molecolari. Inoltre, sono stati valutati i potenziali effetti protettivi esercitati dagli inibitori dell'HMG-CoA reduttasi sulla sintesi e l'espressione leptina-indotta di tali molecole.

MATERIALI E METODI

Gli esperimenti sono stati condotti utilizzando cellule endoteliali coronariche umane (HCAECs, Cambrex Bio Science, Walkersville, USA), coltivate in mezzo di coltura Endothelial Growth Medium-2 (EGM-2; Cambrex Bio Science, Walkersville, USA) arricchito con un pool di fattori di crescita per cellule endoteliali e siero fetale bovino al 10%. Le cellule sono state utilizzate tra il 2° ed il 5° passaggio al 90% venivano utilizzate per gli esperimenti. E' stata utilizzata leptina ricombinante umana (Sigma Chemical Co., St Louis, USA).

Al fine di escludere eventuali contaminazioni dei materiali e dei reagenti utilizzati con endotossina batterica (LPS), che avrebbe potuto mimare l'azione della leptina sulle cellule endoteliali, è stato utilizzato un saggio specifico, il limulus assay (BioWhittaker), che ha riscontrato bassi livelli di contaminazione con livelli di endotossina <0.125 EU/mL (<12.5 pg/mL).

Effetti della leptina sul m-RNA specifico per il TF.

Gli effetti della leptina sulla trascrizione del mRNA del TF sono stati valutati tramite Real-Time PCR (Polymerase Chain Reaction), dopo trascrizione inversa degli estratti. Le HCAECs venivano incubate per 30 minuti con leptina (10 ng/ml), livello di concentrazione comprendente la concentrazione media di leptina osservata nel plasma dei pazienti a più alto rischio per patologie cardiovascolari [10-15]. Le cellule venivano quindi lavate con PBS ed incubate nuovamente con mezzo fresco (EGM-2 con 0,1% siero). L'mRNA totale veniva estratto al tempo zero ed a 30, 60 e 120 minuti dopo stimolazione con leptina.

I campioni così ottenuti venivano retrotrascritti per ottenere un pool di cDNA che venivano successivamente analizzati mediante "Real Time" Polimerase Chain Reaction. Cellule endoteliali incubate per 30' con LPS (50µg/ml), stimolo noto per indurre espressione del TF, servivano da controllo positivo. Viceversa, cellule non stimolate venivano utilizzate come controllo negativo.

Cento nanogrammi di RNA totale per ogni singolo campione venivano amplificati in triplicato in un volume di reazione di 50 µl utilizzando il sistema “ABI PRISM 5700 sequence detector” (Applied Biosystems, Foster City, USA), secondo un protocollo messo a punto in precedenza, incubando i campioni a 50° C per 2 minuti, poi a 95° C per 10 minuti e poi sottoposti a 40 cicli articolati come segue: 15” a 95°C ed 1’ a 60°C. Gli specifici oligonucleotidi per GAPDH e TF umani venivano disegnati sulla base delle sequenze pubblicate, utilizzando il software PRIMER EXPRESS (Applied Biosystems) e convalidati per la loro specificità. La rilevazione della fluorescenza e la quantificazione veniva effettuata utilizzando il sistema “SYBR-green chemistry” (Applied Biosystems, Foster City, USA), utilizzando uno standard interno.

Effetti della leptina sull’espressione e sull’attività del TF.

Cellule endoteliali coronariche umane venivano incubate con concentrazioni crescenti di leptina (10, 20, 50 ng/ml) per sei ore, al termine delle quali si procedeva alla valutazione dell’espressione del

TF attraverso un'analisi FACS. In breve, le cellule venivano staccate dal fondo della piastra di coltura al termine dell'incubazione con 10 mmol/L di EDTA in PBS in assenza di tripsina ed incubate con anticorpo monoclonale coniugato con R-phicoerytrin e diretti contro TF. Il controllo era rappresentato da anticorpi diretti contro l'appropriato isotipo IgG. L'intensità della fluorescenza veniva valutata utilizzando un analizzatore FACSCalibur (Becton-Dickinson, Franklin Lakes, USA).

Al fine di investigare se le molecole di TF espresse sulla superficie cellulare dopo stimolazione con la leptina fossero funzionalmente attive, in esperimenti aggiuntivi veniva dosata l'attività procoagulante del Tissue Factor, mediante un substrato cromogenico. Al termine del periodo di incubazione, le cellule endoteliali coronariche umane venivano lavate con PBS ed incubate con PBS/albumina 1% a 37°C per 60', al fine di bloccare i siti di legame aspecifici, successivamente queste venivano incubate con FVIIa (20nM Novo Nordisk A/S Gentofte, Denmark) in presenza di ioni calcio (5mM CaCl₂) a 37°C per 10'. Le cellule venivano quindi

lavate abbondantemente con PBS, per rimuovere il FVIIa non legato, e successivamente incubate per 30' con FX (175nM Calbiochem-Novobiochem, La Jolla, CA, USA) substrato per l'attività catalitica del complesso TF/FVIIa. La quantità di FXa prodotto, espressione del Tissue Factor di superficie espresso dalle cellule endoteliali coronariche umane, veniva misurato tramite l'aggiunta di uno specifico substrato cromogenico per il FXa (Cromozym X, Boheringer Mannheim). Le variazioni di densità ottica a 405 nm venivano quantificate tramite metodica spettrofotometrica e convertite in unità di attività del Tissue Factor tramite una retta di taratura ottenuta con diluizioni standard di Tissue Factor umano ricombinante. In un altro set di esperimenti, al fine di investigare se l'aumento dell'attività del TF sulla superficie cellulare indotta dalla leptina fosse dovuta a sintesi *de novo* della proteina oppure allo smascheramento di un pool di TF già sintetizzato ma presente all'interno della cellula in forma inattiva (criptica) [51], le cellule venivano pre-incubate con cycloeximide, un inibitore della sintesi proteica, o con 5,6-dicloro-1- β -D-ribofuranosilbenzimidazolo (DRB,

10µg/ml), un inibitore della trascrizione del DNA, prima di essere stimulate con leptina (10 ng/ml). Infine, in altro set di esperimenti, sono stati investigati i potenziali effetti protettivi esercitati dalla lovastatina, un inibitore della HMG-CoA reduttasi, nel prevenire gli effetti della leptina sull'induzione del TF. Cellule endoteliali coronariche umane venivano coltivate in mezzo di coltura completo ed arricchito con lovastatina (1µM). Giunte al 90% della confluenza, le cellule venivano stimulate con leptina e processate come sopra indicato.

Effetti della leptina sull'espressione di VCAM-1 e ICAM-1.

Cellule endoteliali coronariche umane venivano incubate per 12 ore con concentrazioni crescenti di leptina (10, 20, 50 ng/ml) e successivamente processate come descritto sopra. Anticorpi monoclonali diretti specificamente contro VCAM-1 (CD106), ICAM-1 (CD54) venivano utilizzati per valutare l'espressione delle molecole di adesione presenti sulla superficie cellulare.

Anche in tal caso l'intensità della fluorescenza veniva valutata utilizzando un analizzatore FACSCalibur (Becton-Dickinson, Franklin Lakes, USA).

HCAECs stimulate con LPS (50 μ g/ml) per 12 ore, venivano utilizzate come controllo positivo; viceversa, cellule non stimulate rappresentavano il controllo negativo.

Al fine di valutare se le molecole di adesione espresse sulla superficie cellulare a seguito della stimolazione con la leptina fossero funzionalmente attive, in un ulteriore set di esperimenti abbiamo investigato gli effetti della leptina sull'adesività dei leucociti sulle cellule endoteliali coronariche umane. In un primo momento, i leucociti del sangue periferico sono stati separati dal sangue di volontari sani attraverso centrifugazione secondo gradiente di densità Histopaque. Poi i leucociti sono stati lavati due volte, risospesi in mezzo preformato EGM-2 e sono stati in fine aggiunti (1.5×10^{-6} /ml) ad un monostrato di cellule endoteliali coronariche umane cresciute in piastre da 24 pozzetti e prestimate con leptina come descritto in precedenza. In un ulteriore set di esperimenti, l'adesione leucocitaria

è stata valutata in cellule endoteliali preventivamente incubate con lovastatina prima di essere stimulate con la leptina. Dopo essere state incubate per 60 minuti a 37 °C, le HCAECs sono state lavate con EGM-2 preconstituito al fine di rimuovere i leucociti non adesi, mentre le cellule adese venivano contate manualmente con un microscopio a contrasto di fase. Tutti gli esperimenti sono stati effettuati in triplicato.

Effetti della leptina sull'espressione di NF- κ B.

Al fine di investigare i meccanismi molecolari coinvolti nell'espressione del Tissue Factor, ICAM-1 e VCAM-1 indotti dalla leptina, in un altro set di esperimenti sono stati misurati i livelli di attivazione del fattore di trascrizione nucleare NF- κ B utilizzando l'electrophoretic mobility shift assay (EMSA). HCAECs venivano coltivate come descritto in precedenza. Giunte al 90% di confluenza le cellule venivano messe in quiescenza in mezzo addizionato di siero a basse concentrazioni per 12 ore. Tale passaggio era reso necessario per annullare l'attivazione del fattore di trascrizione NF- κ B, che

risulta essere coinvolto normalmente in molteplici meccanismi di regolazione cellulare. Le cellule venivano quindi incubate con dosi differenti di leptina (10, 20, 50 ng/ml) per 30 minuti.

Gli estratti nucleari venivano poi analizzati mediante metodica EMSA utilizzando l'oligonucleotide *double strand* codificante la sequenza di NF- κ B marcata con P³² (5'-ACTTGAGGGGACTTTCCCAGGC-3') [52]. Cellule endoteliali quiescenti incubate con LPS (50 μ g/ml) servivano come controllo positivo.

Inoltre, al fine di investigare il ruolo svolto dalla lovastatina nella modulazione di tale fenomeno, in un ulteriore set di esperimenti cellule endoteliali coronariche umane venivano coltivate in EGM-2 arricchito con lovastatina (10 μ M) per 24 ore e poi stimolate con leptina (10 ng/ml) per 30 minuti. Le cellule venivano quindi processate come prima descritto per valutare i livelli di attivazione di NF- κ B.

Effetti della leptina sul mRNA specifico per la proteina C-reattiva

Gli effetti della leptina sulla trascrizione del mRNA della proteina C-reattiva (PCR) sono stati valutati tramite l'analisi Real-Time PCR dopo aver effettuato una trascrizione inversa. Le HCAECs venivano incubate per 48 ore con leptina (5 e 10 ng/ml), livello di concentrazione comprendente la concentrazione media di leptina osservata nel plasma dei pazienti a più alto rischio per patologie cardiovascolari [10-15]. Le cellule venivano quindi lavate con PBS ed incubate nuovamente con mezzo fresco (EGM 2 con 0,1% siero) e l'mRNA totale veniva estratto.

I campioni così ottenuti venivano retrotrascritti per ottenere un pool di cDNA che venivano successivamente analizzati mediante "Real Time" Polimerase Chain Reaction. Cellule endoteliali incubate con LPS (50µg/ml) servivano da controllo positivo. Viceversa, cellule non stimolate servivano da controllo negativo.

Cento nanogrammi di RNA totale per ogni singolo campione venivano amplificati in triplicato in un volume di reazione di 50 µl

utilizzando il sistema “ABI PRISM 5700 sequence detector” (Applied Biosystems, Foster City, USA). Gli specifici oligonucleotidi per la PCR umana venivano disegnati sulla base delle sequenze pubblicate, utilizzando il software PRIMER EXPRESS (Applied Biosystems) e convalidati per la loro specificità: 5'-GTGTTTCCCAAAGAGTCGGATACT-3' e 5'-CCACGGGTCGAGGACAGTT-3'. La rilevazione della fluorescenza e la quantificazione veniva effettuata utilizzando il sistema “SYBR-green chemistry” (Applied Biosystems, Foster City, USA), utilizzando uno standard interno. Tre esperimenti indipendenti venivano effettuati per ogni condizione.

Effetti della leptina sulla produzione di proteina C-reattiva

Cellule endoteliali coronariche umane venivano coltivate in piastre da coltura con 6 pozzetti fino al raggiungimento del 90% della confluenza totale. La stessa densità veniva utilizzata per ogni condizione sperimentale ($1,5 \times 10^5$ cellule per pozzo di coltura). Le cellule venivano incubate per 48 ore con concentrazioni crescenti di

leptina (5, 10, 20 ng/ml) oppure LPS (50 µg/ml). Al termine dell'incubazione, i soprannatanti venivano raccolti e concentrati di dieci volte (10x) mediante il sistema di concentrazione Amicon Ultra (Millipore, Billerica, Mass. USA). La concentrazione di PCR veniva quindi determinata mediante un kit ELISA specifico per la PCR umana (DSL Inc., Webster, Tex. USA), secondo le indicazioni del produttore.

In esperimenti anaoghi, le cellule venivano preincubate con cicloesimide (10 ng/ml), noto inibitore della sintesi proteica, prima della stimolazione con leptina allo scopo di valutare se la produzione di PCR osservata fosse dovuta a nuova sintesi della molecola. Inoltre, essendo stato suggerito che lo stress ossidativo possa essere uno dei mediatori degli effetti della leptina sulla sintesi di PCR, in esperimenti aggiuntivi, le cellule venivano preincubate con superossido dismutasi (SOD, 500 U/ml) prima della stimolazione.

Inoltre, allo scopo di valutare i meccanismi molecolari alla base degli effetti della leptina sulla sintesi della proteina C-reattiva, in ulteriori esperimenti le cellule venivano incubate alternativamente

con pirrolidin-ditiocarbammato ammonio (PDTC, 100 μM), un inibitore dell'attivazione del fattore di trascrizione NF- κB , U0126 (10 μM), un inibitore delle extracellular signal regulated kinases (ERKs), Gö-6983 (200 nM), inibitore della proteina kinasi C (PKC), oppure con Y-27632 (1 μM), inibitore di Rho kinasi.

Infine, allo scopo di valutare se le statine fossero in grado di modulare gli effetti della leptina sulla sintesi di PCR, le cellule venivano incubate in mezzo arricchito di sola lovastatina (5 μM) oppure con lovastatina (5 μM) in combinazione con mevalonato (10^{-4} mol/l).

Meccanismi molecolari dell'azione della leptina sulla PCR

Attivazione di Rho

L'attivazione di RhoA veniva valutata mediante un saggio di attività simil-ELISA (G-LISA; Cytoskeleton, Denver, Colo. USA). In breve, cellule endoteliali coronariche umane venivano coltivate come descritto precedentemente ed incubate con leptina (10 ng/ml). In esperimenti di controllo, HCAECs venivano coltivate in mezzo

arricchito di sola lovastatina (5 μ M) oppure con lovastatina (5 μ M) in combinazione con mevalonato (10^{-4} mol/l) prima della stimolazione con leptina. Infine, in ulteriori esperimenti le cellule venivano preincubate con Gö-6983 (200 nM) oppure con SOD (500 U/ml) prima della somministrazione di leptina. Al termine dell'incubazione, le cellule venivano risciacquate con con soluzione salina "TRIS bufferate" refrigerata e quindi lisate con i reagenti forniti assieme al kit di dosaggio. I lisati venivano quindi incubati in pozzetti di ELISA sul cui fondo era legato il dominio di legame della Rhotekina. La concentrazione di RhoA veniva quindi valutata mediante immunofluorescenza seguita da una reazione colorimetrica, misurando l'assorbanza a 490 nm. Sei esperimenti indipendenti venivano effettuati per ogni singola condizione sperimentale.

Attivazione di PKC β

HCAECs venivano coltivate in piastre da coltura da 100 mm e raggiunto il 90% della confluenza totale, venivano incubate con leptina (10 ng/ml) o con LPS (50 μ g/ml) quale controllo positivo. In

ulteriori esperimenti, la valutazione dell'attività di PKC veniva valutata in cellule pretrattate con Gö-6983 (200 nM) oppure con l'inibitore del pathway di Rho Y-27632 (1 μ M) prima della stimolazione con leptina.

Le cellule venivano quindi lisate mediante un buffer di lisi (Tris-HCl 50 mM, NaCl 100 mM, MgCl₂ 10 mM, EDTA 1 mM, NP-40 1%, Triton X100 0.1%, cocktail di inibitori delle fosfatasi, DTT, pH 7.5).

Western Blotting

Uguali quantità di estratto proteico (50 μ g/campione) venivano tenute ad ebollizione per 5 minuti dopo aggiunta di soluzione di Laemmli contenente il 5% di β -mercaptoetanololo (vol/vol). I campioni venivano quindi sottoposti a separazione elettroforetica in un gel SDS-PAGE al 7.5% e quindi trasferiti su una membrana di nitrocellulosa. I filtri di cellulosa contenenti le proteine estratte venivano quindi incubati per una notte a 4°C in una soluzione bloccante (20 mM Tris, pH 7.5, NaCl 500 mM, latte in polvere

scremato al 5%). Le stesse membrane venivano quindi incubate con un anticorpo monoclonale isotipo-specifico diretto contro PKC β (Transduction Laboratories, Lexington, Ky USA) diluito in una soluzione bloccante (1:5000) per 1 ora a temperatura ambiente e quindi sciacquate con soluzione di lavaggio (Tris 20 mM, pH 7.5, NaCl 500 mM, Tween-20 0.2%). Infine, le membrane venivano incubate con IgG anti-mouse coniugati con perossidasi (1:3000, Amersham Corp, Louisville, Colo. USA) per 1 ora a temperatura ambiente e sciacquati per 30 minuti. Le bande corrispondenti a PKC β venivano quindi visualizzate mediante chemiluminescenza intensificata.

Saggio di attività di PKC β

HCAECs incubate come riportato precedentemente venivano processate per la valutazione dell'attività di PKC β I/II mediante uno specifico kit per il saggio di chinasi TruLight (Calbiochem, Darmstadt, Germany), in base alle indicazioni del produttore. L'attività di PKC β veniva valutata mediante analisi del segnale

colorimetrico generato dalla fosforilazione in serina di uno specifico peptide substrato (RFARKGSLRQKNV).

Analisi statistica.

I dati sono presentati come media \pm DS. Le differenze tra gruppi sono state determinate mediante analisi univariata ANOVA seguita da un test t di Student con correzione di Bonferroni. L'ipotesi nulla è stata rigettata per un valore di $p < 0.05$.

RISULTATI

Effetti della leptina sul TF-mRNA.

Cellule endoteliali coronariche umane in condizioni basali non esprimevano livelli misurabili di RNA messaggero codificante per il Tissue Factor. Trenta minuti dopo l'aggiunta di leptina alla concentrazione di (10 ng/ml), era apprezzabile l'iniziale incremento dei livelli di mRNA per il TF rispetto a quelli riscontrabili in cellule in condizioni basali, raggiungendo il picco a 60 minuti per poi cominciare a decrescere a 120 minuti (Figura 1).

Effetti della leptina sull'espressione del TF.

Le cellule endoteliali coronariche umane non esprimevano livelli misurabili di TF in condizioni basali, quando però queste venivano esposte alla leptina i livelli di TF valutati con analisi FACS aumentavano in maniera dose dipendente (Figura 2). Allo stesso modo, l'attività procoagulante del TF non era individuabile in condizioni basali e l'esposizione alla leptina induceva un incremento significativo e dose dipendente dell'attività del TF (Figura 3A).

Analoghi esperimenti, in cui la valutazione dei livelli di TF veniva effettuata dopo aver incubato le cellule con un anticorpo monoclonale “bloccante” diretto contro il TF, confermavano che l’attività procoagulante misurata era legata effettivamente alla presenza di TF sulla membrana plasmatica. Inoltre, l’induzione del TF da parte della leptina richiedeva la presenza di una sintesi proteica *de novo*. Infatti, il pre-trattamento delle cellule con cicloesimide, un inibitore della sintesi proteica, e con DRB, inibitore del processo di trascrizione, era in grado di inibire quasi completamente tale fenomeno (Figura 3B).

Infine, il pretrattamento con la lovastatina riduceva in maniera significativa gli effetti esercitati dalla leptina sull’espressione del TF e, di conseguenza, sull’attività procoagulante di questa molecola. Il pretrattamento delle cellule endoteliali con PDTC, inibitore specifico del fattore di trascrizione NF- κ B (100 μ mol/L), aboliva gli effetti della leptina sul TF (Figura 3B).

Effetti della leptina sulle molecole di adesione.

Le cellule endoteliali coronariche umane non stimolate esprimevano bassi livelli di ICAM-1 e VCAM-1. L'incubazione con leptina induceva l'espressione di entrambe le molecole sulla superficie cellulare (Figura 2). Al contrario, il pretrattamento delle cellule endoteliali con PDTC, inibitore dell'attivazione di NF- κ B, determinava una diminuzione dell'espressione tanto di ICAM-1 quanto di VCAM-1. Inoltre la preincubazione con lovastatina, un inibitore della HMG-CoA reduttasi, preveniva significativamente l'espressione di ICAM-1 e VCAM-1 indotta dalla leptina.

Esperimenti aggiuntivi, atti a valutare la funzionalità delle molecole VCAM-1 ed ICAM-1 espresse sulle HCAECs, dimostravano l'aumento significativo dei leucociti adesi alle HCAECs indotto dalla leptina. Come atteso, in cellule pretrattate con lovastatina e PDTC, tale fenomeno non era osservato (Figura 4).

Effetti della leptina sull'attivazione di NF- κ B.

Al fine di investigare i meccanismi molecolari coinvolti nell'espressione di TF, ICAM-1 e VCAM-1 indotti dalla leptina, abbiamo ipotizzato che il fattore di trascrizione NF- κ B potesse essere responsabile di questo fenomeno. Pertanto, gli estratti nucleari ottenuti da cellule endoteliali stimulate con leptina sono stati analizzati utilizzando la metodica nota come EMSA. Come previsto, cellule endoteliali quiescenti non presentavano attivazione di NF- κ B. Viceversa, l'esposizione delle cellule a concentrazioni crescenti di leptina determinava il progressivo incremento, dose-dipendente, dell'attivazione di tale fattore di trascrizione (Figura 5).

Il pre-trattamento delle cellule con pirrolidin-ditiocarbamato ammonio (PDTC, 100 μ mol/L), un inibitore non specifico dell'attivazione di NF- κ B, per 30 minuti prima della stimolazione con leptina (10 ng/ml), riduceva significativamente l'espressione del TF, sottolineando il rapporto di causa-effetto esistente tra attivazione di NF- κ B ed espressione del TF. La presenza della lovastatina nel mezzo di coltura riduceva significativamente l'attivazione di NF- κ B indotta dalla leptina suggerendo che gli effetti esercitati da tale classe

di farmaci sull'espressione del TF dipendono dalla loro azione sulla via di attivazione di tale fattore di trascrizione.

Effetti della leptina sul PCR-mRNA.

Cellule endoteliali coronariche umane in condizioni basali non esprimevano livelli misurabili di RNA messaggero codificante per la proteina C-reattiva. Bassi livelli di PCR erano rilevabili in seguito a stimolazione con leptina alla concentrazione di 5 ng/ml. Al contrario, si verificava un significativo incremento della trascrizione della PCR in seguito a stimolazione delle HCAECs con leptina alla concentrazione 10 ng/ml, pari a quella riscontrabile in soggetti con malattia coronarica aterosclerotica o a rischio di futuro infarto miocardico [10-15] (Figura 6).

Effetti della leptina sull'espressione della PCR.

Le cellule endoteliali coronariche umane non esprimevano livelli misurabili di PCR in condizioni basali. Tuttavia, quando queste venivano esposte alla leptina si verificava espressione di PCR, con

picco di concentrazione a 48 ore dalla stimolazione. Per tale motivo, veniva scelto tale tempo di incubazione per valutare gli effetti di concentrazioni crescenti di leptina mediante dosaggio ELISA ad elevata sensibilità della concentrazione di PCR.

In tali esperimenti, si osservava un effetto dose-dipendente della leptina sull'induzione della produzione di proteina C-reattiva (Figura 7A). In particolare, si verificava un incremento significativo della concentrazione di PCR rispetto ai livelli basali in seguito a stimolazione con leptina a livelli simili a quelli riscontrati nel plasma di soggetti con malattia coronarica aterosclerotica [10-15]. La preincubazione con cicloesimide, noto inibitore della sintesi proteica, era in grado di prevenire tale effetto della leptina sui livelli di PCR, suggerendo che una sintesi de novo fosse responsabile dell'incremento di concentrazione di PCR riscontrato. Allo stesso modo, in cellule preincubate con SOD la leptina non sortiva alcun effetto sui livelli di PCR. Tale riscontro suggerisce un ruolo per i radicali liberi dell'ossigeno nel mediare gli effetti della leptina sulla PCR (Figura 7B).

Al fine di valutare i meccanismi molecolari coinvolti nell'azione della leptina, HCAECs venivano preincubate alternativamente con PDTC, NF- κ B, U0126 o Gö-6983 prima della stimolazione con leptina. Solo la pre-incubazione con Gö-6983 (inibitore di PKC) era in grado di prevenire gli effetti della leptina, al contrario il trattamento con PDTC o U0126 non aveva alcun effetto sulle concentrazioni di PCR, suggerendo che l'induzione di PCR da parte della leptina sia mediata dall'attivazione di PKC (Figura 7C). Inoltre, anche il pre-trattamento con la lovastatina, inibitore della idrossimetilglutaril coenzima A (HMG-CoA), era in grado di prevenire l'azione della leptina sui livelli di PCR. In aggiunta, un effetto analogo veniva osservato in seguito al pre-trattamento con Y-27639, inibitore di Rho Kinasi (Figura 7D).

Meccanismi molecolari dell'azione della leptina

Attivazione di RhoA

Come è possibile osservare nella figura 8, la leptina determinava l'attivazione di RhoA. Il pretrattamento con lovastatina

preveniva tale effetto. Mentre la co-incubazione con lovastatina e mevalonato revertiva l'effetto della lovastatina, ripristinando l'attivazione di RhoA. Inoltre, in cellule trattate con SOD, la leptina non era in grado di indurre l'attivazione di RhoA. Infine, il pretrattamento con Gö-6983 non aveva alcun effetto sull'attivazione di RhoA indotta dalla leptina.

Attivazione di PKC

Avendo osservato che il trattamento con Gö-6983 riduceva significativamente gli effetti della leptina sulla produzione di PCR, in esperimenti aggiuntivi abbiamo valutato direttamente gli effetti della leptina sulla fosforilazione di uno specifico peptide substrato da parte di PKC β . La stimolazione delle HCAECs con leptina determinava un significativo incremento dell'attivazione di PKC β (incremento del 9.8% nella fosforilazione del substrato, rispetto al controllo). La pre-incubazione con lovastatina o Y-27632 preveniva significativamente l'attivazione di PKC β indotta dalla leptina, anche se tale effetto

risultava meno pronunciato rispetto al pre-trattamento con Gö-6983 (Figura 9).

DISCUSSIONE

I risultati del presente studio evidenziano come la leptina eserciti un ruolo importante nella fisiopatologia della malattia aterosclerotica e nello sviluppo delle sindromi coronariche acute. In particolare, in cellule endoteliali umane prelevate dal distretto coronarico, abbiamo dimostrato che:

- 1) la leptina é in grado di indurre l'espressione di m-RNA specifico per il TF;
- 2) a tale effetto si associa l'aumento dell'espressione del TF sulla superficie cellulare e - dato fisiopatologicamente importante - dall'incremento dell'attività procoagulante sulla superficie cellulare;
- 3) la leptina induce l'espressione delle molecole di adesione, VCAM-1 e ICAM-1, che risultano funzionalmente attive;
- 4) l'attivazione del fattore di trascrizione nucleare NF- κ B riveste un ruolo estremamente importante nella modulazione di tali fenomeni;
- 5) l'attivazione del fattore di trascrizione nucleare NF- κ B riveste un ruolo estremamente importante nella modulazione dell'azione della

leptina sull'espressione del TF e delle molecole di adesione ICAM-1 e VCAM-1;

- 6) la leptina induce la produzione di proteina C-reattiva;
- 7) l'attivazione di PKC β e di RhoA sono responsabili degli effetti della leptina sulla produzione di proteina C-reattiva;
- 8) le statine eserciterebbero un potenziale effetto protettivo riducendo l'espressione del TF e delle molecole di adesione ICAM-1 e VCAM-1 sulla superficie delle cellule endoteliali attraverso la modulazione del pathway di NF- κ B, e riducendo l'espressione di PCR indotta dalla leptina, agendo prevalentemente su RhoA.

Nonostante la rapida evoluzione delle conoscenze sull'aterosclerosi, molti aspetti fisiopatologici sono tuttora da chiarire. I dati epidemiologici sulla malattia aterosclerotica suggeriscono che, accanto ai fattori di rischi noti, altri fattori tuttora non identificati, come ad esempio stimoli di natura pro-infiammatoria ed immunitaria, avrebbero un ruolo fondamentale nel determinare l'inizio e la progressione della patologia atero-trombotica [53,54].

Infatti, dati clinici dimostrano come pazienti con livelli di rischio cardiovascolare simili in base ai classici fattori di rischio presentino evoluzioni cliniche della malattia profondamente diverse.

Secondo teorie emergenti, il tessuto adiposo rivestirebbe un ruolo rilevante in tale contesto, per la sua capacità di produrre sostanze attive sull'apparato cardiovascolare [5]. Gli adipociti producono una classe di molecole note come adipochine. Tra queste, l'adiponectina é dotata di attività protettiva sull'apparato cardiovascolare [6]. Per altre adipochine, come la resistina e la leptina, non è ancora completamente definito quale sia l'effetto netto sul sistema cardiovascolare, anche se le evidenze finora accumulate ascriverebbero loro un ruolo pro-aterotrombotico [55].

Evidenze cliniche hanno dimostrato che pazienti con infarto acuto del miocardio e pazienti con ictus, avevano concentrazioni plasmatiche di leptina significativamente più elevate rispetto al normale [16-18]. Infatti, Wallace et al. hanno evidenziato come l'associazione tra elevati livelli sierici di leptina ed ipercolesterolemia si associ con un aumentato rischio di andare incontro ad infarto del miocardio e necessità di rivascularizzazione coronarica [19]. Inoltre, Wolk et al. hanno

dimostrato che elevati livelli basali di leptina sono associati ad un incremento del rischio di morte di origine cardiaca, di nuovo infarto miocardico acuto, ictus e rivascolarizzazione coronarica in pazienti non diabetici [56]. Piatti et al. hanno invece riportato che i livelli di leptina predicono la restenosi dopo angioplastica coronarica (PTCA) [57]. Infine Ciccone et al. hanno osservato che i livelli plasmatici elevati di leptina sono correlati direttamente con l'entità dello spessore medio-intimale dell'arteria carotide comune, noto marcatore di aterosclerosi subclinica[58].

È inoltre di notevole rilievo l'osservazione che la leptina possa contribuire allo sviluppo di ipertensione arteriosa attraverso la stimolazione del sistema nervoso simpatico [59]. Accanto alle suddette evidenze cliniche, numerosi dati sperimentali suggeriscono un ruolo diretto per la leptina nella fisiopatologia cardiovascolare. L'espressione del recettore per la leptina è stata osservata in piastrine, macrofagi ed in cellule della parete vascolare, come le cellule muscolari lisce e le cellule endoteliali [60]. In base a recenti evidenze, la leptina favorirebbe lo sviluppo di fenomeni trombotici intravascolari agendo direttamente sulla

componente piastrinica del trombo [60,61]. È inoltre stato dimostrato che tale adipochina moduli la biosintesi di ossido nitrico attraverso diversi meccanismi [59]. Nel contesto della parete vascolare, la leptina agirebbe inducendo la migrazione e la proliferazione delle cellule endoteliali e delle cellule muscolari lisce [63,64]. Infine, Bouloumie et al. hanno riportato un effetto ossidante della leptina, che si tradurrebbe nell'attivazione del fattore di trascrizione nucleare NF- κ B [65].

In linea con le osservazioni citate, nel presente studio abbiamo dimostrato come la leptina eserciti un effetto diretto su cellule endoteliali coronariche umane, favorendone la conversione ad un fenotipo pro-aterotrombotico.

La fisiopatologia della malattia aterosclerotica attribuisce un ruolo estremamente importante al "reclutamento" dei leucociti circolanti nel flusso ematico. Tali cellule, migrate negli spazi subendoteliali, innescano una serie di processi che determinano la progressione della malattia stessa [20,21]. Questo importante processo è mediato principalmente dalle molecole di adesione, espresse dalle cellule endoteliali soltanto in risposta a diversi stimoli aterogeni [22-24]. In

particolare, è stato dimostrato che tali molecole di adesione sono abbondantemente rappresentate nella placche aterosclerotiche umane [65,66]. A conferma di tale importanza, è stato osservato che la concentrazione sierica delle molecole di adesione è fortemente correlata con lo sviluppo della malattia coronarica [67] e con il rischio di eventi cardiovascolari [68]. In tale contesto, l'effetto esercitato dalla leptina sull'espressione di tali molecole acquisisce un ruolo rilevante nella fisiopatologia aterosclerotica. L'osservazione che essa induca l'espressione dose dipendente di VCAM-1 e ICAM-1 è poi rafforzata dalla conferma che le molecole di adesione espresse risultano funzionalmente attive, come indicato dall'incremento dell'adesività dei leucociti sulla superficie cellulare.

Accanto alle molecole di adesione, la fisiopatologia della malattia aterotrombotica riconosce un ruolo importante al Tissue Factor nei processi di trombosi intravascolare, come si verifica nel corso di sindromi coronariche acute. Nel presente studio, la leptina, parallelamente all'espressione delle molecole di adesione, determina

l'espressione dose dipendente di nuove molecole di TF sulla superficie delle cellule endoteliali coronariche umane.

Di particolare interesse fisiopatologico è il riscontro che tali molecole di TF siano funzionalmente attive, come è dimostrato dall'aumento dell'attività pro-coagulante sulla superficie delle cellule stimulate. Questa osservazione potrebbe avere importanti ripercussioni fisiopatologiche, considerando che le cellule endoteliali rappresentano l'interfaccia tra la parete vascolare e i fattori della coagulazione, liberamente circolanti nel sangue.

Nel corso degli ultimi anni un numero crescente di evidenze sperimentali ha evidenziato il ruolo chiave dei processi infiammatori nella patogenesi dell'aterosclerosi, ed in particolare nello sviluppo di sindromi coronariche acute [32, 33]. In numerosi studi clinici la proteina C-reattiva si è dimostrata un fattore predittivo di eventi cardiovascolari maggiori, tanto in pazienti affetti da coronaropatia aterosclerotica che in soggetti apparentemente sani [32-34]. In seguito a recenti evidenze sperimentali, è stato inoltre suggerito che la PCR non sia un semplice marcatore infiammatorio ed un predittore di eventi cardiovascolari, bensì

un attore diretto nel contesto della fisiopatologia dell'aterosclerosi [35-37].

Recenti studi hanno dimostrato come la PCR possa essere sintetizzata non soltanto in cellule epatiche ma anche in altre popolazioni cellulari, come ad esempio cellule muscolari lisce ed adipociti [38-40]. A conferma di tali evidenze, la produzione locale di PCR è stata riportata da altri gruppi di ricerca in placche coronariche aterosclerotiche ed in bypass venosi aortocoronarici [41-42]. Nel presente studio, abbiamo osservato come la leptina, a concentrazioni simili a quelle rilevate in soggetti a rischio di sviluppare eventi cardiovascolari, in pazienti con nota coronaropatia aterosclerotica o infarto miocardico acuto, sia in grado di determinare la produzione di proteina C-reattiva in cellule endoteliali coronariche umane, suggerendo un nuovo potenziale legame tra il metabolismo energetico ed i processi infiammatori vascolari. L'aumento locale della concentrazione di PCR potrebbe avere notevoli ripercussioni, essendo stato dimostrato che tale molecola induce la proliferazione delle cellule muscolari lisce, come anche l'espressione di Tissue Factor in cellule endoteliali [37]. In tal modo la leptina

indurrebbe, attraverso l'espressione di PCR, la progressione dei processi aterosclerotici promuovendo inoltre la trombosi intravascolare.

I meccanismi molecolari responsabili degli effetti della leptina sono soltanto in parte definiti. Nel presente studio abbiamo dimostrato che uno dei possibili meccanismi di azione di tale adipochina sull'espressione del TF e delle molecole di adesione contempla l'attivazione del fattore di trascrizione nucleare NF- κ B. Infatti, l'effetto della leptina sull'espressione delle suddette molecole viene inibito dal trattamento con PDTC, un inibitore di NF- κ B.

Il fattore di trascrizione NF- κ B è presente in forma inattiva nel citoplasma di molte cellule come i linfociti, i monociti, cellule endoteliali e muscolari lisce. La sua attivazione si verifica in seguito ad esposizione a vari stimoli ed è responsabile dell'espressione di numerose proteine che contribuiscono alla progressione dei processi aterotrombotici [71]. È stato infatti riportato che NF- κ B è attivato nelle placche instabili dei pazienti con sindromi coronariche acute [72,73], suggerendo che esso sia coinvolto nei processi determinanti la conversione delle placche da stabili ad instabili.

Al contrario di quanto osservato per il TF e le molecole di adesione, NF- κ B non influenza l'espressione di proteina C-reattiva indotta dalla leptina in cellule endoteliali coronariche umane. In questo caso, la leptina esercita il proprio effetto sulla PCR attraverso l'attivazione di PKC β , similmente a quanto osservato in altre popolazioni cellulari [74]. Inoltre, anche lo stress ossidativo sembra avere un ruolo nel modulare gli effetti osservati. Infatti, il pretrattamento con superossido dismutasi riduceva significativamente gli effetti della leptina sulla PCR attraverso l'inibizione dell'attivazione di RhoA indotta dai radicali liberi dell'ossigeno. In effetti, l'azione della leptina sull'espressione della PCR si eserciterebbe prevalentemente attraverso l'attivazione di RhoA, la quale determinerebbe l'attivazione di PKC β , attraverso la sua traslocazione. La leptina è inoltre in grado di attivare tale via di trasduzione anche indipendentemente da RhoA, come osservato nei nostri esperimenti. Tuttavia, in questo ultimo caso la risultante attivazione di PKC è inferiore, suggerendo che RhoA eserciti un effetto additivo rilevante.

Un altro risultato del presente studio particolarmente interessante è rappresentato dalla capacità della lovastatina, un inibitore della HMG-CoA

reduzzasi, di ridurre in maniera significativa gli effetti esercitati dalla leptina sulle cellule endoteliali coronariche umane. In particolare, abbiamo investigato l'ipotesi che tale statina potesse avere, nell'ambito degli effetti cosiddetti pleiotropici tipici di questa classe di farmaci, anche un ruolo protettivo nei confronti degli effetti pro-aterotrombotici della leptina osservati negli esperimenti qui riportati. Studi precedenti hanno dimostrato che le statine, oltre ad un effetto diretto sui livelli plasmatici di colesterolo, esercitano effetti protettivi sulle cellule endoteliali, essendo in grado di ripristinarne le normali funzioni [57]. I meccanismi responsabili di tale effetto protettivo devono essere ancora chiariti in dettaglio; tuttavia alcune evidenze sperimentali suggeriscono che le statine potrebbero esercitare un effetto sul pathway di attivazione di NF- κ B [58]. I dati del presente studio risultano essere in linea con le osservazioni precedenti e, soprattutto, mettono in risalto il potenziale utilizzo di questa classe di farmaci nella prevenzione degli eventi atero-trombotici nei pazienti che presentano elevati livelli sierici di tale molecola.

La lovastatina si è dimostrata inoltre capace di ridurre significativamente la produzione di PCR indotta da leptina. Tuttavia, a differenza di quanto

osservato per il TF e le molecole di adesione, in questo caso la lovastatina esercita i propri effetti attraverso la modulazione dell'attivazione di RhoA. È noto come l'attivazione di RhoA richieda il suo ancoraggio alla membrana plasmatica, attraverso l'isoprenilazione [75, 76]. Le nostre osservazioni suggeriscono come la lovastatina agisca proprio su questo fenomeno, inibendo la via biosintetica del geranyl-geraniolo pirofosfato, essenziale per l'isoprenilazione di RhoA. Infatti, mentre il trattamento con lovastatina impedisce l'attivazione di RhoA, riducendo di conseguenza la produzione di PCR, l'aggiunta di mevalonato – intermedio metabolico della sintesi di geranyl-geraniolo pirofosfato - ripristina l'attivazione di RhoA, scavalcando il blocco biosintetico operato dalla statina. Tale meccanismo consentirebbe potenzialmente di interferire farmacologicamente con gli effetti deleteri della leptina sull'espressione di PCR, attraverso la semplice somministrazione di una statina.

In conclusione, nel presente studio abbiamo evidenziato che la leptina, molecola bioattiva prodotta dal tessuto adiposo, è in grado di alterare le normali caratteristiche fisiologiche delle cellule endoteliali coronariche umane in vitro, favorendone la conversione ad un fenotipo pro-

aterotrombotico. Tali risultati contribuirebbero a spiegare, almeno in parte, in meccanismi responsabili della peggiore prognosi osservata in pazienti con documentata evidenza di aterosclerosi coronarica ed elevati livelli plasmatici di leptina. Le statine potrebbero rappresentare uno strumento utile nell'inibire tale fenomeno.

BIBLIOGRAFIA

1. Phillips SD, Roberts WC. Comparison of body mass index among patients with versus without angiographic coronary artery disease. *Am J Cardiol.* 2007;100(1):18-22.
2. Buettner HJ, Mueller C, Gick M, Ferenc M, Allgeier J, Comberg T, Werner KD, Schindler C, Neumann FJ. The impact of obesity on mortality in UA/non-ST-segment elevation myocardial infarction. *Eur Heart J.* 2007;28(14):1694-701.
3. Lau DC, Dhillon B, Yan H, Szmitko PE, Verma S. Adipokines: molecular links between obesity and atherosclerosis. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2005;288(5):H2031-41.
4. Hutley L, Prins JB. Fat as an endocrine organ: relationship to the metabolic syndrome. *Am J Med Sci.* 2005;330(6):280-9.
5. Kawanami D, Maemura K, Takeda N, Harada T, Nojiri T, Imai Y, Manabe I, Utsunomiya K, Nagai R. Direct reciprocal effects of resistin and adiponectin on vascular endothelial cells: a new insight

- into adipocytokine-endothelial cell interactions. *Biochem Biophys Res Commun.* 2004 Feb 6;314(2):415-9.
6. Katagiri H, Yamada T, Oka Y. Adiposity and cardiovascular disorders: disturbance of the regulatory system consisting of humoral and neuronal signals. *Circ Res.* 2007;101(1):27-39.
 7. Peelman F, Waelput W, Iserentant H, Lavens D, Eyckerman S, Zabeau L, Tavernier J. Leptin: linking adipocyte metabolism with cardiovascular and autoimmune diseases. *Prog Lipid Res.* 2004 Jul;43(4):283-301.
 8. Kolaczynski JW, Nyce MR, Considine RV, et al. Acute and chronic effects of insulin on leptin production in humans: Studies in vivo and in vitro. *Diabetes.* 1996;45:699–701.
 9. Wabitsch M, Jensen PB, Blum WF, et al. Insulin and cortisol promote leptin production in cultured human fat cells. *Diabetes.* 1996;45:1435–1438.
 10. Dagogo-Jack S, Fanelli C, Paramore D, et al. Plasma leptin and insulin relationships in obese and nonobese humans. *Diabetes.* 1996;45:695–698.

11. Segal KR, Landt M, Klein S. Relationship between insulin sensitivity and plasma leptin concentration in lean and obese men. *Diabetes*. 1996;45:988–991.
12. Zimmet PZ, Collins VR, de Courten MP, et al. Is there a relationship between leptin and insulin sensitivity independent of obesity? A population-based study in the Indian Ocean nation of Mauritius: Mauritius NCD Study Group. *Int J Obes*. 1998;22:171–177.
13. Haffner SM, Mykkanen L, Rainwater DL, et al. Is leptin concentration associated with the insulin resistance syndrome in nondiabetic men? *Obes Res*. 1999;7:164–169.
14. Friedman JM, Halaas JL. Leptin and the regulation of body weight in mammals. *Nature*. 1998;395(6704):763-70.
15. Considine RV, Sinha MK, Heiman ML, Kriauciunas A, Stephens TW, Nyce MR, Ohannesian JP, Marco CC, McKee LJ, Bauer TL, et al. Serum immunoreactive-leptin concentrations in normal-weight and obese humans. *N Engl J Med*. 1996;334(5):292-5.

- 16.Soderberg S, Ahren B, Jansson JH, Johnson O, Hallmans G, Asplund K, Olsson T. Leptin is associated with increased risk of myocardial infarction. *J Intern Med.* 1999;246(4):409-18.
- 17.Soderberg S, Ahren B, Stegmayr B, Johnson O, Wiklund PG, Weinehall L, Hallmans G, Olsson T. Leptin is a risk marker for first-ever hemorrhagic stroke in a population-based cohort. *Stroke.* 1999;30(2):328-37.
- 18.Soderberg S, Stegmayr B, Stenlund H, Sjostrom LG, Agren A, Johansson L, Weinehall L, Olsson T. Leptin, but not adiponectin, predicts stroke in males. *J Intern Med.* 2004;256(2):128-36.
- 19.Wallace AM, McMahon AD, Packard CJ, Kelly A, Shepherd J, Gaw A, Sattar N. Plasma leptin and the risk of cardiovascular disease in the west of Scotland coronary prevention study (WOSCOPS). *Circulation.* 2001 Dec 18;104(25):3052-6.
- 20.Choudhury RP, Lee JM, Greaves DR. Mechanisms of disease: macrophage-derived foam cells emerging as therapeutic targets in atherosclerosis. *Nat Clin Pract Cardiovasc Med.* 2005;2(6):309-15.

21. Price DT, Loscalzo J. Cellular adhesion molecules and atherogenesis. *Am J Med* 1999; 107:85-97.
22. Davies MJ, Gordon JL, Gearing AJ, Pigott R, Woolf N, Katz D, Kyriakopoulos A. The expression of adhesion molecules ICAM-1, VCAM-1, PECAM-1, and E-selectin in human atherosclerosis. *J Pathol* 1993; 171: 223-229.
23. O' Brien KD, McDonald TO, Chait A, Allen MD, Alpers CE. Neovascular expression of E-selectin, intercellular adhesion molecule-1 and vascular adhesion molecule-1 in human atherosclerosis and their relation to intimal leukocyte content. *Circulation* 1996; 93: 672-682.
24. Cirillo P, Pacileo M, DE Rosa S, Calabro P, Gargiulo A, Angri V, Granato-Corigliano F, Fiorentino I, Prevete N, DE Palma R, Mauro C, Leonardi A, Chiariello M. Neopterin induces pro-atherothrombotic phenotype in human coronary endothelial cells. *J Thromb Haemost.* 2006;4(10):2248-55.
25. Ragni M, Cirillo P, Pascucci I, Scognamiglio A, D'Andrea D, Eramo N et al. A monoclonal antibody against tissue factor shortens tissue-

- plasminogen activator lysis time and prevents reocclusion in a rabbit model of carotid artery thrombosis. *Circulation* 1996; 93: 1913-1920.
26. Rapaport, S.I. and Rao, L.V.M. initiation and regulation of tissue factor dependent coagulation. *Atheroscler Thromb* 1992; 12, 111-121.
27. Wilcox JN, Smith KM, Schwartz S, Gordon D. Localization of tissue factor in the normal vessel wall and in the atherosclerotic plaque. *Proc Natl Acad Sci* 1989; USA. 86: 2839-2843.
28. Bierhaus A, Chen J, Liliensiek B, Nawroth PP. LPS and cytokine activated endothelium. *Semin Thromb Hemost* 2000; 26: 571-87.
29. Golino P, Ragni M, Cirillo P, Avvedimento VE, Felicciello A, Esposito N et al. Effects of tissue factor induced by oxygen free radicals on coronary flow during reperfusion. *Nat Med* 1996; 2: 35-40.
30. Poulsen LK, Jacobsen N, Sorensen BB, Bergenheim NC, Kelly JD, Foster DC, Thastrup O, Ezban M, Petersen LC. Signal transduction via mitogen activated protein kinase pathway induced by binding of coagulation factor VIIa to tissue factor. *J Biol Chem* 1998; 273:6228-6232.

31. Cirillo P, Calì G, Golino P, Calabrò P, Forte L, De Rosa S, Pacileo M, Ragni M, Scopacasa F, Nitsch L, Chiariello M. Tissue factor binding of activated factor VII triggers smooth muscle cell proliferation via extracellular signal-regulated kinase activation. *Circulation*. 2004; 109 (23): 2911-6.
32. Shah PK: Circulating markers of inflammation for vascular risk prediction: are they ready for prime time. *Circulation* 2000; 101:1758–1759.
33. Libby P, Ridker PM, Maseri A: Inflammation and atherosclerosis. *Circulation* 2002; 105:1135–1143.
34. Ridker PM, Rifai N, Rose L, Buring JE, Cook NR: Comparison of C-reactive protein and low-density lipoprotein cholesterol levels in the prediction of first cardiovascular events. *N Engl J Med* 2002; 347: 1557–1565.
35. Pasceri V, Chang J, Willerson JT, Yeh ETH: Modulation of C-reactive protein-mediated monocyte chemoattractant protein-1 induction in human endothelial cells by anti-atherosclerosis drugs. *Circulation* 2001; 103: 2531–2534.

36. Venugopal SK, Devaraj S, Yuhanna I, Shaul P, Jialal I: Demonstration that C-reactive protein decreases eNOS expression and bioactivity in human aortic endothelial cells. *Circulation* 2002; 106: 1439–1441.
37. Cirillo P, Golino P, Calabrò P, Calì G, Ragni M, De Rosa S, Cimmino G, Pacileo M, De Palma R, Forte L, Gargiulo A, Granato Corigliano F, Angri V, Spagnuolo R, Nitsch L, Chiariello M: C-reactive protein induces tissue factor expression and promotes smooth muscle and endothelial cell proliferation. *Cardiovasc Res* 2005; 68: 47–55.
38. Moshage HJ, Roelofs HMJ, Van Pelt JF, Hazenberg BPC, Van Leeuwen MA, Limburg PC, Aarden LA, Yap SH: The effect of interleukin-1, interleukin-6 and its interrelationship on the synthesis of serum amyloid A and C-reactive protein in primary cultures of adult human hepatocytes. *Biochem Biophys Res Commun* 1988; 155: 112–117.

39. Calabro P, Willerson JT, Yeh ETH: Inflammatory cytokines stimulated C-reactive protein production by human coronary artery smooth muscle cells. *Circulation* 2003; 108: 1930–1932.
40. Calabro P, Chang D, Willerson J, Et Y: Release of C-reactive protein in response to inflammatory cytokines by human adipocytes: linking obesity to vascular inflammation. *J Am Coll Cardiol* 2005; 46: 1112–1113.
41. Yasojima K, Schwab C, McGeer EG, McGeer PL: Generation of C-reactive protein and complement components in atherosclerotic plaques. *Am J Pathol* 2001; 158: 1039–1051.
42. Jabs WJ, Theissing E, Nitschke M, Bechtel JFM, Duchrow M, Mohamed S, Jahrbeck B, Sievers HH, Steinhoff J, Bartels C: Local generation of C-reactive protein in diseased coronary artery venous bypass grafts and normal vascular tissue. *Circulation* 2003; 108: 1428–1431.
43. Visser M, Bouter LM, McQuillan GM, Wener MH, Harris TB: Elevated C-reactive protein levels in overweight and obese adults. *JAMA* 1999; 282: 2131–2135.

44. Maron DJ, Fazio S, Linton MF. Current perspectives on statins. *Circulation*. 2000; 101(2): 207-13.
45. Shepherd J, Cobbe SM, Ford I, Isles CG, Lorimer AR, MacFarlane PW, McKillop JH, Packard CJ; West of Scotland Coronary Prevention Study Group. Prevention of coronary heart disease with pravastatin in men with hypercholesterolemia. *Atheroscler Suppl*. 2004; 5(3): 91-7.
46. Downs JR, Clearfield M, Weis S, Whitney E, Shapiro DR, Beere PA, Langendorfer A, Stein EA, Kruyer W, Gotto AM Jr. Primary prevention of acute coronary events with lovastatin in men and women with average cholesterol levels: results of AFCAPS/TexCAPS. Air Force/Texas Coronary Atherosclerosis Prevention Study. *JAMA* 1998; 279(20): 1615-22.
47. Calabrò P, Yeh ET. The pleiotropic effects of statins. *Curr Opin Cardiol* 2005; 20 (6): 541-546.
48. Blankenhorn DH. Blood lipids and human atherosclerosis regression the angiographic evidence. *Curr Opin Lipidol* 1991; 2:2324-2329.

49. Gellman J, Ezekowitz MD, Sarembock IJ, Azrin A, Nochomowitz LE, Lerner E, Haudenschild CC. Effect of lovastatin on intimal hyperplasia after balloon angioplasty: a study in an atherosclerotic hypercholesterolemic rabbit. *J Am Coll Cardiol* 1991; 17:251-259.
50. Wolfrum S, Jensen KS, Liao JK. Endothelium-dependent effects of statins. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2003; 23: 729-736.
51. Schechter AD, Spirn B, Rossikhina M., Giesen, PL, Bogdanov V, Fallon JT et al . Release of active Tissue Factor by human arterial smooth muscle cells. *Circ Res* 2000; 87: 126 – 132.
52. Andrews NC, Fallen DV. A rapid micropreparation technique for extraction of DNA-binding proteins from limiting numbers of mammalian cells. *Nucleic Acid Research* 1991; 19: 2499.
53. Ross R. Atherosclerosis: an inflammatory disease. *N Engl J Med* 1999; 340:115–126.
54. Libby P. Molecular bases of the acute coronary syndromes. *Circulation* 1995; 91: 2844 –2850.

55. Calabro' P, Yeh ET. Obesity, inflammation, and vascular disease: the role of the adipose tissue as an endocrine organ. *Subcell Biochem.* 2007;42:63-91.
56. Wolk R, Berger P, Lennon RJ, Brilakis ES, Johnson BD, Somers VK. Plasma leptin and prognosis in patients with established coronary atherosclerosis. *J Am Coll Cardiol.* 2004;44(9):1819-24.
57. Piatti P, Di Mario C, Monti LD, Fragasso G, Sgura F, Caumo A, Setola E, Lucotti P, Galluccio E, Ronchi C, Origgi A, Zavaroni I, Margonato A, Colombo A. Association of insulin resistance, hyperleptinemia, and impaired nitric oxide release with in-stent restenosis in patients undergoing coronary stenting. *Circulation.* 2003;108(17):2074-81.
58. Ciccone M, Vettor R, Pannacciulli N, Minenna A, Bellacicco M, Rizzon P, Giorgino R, De Pergola G. Plasma leptin is independently associated with the intima-media thickness of the common carotid artery. *Int J Obes Relat Metab Disord.* 2001;25(6):805-10.
59. Beltowski J. Leptin and atherosclerosis. *Atherosclerosis.* 2006;189(1):47-60.

60. Porreca E, Di Febbo C, Fusco L, Moretta V, Di Nisio M, Cuccurullo F. Soluble thrombomodulin and vascular adhesion molecule-1 are associated to leptin plasma levels in obese women. *Atherosclerosis*. 2004;172(1):175-80.
61. Konstantinides S, Schafer K, Loskutoff DJ. The prothrombotic effects of leptin possible implications for the risk of cardiovascular disease in obesity. *Ann N Y Acad Sci*. 2001;947:134-41; discussion 141-2.
62. Park HY, Kwon HM, Lim HJ, Hong BK, Lee JY, Park BE, Jang Y, Cho SY, Kim HS. Potential role of leptin in angiogenesis: leptin induces endothelial cell proliferation and expression of matrix metalloproteinases in vivo and in vitro. *Exp Mol Med*. 2001 Jun 30;33(2):95-102.
63. Oda A, Taniguchi T, Yokoyama M. Leptin stimulates rat aortic smooth muscle cell proliferation and migration. *Kobe J Med Sci*. 2001 Jun;47(3):141-50.

64. Bouloumie A, Marumo T, Lafontan M, Busse R. Leptin induces oxidative stress in human endothelial cells. *FASEB J*. 1999;13(10):1231-8.
65. Hanyu M, Kume N, Ikeda T, Minami M, Kita T, Komeda M. VCAM-1 expression precedes macrophage infiltration into subendothelium of vein grafts interposed into carotid arteries in hypercholesterolemic rabbits. A potential role in vein graft atherosclerosis. *Atherosclerosis* 2001; 158: 313-319.
66. Dansky HM, Barlow CB, Lominska C, Sikes JL, Kao C, Weinsaft J, Cybulsky MI, Smith JD. Adhesion of monocytes to arterial endothelium and initiation of atherosclerosis are critically dependent on vascular cell adhesion molecule-1 gene dosage. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2001; 21: 1662-1667.
67. Ridkler PM, Hennekens CH, Roitman-Johnson B, Stampfer Mj, Allen J. Plasma concentration of soluble intercellular adhesion molecule 1 and risks of future myocardial infarction in apparently healthy men. *Lancet* 1998; 351: 88-92.

68. Blankenberg S, Rupprecht HJ, Bickel C, Peetz D, Hafner G, Tiret L, Meyer J. Circulating cell adhesion molecules and death in patients with coronary artery disease. *Circulation* 2001; 104: 1336-1342.
69. Wolfrum S, Jensen KS, Liao JK. Endothelium-dependent effects of statins. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2003;23:729-736.
70. Lin R, Liu J, Peng N, Yang G, Gan W, Wang W. Lovastatin reduces nuclear factor kB activation induced by C-Reactive Protein in human vascular endothelial cells. *Biol. Pharm. Bull* 2005; 28: 1630-1634.
71. Barnes PJ, Karin M. Nuclear factor-kappa B: a pivotal transcription factor in chronic inflammatory disease. *N Engl J Med* 1997; 336: 1066-71.
72. Ritchie ME. Nuclear Factor- kB is selectively and markedly activated in humans with unstable angina pectoris. *Circulation* 1998; 98: 1707-1713.
73. Wilson SH, Best PJ, Edwards WD, Holmes DR Jr, Carlson PJ, Celermajer DS, et al. Nuclear factor-kappaB immunoreactivity is present in human coronary plaque and enhanced in patients with unstable angina pectoris. *Atherosclerosis* 2002 160:147-53.

74. Takekoshi K, Ishii K, Nanmoku T, Shibuya S, Kawakami Y, Isobe K, Nakai T: Leptin stimulates catecholamine synthesis in a PKC-dependent manner in cultured porcine adrenal medullary chromaffin cells. *Endocrinology* 2001; 142: 4861–4871.
75. Laufs U, Liao JK: Targeting Rho in cardiovascular disease. *Circ Res* 2000; 87: 526–528.
76. Laufs U, La Fata V, Plutzky J, Liao JK: Upregulation of endothelial nitric oxide synthase by HMG CoA reductase inhibitors. *Circulation* 1998; 97: 1129–1135.

LEGENDA ALLE FIGURE

Figura 1.

Effetti della Leptina sull'espressione di m-RNA specifico per il TF in HCAECs. HCAECs in condizioni basali non esprimevano livelli misurabili di RNA messaggero codificante per il Tissue Factor. Trenta minuti dopo l'aggiunta di leptina alla concentrazione di 10 ng/ml, era apprezzabile un incremento dei livelli di mRNA per il TF rispetto a quelli riscontrabili in cellule in condizioni basali, raggiungendo il picco a 60 minuti per poi decrescere a 120 minuti. Ogni colonna rappresenta la media \pm SD di tre differenti esperimenti.

Figura 2.

Effetti della leptina sull'espressione del TF e delle molecole di adesione in HCAECs (FACS analysis). Dosi crescenti di leptina (10, 20, 50 ng/ml) determinavano incremento dose dipendente dell'espressione del TF e delle molecole di adesione ICAM-1 e VCAM-1 sulla superficie

delle HCAECs in coltura. Ogni colonna rappresenta la media \pm SD di sei differenti esperimenti.

Figura 3.

- A.** Effetti della Leptina sull'attività del TF in HCAECs valutata mediante saggio colorimetrico basato sulla naturale capacità del complesso TF/FVIIa di attivare il FXa. La leptina determinava incremento della attività procoagulante del TF secondo una curva dose risposta. Ogni colonna rappresenta la media \pm SD di sei differenti esperimenti.
- B.** Effetti dei vari inibitori sull'attività del TF indotta dalla Leptina in HCAECs. La pre-incubazione con cicloesimide (CE, 10 μ g/ml) o DRB (10 μ g/ml), preveniva l'aumento dell'attività del TF, indotto da leptina, suggerendo in coinvolgimento di una sintesi *de novo* del TF. La lovastatina (inibitore della HMG CoA-reduttasi, 5 μ M) ed il pirrolidin di-tiocarbammatoammonio (PDTC, 10 μ M), un inibitore di NF- κ B, riducevano significativamente gli effetti della leptina

sull'espressione del TF. Ogni colonna rappresenta la media \pm SD di sei differenti esperimenti.

Figura 4.

Effetti della leptina sull'adesione dei leucociti. In seguito alla stimolazione di cellule HCAEC con leptina, si verificava un incremento del numero di leucociti adesi alla superficie del monostrato endoteliale. Viceversa, il pre-trattamento con lovastatina (5 μ M) o con pirrolidin di-tiocarbammatoammonio (PDTC, 10 μ M) riduceva significativamente tale fenomeno. Ogni colonna rappresenta la media \pm SD di tre differenti esperimenti. L'inserto riporta i risultati un tipico esperimento.

Figura 5.

Effetti della leptina sull'attivazione di NF- κ B. Estratti nucleari ottenuti da HCAECs non stimulate (Base) o da HCAECs incubate con concentrazioni crescenti di leptina (5, 10, 50ng/ml per 30') o con LPS (controllo positivo). L'attivazione di NF- κ B veniva valutata mediante

electrophoretic mobility shift assay (EMSA). La leptina determinava l'attivazione di NF- κ B secondo una modalità dose-dipendente.

Figura 6.

Effetti della Leptina sull'espressione di m-RNA specifico per la proteina C-reattiva (PCR) in HCAECs. HCAECs in condizioni basali non esprimevano livelli misurabili di RNA messaggero codificante per la PCR. Al contrario, dopo l'aggiunta di leptina alla concentrazione di 10 ng/ml, era apprezzabile un incremento dei livelli di mRNA per la PCR rispetto a quelli riscontrabili in cellule in condizioni basali. Ogni colonna rappresenta la media \pm SD di tre differenti esperimenti.

Figura 7.

A. Effetti della Leptina sulla produzione di PCR in HCAECs valutata mediante hs-ELISA. La leptina determinava incremento della produzione di PCR attività secondo una curva dose risposta. Ogni colonna rappresenta la media \pm SD di sei differenti esperimenti.

- B.** Effetti dei vari inibitori sulla produzione di PCR indotta dalla Leptina in HCAECs. La pre-incubazione con cicloesimide (CE, 10 $\mu\text{g/ml}$) o DRB (10 $\mu\text{g/ml}$), preveniva l'aumento della produzione di PCR indotto da leptina, suggerendo che una sintesi *de novo* sia responsabile dell'incremento dei livelli di PCR osservato. Anche il pretrattamento con l'enzima superossido dismutasi (SOD) preveniva l'effetto della leptina, suggerendo un coinvolgimento delle specie reattive dell'ossigeno nel meccanismo di azione della leptina.
- C.** Il pretrattamento con Gö-6983, inibitore di PKC, era in grado di inibire significativamente la produzione di PCR indotta dalla leptina. Al contrario, nessuno effetto veniva osservato dopo pretrattamento con PDTC o con U0126. Tali risultati suggeriscono un coinvolgimento della chinasi PKC nei meccanismi attraverso cui la leptina induce la produzione di PCR.
- D.** Anche l'inibitore della chinasi ROCK (Y-27632), come anche il lovastatina (inibitore della HMG CoA-reduttasi) riducevano significativamente gli effetti della leptina sull'espressione della

PCR. L'effetto della lovastatina sull'azione della leptina veniva però neutralizzato dall'aggiunta di mevalonato, metabolita intermedio della via metabolica degli isoprenoidi. Ogni colonna rappresenta la media \pm SD di sei differenti esperimenti.

Figura 8.

La leptina determinava l'attivazione di RhoA, mentre il pretrattamento con lovastatina o con superossido dismutasi (SOD) preveniva tale effetto. L'aggiunta mevalonato (Meva) revertiva l'effetto della lovastatina (Lova), ripristinando l'attivazione di RhoA. Ogni colonna rappresenta la media \pm SD di sei differenti esperimenti.

Figura 9.

La stimolazione con leptina determinava un significativo incremento dell'attivazione di PKC β (dati espressi in % rispetto al controllo). La pre-incubazione con lovastatina (Lova) o Y-27632 preveniva significativamente l'attivazione di PKC β indotta dalla leptina, anche se tale effetto risultava meno pronunciato rispetto al pre-trattamento con

Gö-6983. L'inserto Ogni colonna rappresenta la media \pm SD di sei differenti esperimenti effettuati mediante saggio di attività di PKC β . L'inserto in alto riporta il risultato di un western blot rappresentativo.

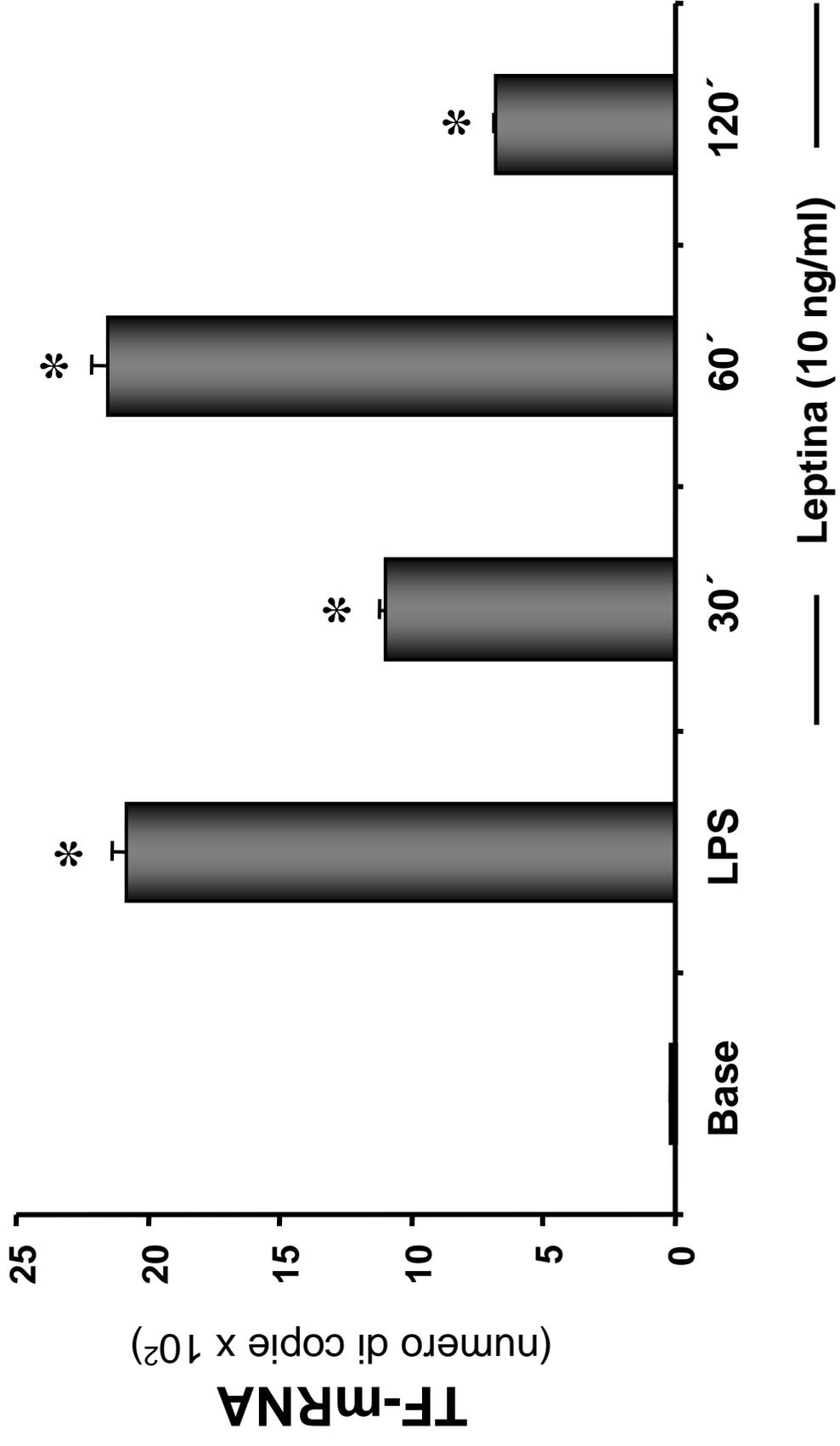


Figura 1

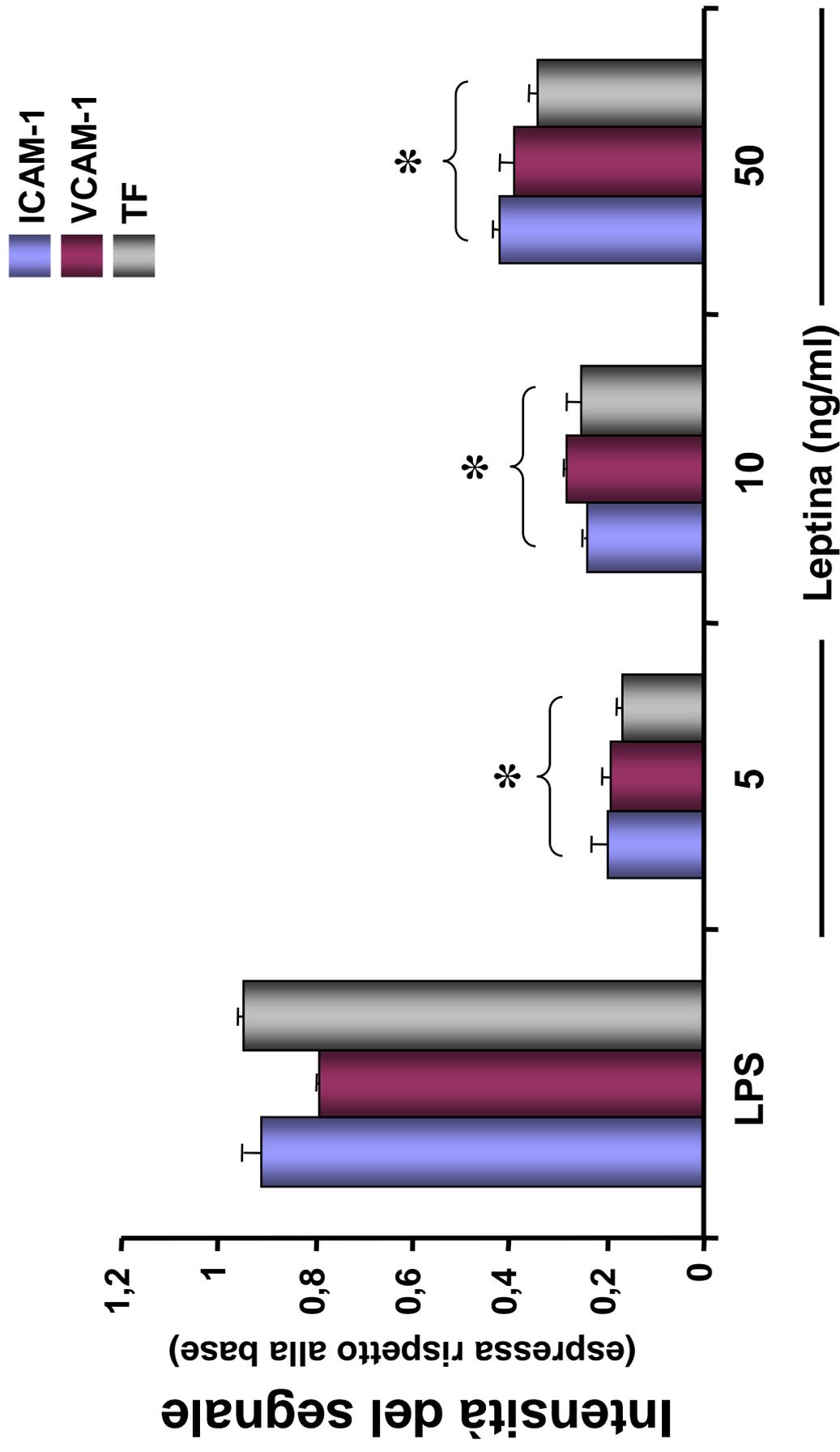
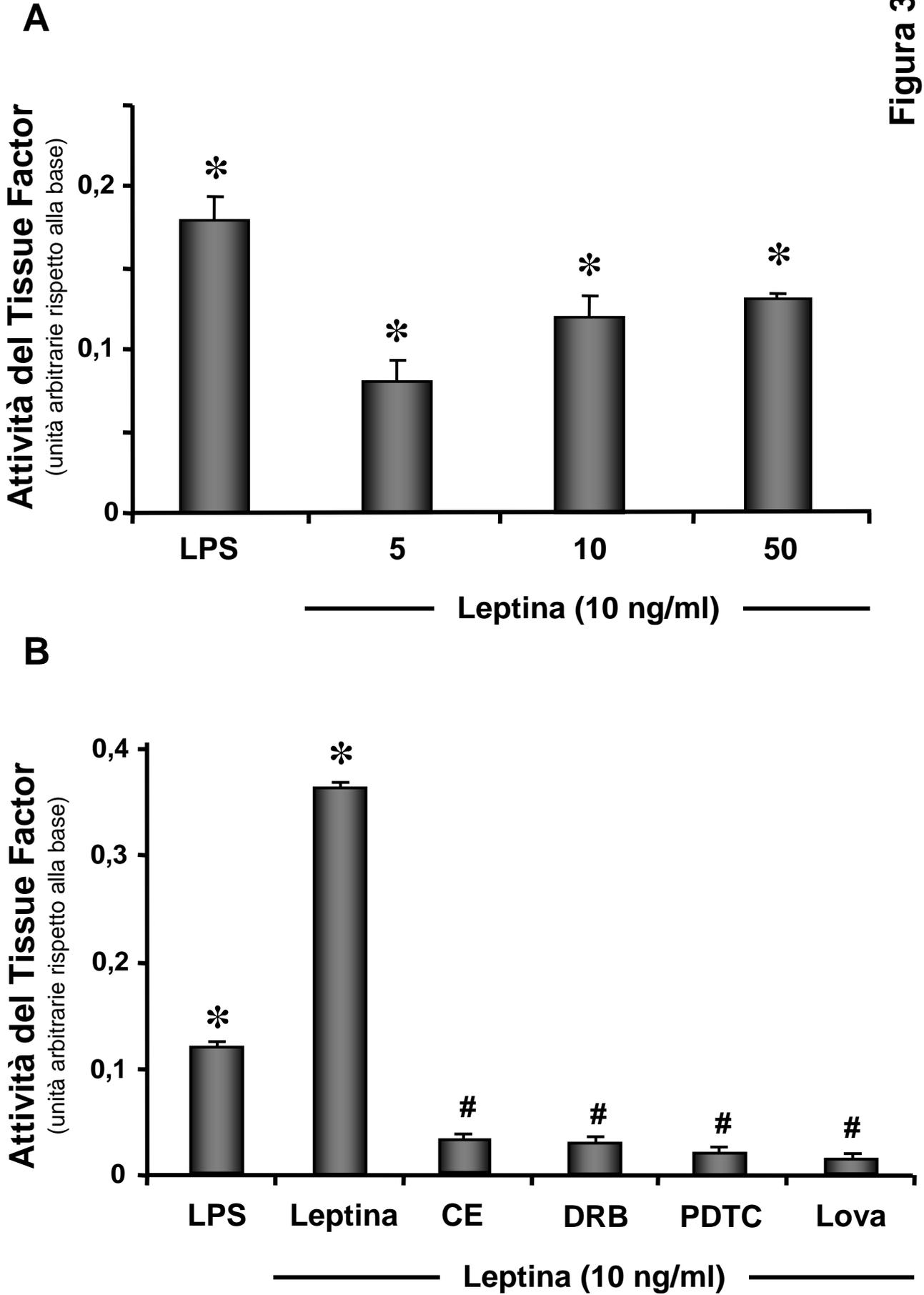


Figura 2

Figura 3



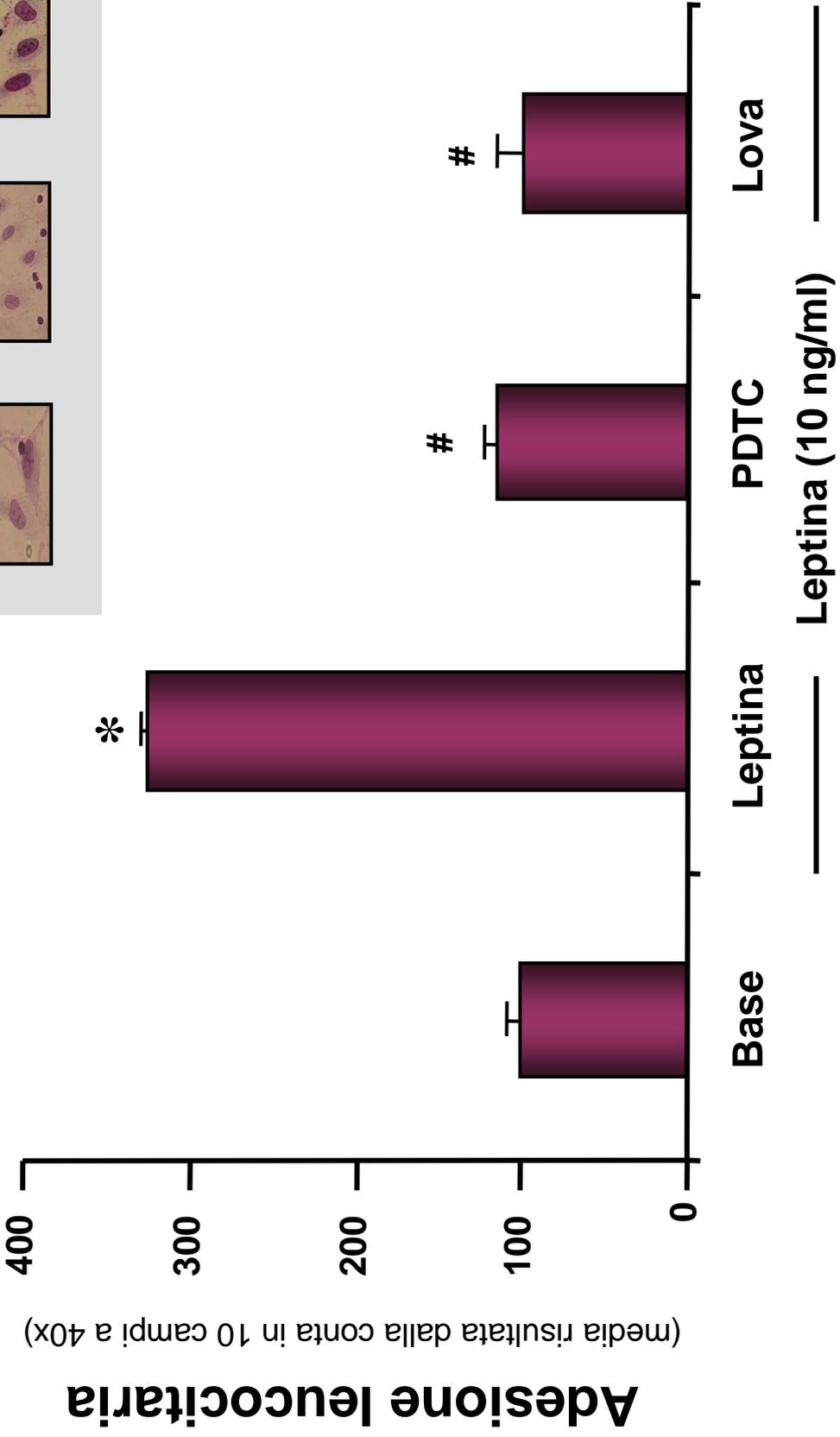
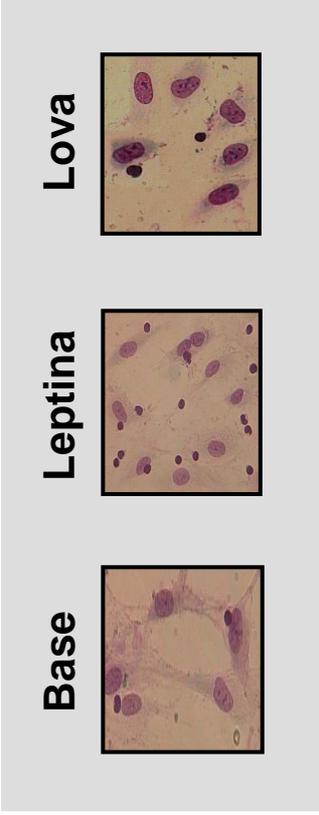


Figura 4

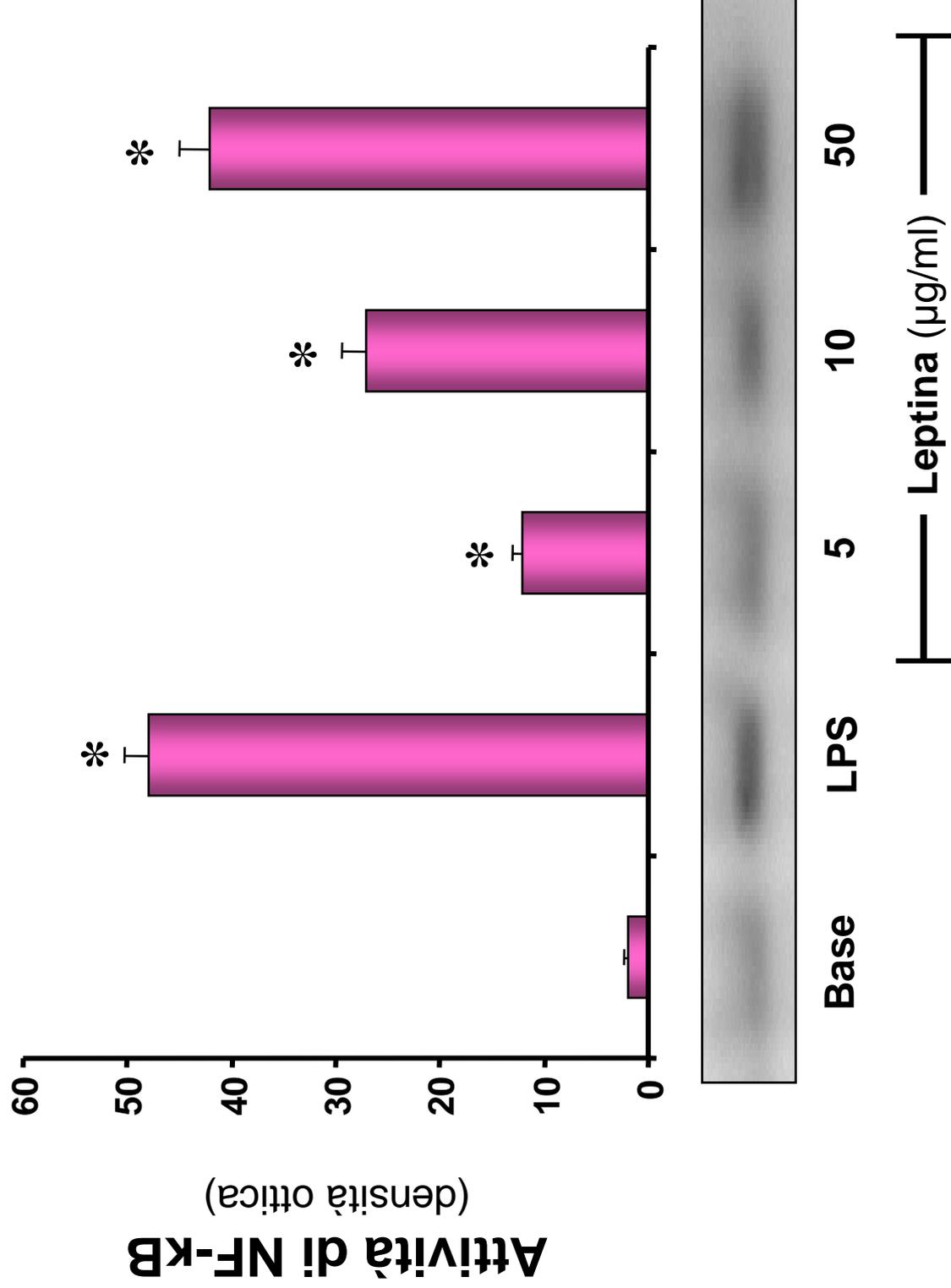


Figura 5

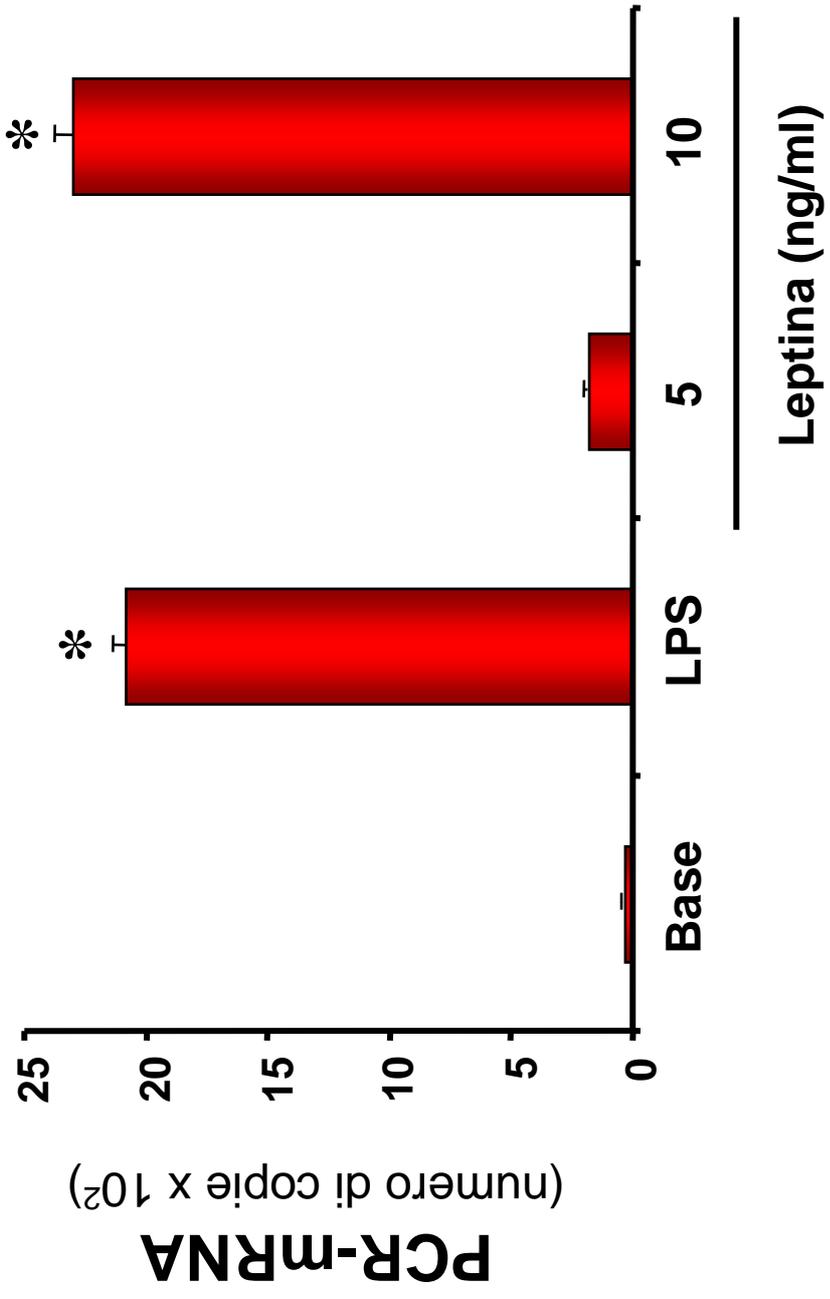
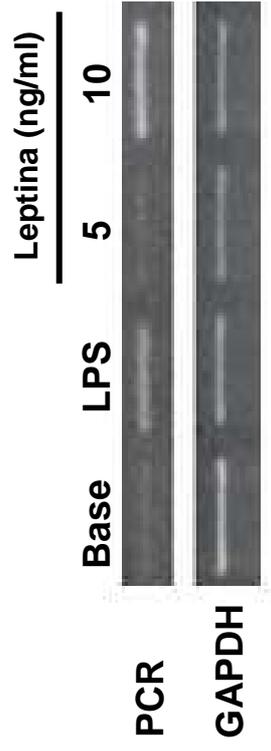


Figura 6

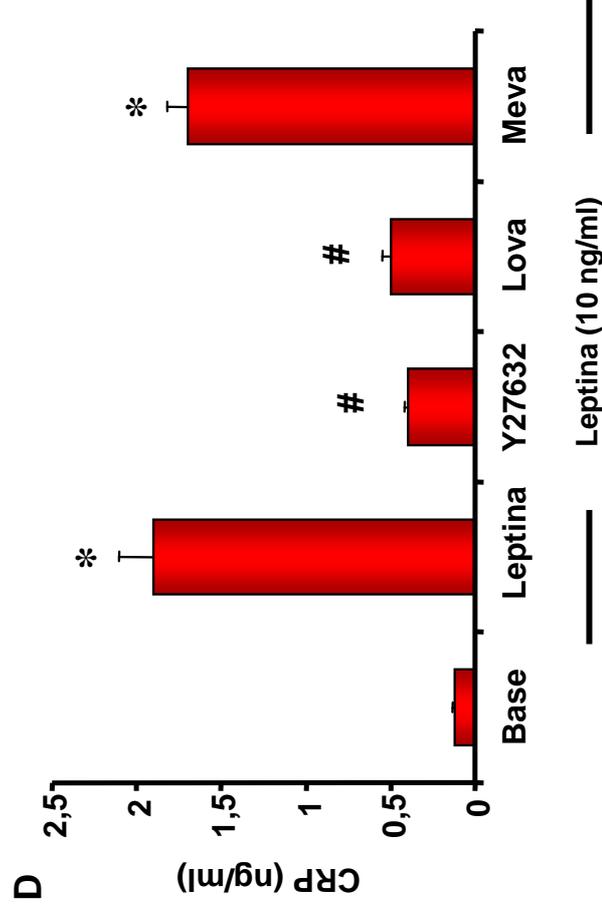
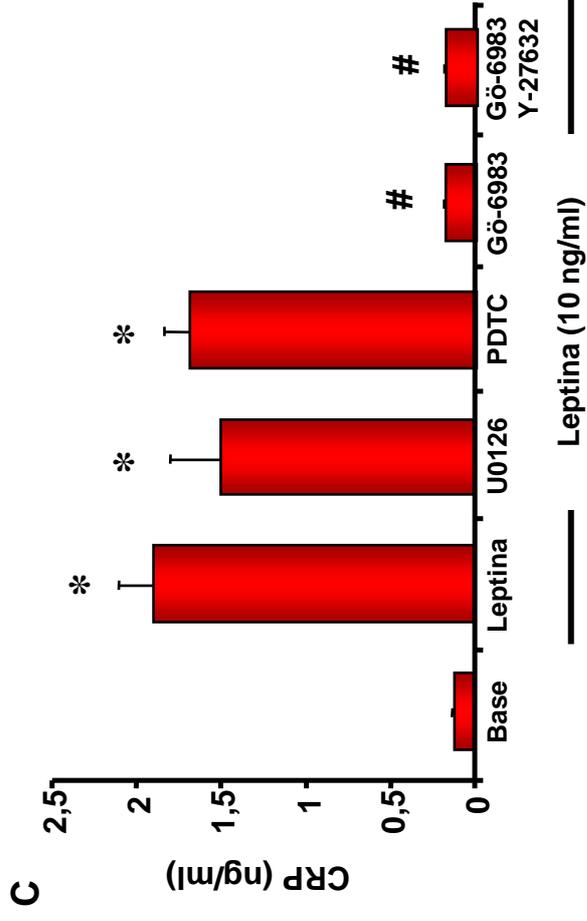
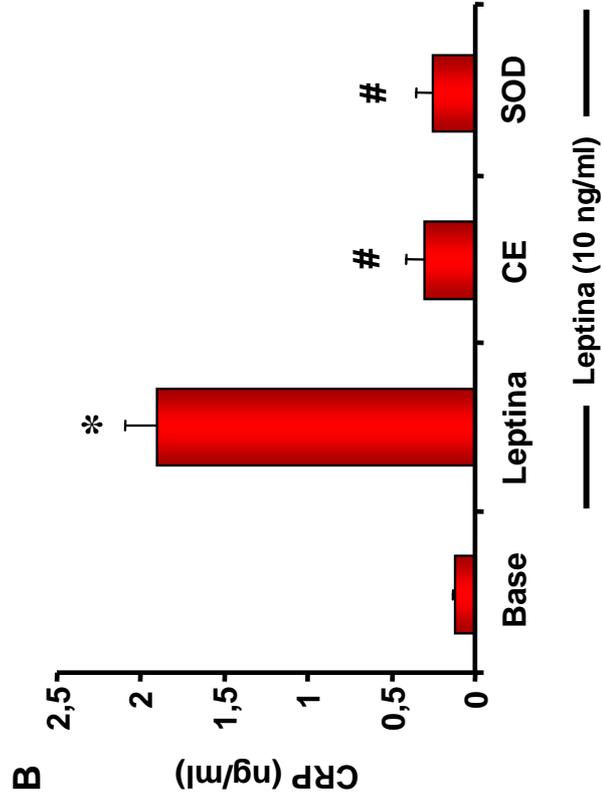
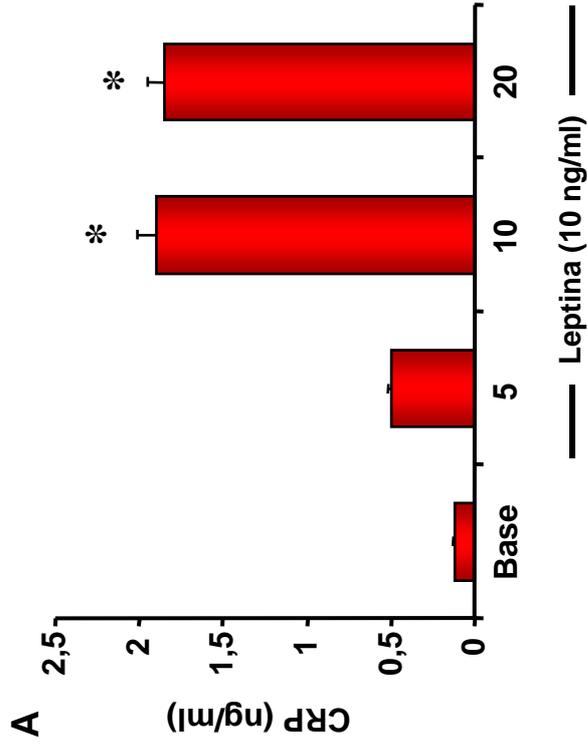


Figura 7

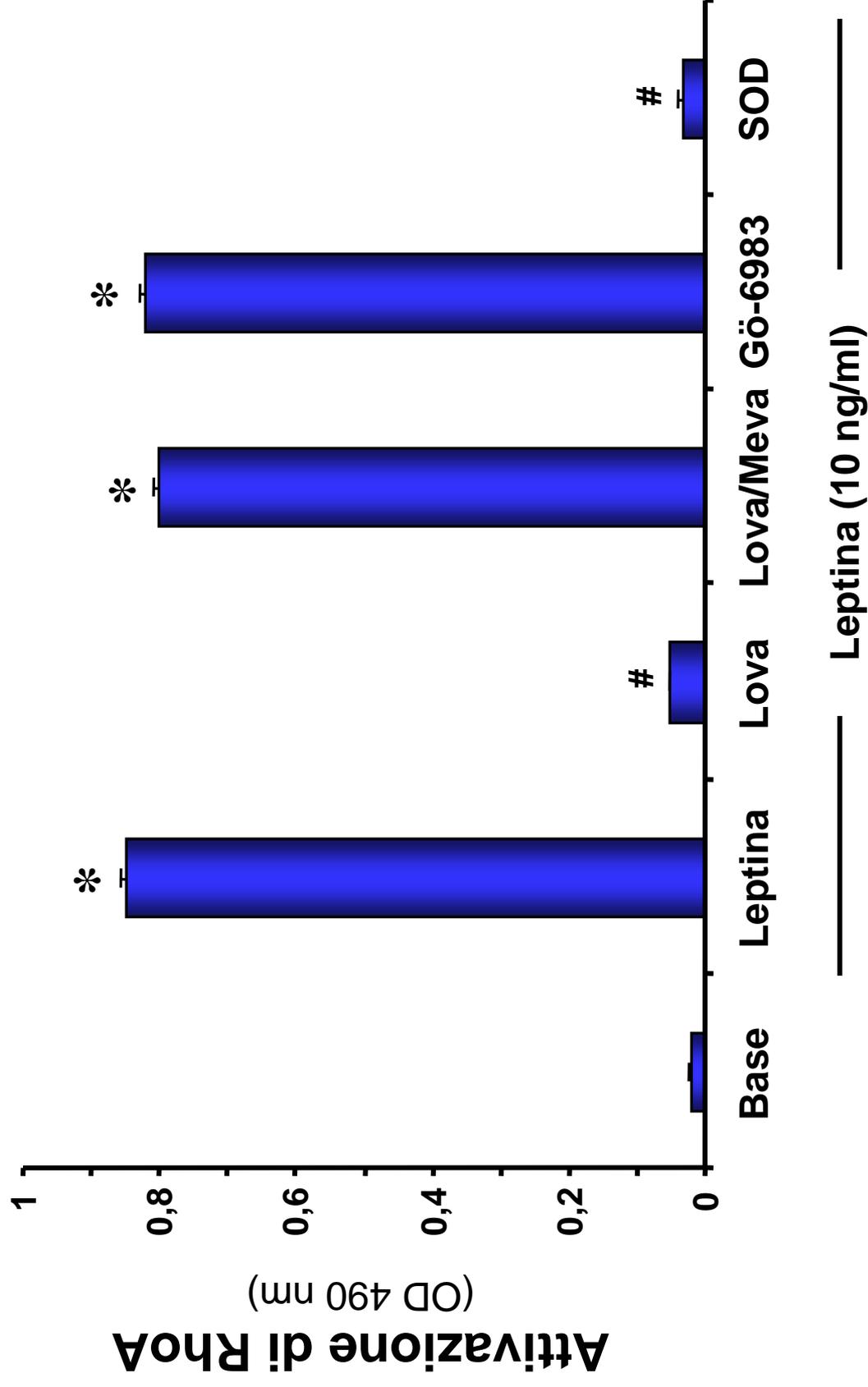


Figura 8

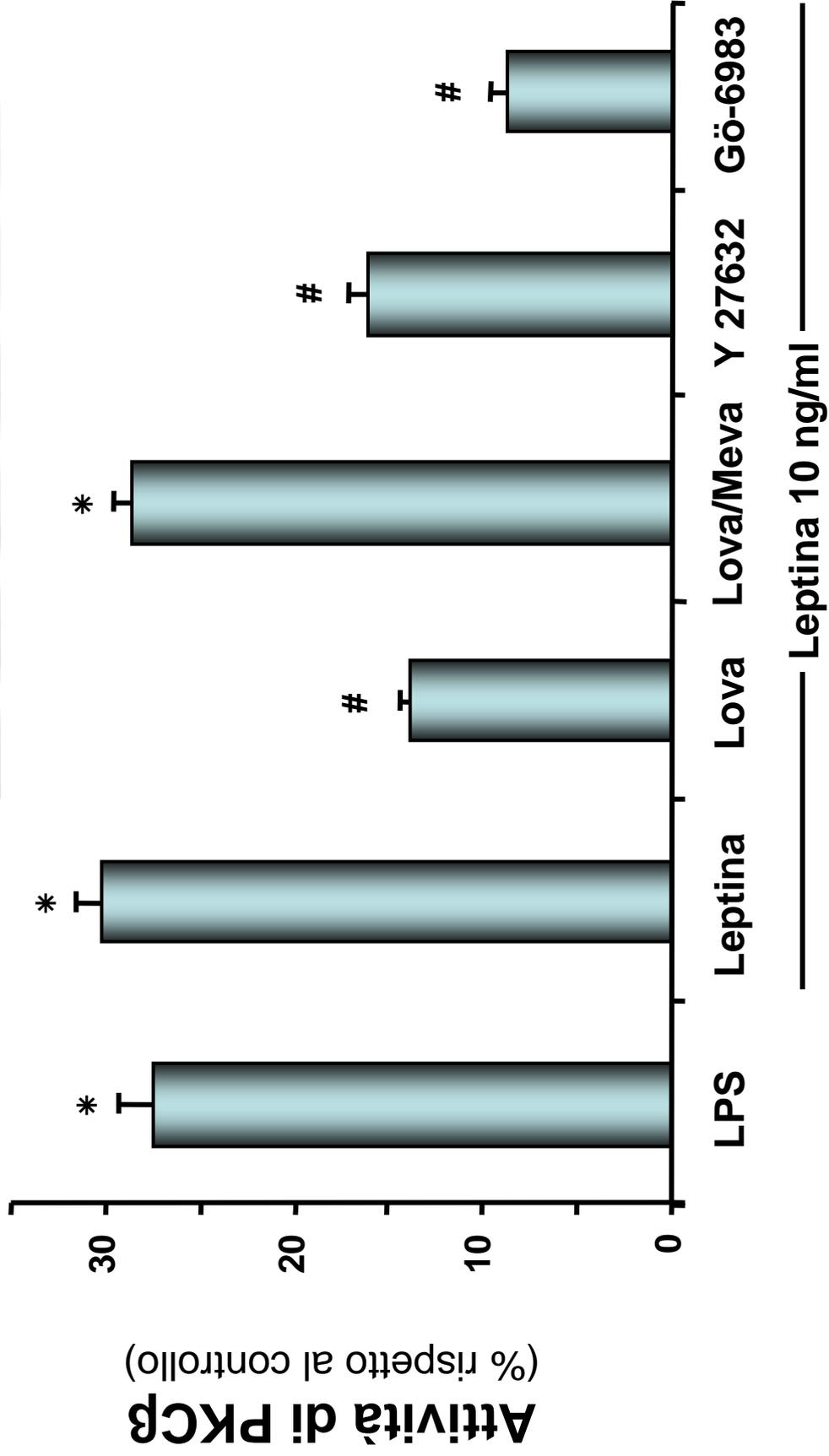
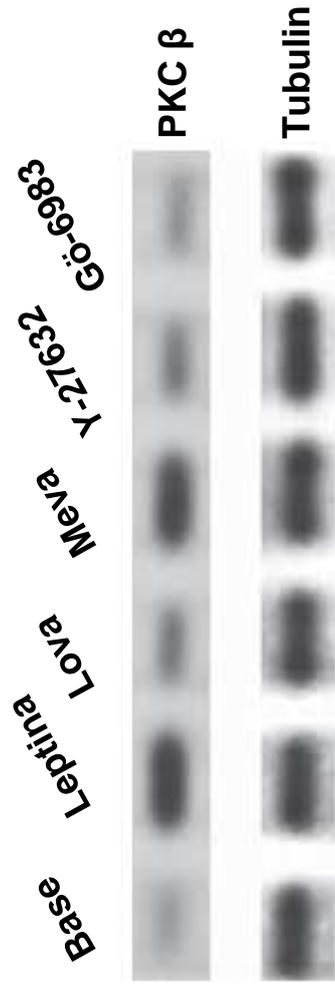


Figura 9