

UNIVERSITA' DEGLI STUDI DI NAPOLI "FEDERICO II"



Facoltà di Medicina e Chirurgia

DOTTORATO DI RICERCA IN

"SCIENZE CHIRURGICHE E TECNOLOGIE DIAGNOSTICHE
TERAPEUTICHE AVANZATE "

24° Ciclo

Tesi

"UROTENSINA II:BIOMARCATORE NEL TRATTAMENTO DELLA
DISFUNZIONE ERETTILE"

RELATORE:

Ch.mo Prof.

Vincenzo Mirone

CANDIDATO:

Dott. Ciro Barba

INDICE

Introduzione	pag. 3
Obiettivo dello studio	pag. 12
Materiali e metodi	pag.13
Risultati	pag.21
Discussione	pag. 24
Bibliografia	pag.31

INTRODUZIONE

L'erezione peniena

L'erezione peniena è un fenomeno fisiologico risultante da un evento emodinamico ed un evento neurogenico.

E' un evento emodinamico in quanto il grado di erezione dipende dall'equilibrio tra l'afflusso arterioso (arterie pudende) e il deflusso venoso (vene superficiali, vena dorsale profonda e vene cavernose).

Il pene è flaccido quando l'afflusso arterioso e venoso si controbilanciano; è tumescente quando l'afflusso arterioso aumenta e il deflusso venoso diminuisce. Nel pene flaccido il principale responsabile del mantenimento della vasocostrizione e della contrazione della muscolatura cavernosa liscia del corpo cavernoso è il sistema simpatico (flusso sanguigno del pene basso); nel pene eretto il responsabile del mantenimento della dilatazione delle arteriole e del rilassamento della muscolatura liscia trasversale è il sistema parasimpatico.

Le diverse fasi dell'erezione comprendono:

- **la fase flaccida**
- **la fase di riempimento**
- **la fase tumescente**

- **la fase di erezione completa**
- **la fase di erezione rigida**
- **le fasi di detumescenza: iniziale, lenta e rapida.**

Nella **fase flaccida**, il tono simpatico mantiene le arterie elicine a lume chiuso, impedendo l'afflusso di sangue alle cavernule.

Nella **fase di riempimento** all'inizio dell'erezione, per stimolazione del parasimpatico e inibizione del simpatico, si favorisce l'afflusso arterioso ai corpi cavernosi e si ostacola il deflusso venoso; si rilascia la muscolatura liscia trabecolare e dei cuscinetti intimali delle arterie elicine permettendo l'afflusso massivo di sangue alle cavernule del tessuto erettile.

Nella **fase tumescente** la pressione intracavernosa comincia ad aumentare, dilatandosi i sinusoidi, si ha una certa compressione a livello del plesso venoso sottotunical e viene impedito il deflusso periferico del sangue e si determina il massimo riempimento del tessuto cavernoso. Defluisce una parte di sangue solo attraverso venule situate centralmente nel

tessuto cavernoso per mantenere costante il circolo nutritizio. L'afflusso di sangue ai corpi cavernosi ne determina un aumento di volume uniforme, alla massima erezione ciascun corpo cavernoso si allunga di circa 5 cm e si allarga di circa 6 mm. La tonaca albuginea sottoposta a compressione si assottiglia ed oppone sempre minore resistenza all'espansione dei corpi cavernosi del pene, rendendoli rigidi.

Nella **fase di erezione completa** la pressione intracavernosa continua ad aumentare fino a raggiungere il 90% della pressione arteriosa sistolica, il flusso arterioso all'interno del pene diminuisce, persiste ridotto il deflusso delle vene emissarie. Alla massima erezione la porzione mobile del pene si allunga, in media fino a 15 cm con un diametro di circa 3 cm. Durante l'erezione la cute del prepuzio si retrae e va a rivestire il corpo ingrossato del pene ed il glande rimane scoperto. La consistenza e l'intensità di colore del glande aumentano in particolare al momento dell'eiaculazione quando è massimo l'afflusso di sangue.

Nella **fase di erezione rigida** la pressione intracavernosa è a livelli superiori rispetto alla pressione arteriosa sistolica. Il pene è completamente rigido ed eretto. L'afflusso arterioso cessa e le vene sono chiuse.

Cessato lo stimolo parasimpatico inizia la **fase di detumescenza lenta**, con un processo che contempla la

costrizione delle arteriole elicine, la caduta della pressione intracavernosa, l'apertura delle anastomosi artero-venose, la diminuzione dell'afflusso ematico nei corpi cavernosi e l'aumento del deflusso venoso.

Nella **fase di detumescenza rapida** lo stimolo simpatico porta alla rapida caduta della pressione intracavernosa e ad una accentuazione dei processi ematici prima descritti. Il corpo cavernoso assume la consistenza e le dimensioni di partenza. L'erezione è quindi un evento emodinamico e neurogenico e la normale capacità erettile dipende dalla funzione della muscolatura liscia intracavernosa che è controllata dall'equilibrio tra neurotrasmettitori vasocostrittori e vasodilatatori attraverso fini meccanismi.

Biochimica dell'erezione peniena

Come già precedentemente descritto, al momento dell'erezione la muscolatura dei corpi cavernosi del pene viene a rilassarsi e contemporaneamente aumenta il flusso arterioso e diminuisce quello del sangue venoso. Il sopracitato meccanismo è regolato da una componente nervosa che rende l'erezione un processo neuro vascolare con una serie di trasmettitori e modulatori coinvolti in tale processo. Assume ruolo centrale in tale senso la molecola dell'ossido nitrico (NO), prodotta in qualità di mediatore in risposta a stimoli delle fibre nervose non adrenergiche non colinergiche (NANC) presenti all'interno della muscolatura liscia dei corpi cavernosi del pene e anche

presente nelle arterie e nelle vene .Il mediatore NO è capace di determinare rilasciamento dei corpi cavernosi, evento basilare ai fini dell'erezione. Studi dimostrano che tale evento risulta essere inibito in presenza di N-nitro-L-arginina e N- amino- L- arginina ,responsabili dell'inibita biosintesi del NO dalla L-arginina[1]. La produzione di NO dipende da una serie di enzimi , denominati NO sintasi, presenti in diverse isoforme: la NO sintasi di origine neuronale (nNOS), presente a livello delle fibre , e quella di origine endoteliale (eNOS), presente a livello endoteliale. Tali isoforme sono regolate in base alle esigenze dell'organismo. Durante il processo dell'erezione peniena aumenta la produzione di NO da parte della eNOS, che ha effetto vaso dilatante, a livello dell'endotelio vascolare. Tale aumentata produzione di NO sopravanza quella vaso costrittiva, mediata da RhoA/Rho chinasi che al contempo diminuisce. Ciò avviene in condizioni fisiologiche in cui l'endotelio non è affetto da alcuna patologia. In condizioni patologiche invece si verifica un sovertimento della via biochimica prima menzionata, determinata da un disaccoppiamento dell'isoforma eNOS e successiva produzione di perossinitriti, dovuta ad una reazione che avviene tra NO e anione superossido(O₂⁻). Tale reazione è implicata nelle alterazioni biochimiche responsabili dell'alterata omeostasi che causano disturbi dell'erezione peniena. L'attivazione delle isoforme nNOS ed eNOS via calcio/calmodulina

consente una rapida e transitoria produzione di NO[2]. Si ritiene che la via calcio/calmodulina sia responsabile in principio dell'erezione e quella calcio indipendente sia predominante in seguito ai fini del mantenimento dell'erezione stessa. Si ritiene inoltre che durante l'erezione sia primariamente coinvolta una produzione di NO da parte dell'isoforma nNOS in seguito a stimoli nervosi, causante un transiente aumento del flusso sanguigno ed aumento della irrorazione sanguigna peniena e degli spazi sinusoidali. In seguito avviene una ulteriore, consistente produzione di NO da parte di eNOS che rende possibile un'efficace erezione. Il mediatore NO, pervenuto mediante diffusione nelle cellule muscolari lisce dei corpi cavernosi determina l'attivazione dell'enzima guanilato ciclastasi (GC), responsabile a sua volta della produzione di un secondo messaggero ciclico, il cGMP. Tali nucleotidi ciclici sono sottoposti ad un processo di idrolizzazione da parte di isoenzimi fosfodiesterasici (PDE) e in particolare, nei corpi cavernosi del pene, l'isoforma PDE5.

Facendo riferimento alle svariate molecole, mediatori, e neurotrasmettitori coinvolti nel fenomeno dell'erezione, negli ultimi anni si è rivolta l'attenzione della ricerca verso un'altra molecola: l'Urotensina II.

UROTENSINA II

In realtà le prime notizie relative all'Urotensina II (U-II) risalgono agli anni '70, quando si riuscì ad isolare per la prima volta dal sistema neurosecretorio di una particolare specie di pesce, detta teleosto, questo peptide[3]. Nel 1980 si è riusciti a definire la struttura di questa proteina, un polipeptide di 12 residui aminoacidici, con 2 sequenze conservate, in particolare due sequenze omologhe ala-gly (in posizione 1-2) e phe-trp-lys(in posizione 7-8-9) che lo rendevano assimilabile ad un altro peptide neurosecreto, ovvero la somatostatina. Tale studio si proponeva non solo di definire meglio la struttura della urotensina II ma anche di scoprire maggiori informazioni rispetto al ruolo dell'urotensina II dato che presentava analogia con la somatostatina e quindi capace di ricoprire funzioni somatostatina-simili in tessuti dei mammiferi[4]. Si è riusciti successivamente a sintetizzare la molecola in laboratorio nel 1982 [5]. Poi si è valutato l'effetto dell'U-II su tessuti di mammiferi, in particolare esponendo l'aorta di ratto a diverse concentrazioni dell'U-II. I risultati di tale studio hanno dimostrato che il tessuto vascolare aortico, sottoposto a basse concentrazioni di U-II si rilassava, mentre sottoposto a concentrazioni maggiori si contraeva. Tale studio ha evidenziato l'azione dell'urotensina II su un tessuto di mammifero, un vaso di grosso calibro in questo caso, con progressive implicazioni verso un tessuto umano[6]. Si iniziò a comprendere la distribuzione dei recettori relativi all'U-II e le diverse forme molecolari della stessa con l'individuazione di potenziali effetti a livello cardiovascolare [7]. La struttura molecolare dell'U-II di

origine umana è stata chiarita e risulta essere composta di 11 residui aminoacidici a differenza dei 13 e 12 residui che componevano rispettivamente la molecola di U-II della rana e della carpa. Inoltre si è evidenziata la sequenza eptapeptidica della molecola nell'uomo, essenziale nell'attività biologica dell'U-II [8], riconoscendo che nella rana è altamente conservata all'estremità C terminale, mentre la sequenza rimanente all'N terminale è altamente variabile. La presenza della pre-pro-urotensina, molecola precursore dell' U-II, fu localizzata nell'uomo soprattutto nel midollo spinale e seppur in misura minore in diversi tessuti quali bulbo, milza, reni, timo, prostata, ipofisi, stomaco, pancreas, piccolo intestino, ghiandole surrenali e fegato[9]. In seguito si è pervenuti alla scoperta del recettore umano ad elevata affinità per l'U- II , un recettore accoppiato a proteine G, tale GPR14, capace di determinare una forte dose-dipendente mobilitazione del calcio a livello delle cellule dei tessuti su cui è espresso [10]. Poi si è scoperto che l'U-II causa rilassamento endotelio-dipendente in alcune arterie di tipo di piccolo calibro. Va precisato che in questo studio si attesta che l'effetto rilassante del U-II utilizzata a basse dosi nei ratti, similmente all'effetto ottenuto nelle scimmie e nei pesci, possa evidenziare nell'uomo un ruolo importante dell'endotelio in risposta alle somministrazioni di U-II. Per la prima volta nel 2001 l'U-II si dimostrò essere un potente vasodilatatore a livello delle arterie polmonari umane, equipotente all'adrenomedullina (ADM) che fino ad allora era ritenuta la molecola vasodilatante più potente[11]. La

conclusione di uno studio condotto qualche mese dopo quello precedentemente enunciato, concluse che l'U-II non aveva azione vaso-costrittiva in arterie e vene umane di differente taglia e nei letti vascolari e ciò risultò importante nella comprensione della regolazione del sistema cardiovascolare umano[12]. In seguito si è dimostrato che la risposta vascolare dell' U-II varia a seconda della specie, del tipo di vaso, della concentrazione, e della via di somministrazione. Infatti U-II provoca vasocostrizione nei grossi vasi di capacitanza di ratto (come aorta toracica, arterie polmonari, carotide) mentre ha un effetto vasodilatante nelle piccole arterie di resistenza sia murine che umane [12;13]. Nell'ultimo biennio è stata spostata l'attenzione degli studi relativi a tale molecola verso la sua azione nei corpi cavernosi del ratto e dell'uomo. I risultati dimostrano la presenza del recettore dell'U-II nei corpi cavernosi dell'uomo, in particolare sulle cellule endoteliali di tali tessuti ed è stato riscontrato il coinvolgimento del pathway U-II/UT nella fisiologia dell' erezione peniena [14]. L'azione dell'U-II è essenzialmente quella di rilassare l'endotelio dei corpi cavernosi con un meccanismo NO dipendente. L'U-II causa anche un incremento della pressione intracavernosa, il che potrebbe essere significativo ai fini dell'erezione [15].

OBIETTIVO DELLO STUDIO

Il nostro scopo è quello di valutare il ruolo dell' U-II nella fisiopatologia dell' erezione peniena. In particolare andremo ad indagare sul coinvolgimento del pathway L-Arg/NO nella vasodilatazione indotta dall' U-II in strisce di corpo cavernoso umano. In aggiunta vogliamo valutare se le cellule endoteliali del corpo cavernoso umano producono U-II e se tale produzione è di tipo autocrino o paracrino. Successivamente , il nostro obiettivo è quello di misurare i livelli plasmatici di U-II in una campione di uomini affetti da Deficit Erettile, e correlare i valori ottenuti con le variabili cliniche (comorbidità, indice di massa corporea-BMI, IIEF e MSHQ). Alla fine valuteremo in uno studio in vitro su strisce di corpi cavernosi, l'efficacia di un nuovo analogo sintetico dell'Urotensina II, il P5U, scoperto recentemente nei nostri laboratori ed avente funzione di super-agonista. Nella parte ultima dello studio, ma non per questo secondaria, sarà rivolta l'attenzione verso il concetto di biomarcatore in riferimento all'U-II.

MATERIALI E METODI

Il tessuto umano è stato ottenuto da interventi chirurgici di riconversione andro-ginoide, in cui il pene e i testicoli sono amputati ed una nuova vagina è creata per simulare genitali esterni femminili. Tali pazienti vengono sottoposti a pre-trattamenti ormonali appropriati, con antiandrogeni ed estrogeni per adattarsi all'aspetto femminile, e la terapia è sospesa due mesi prima della chirurgia. I corpi cavernosi sono accuratamente estratti dal pene immediatamente dopo l'amputazione e piazzati in una soluzione di Krebs ossigenata in ghiaccio freddo. I campioni ottenuti da una lista di dodici pazienti transessuali saranno processati per ottenere una buona attendibilità.

Sintesi di U-II e P5U

Le molecole oggetto di questo studio saranno sintetizzate con metodologie convenzionali di sintesi di peptidi in fase solida. In particolare la sintesi di questi composti sarà ottenuta via Fmoc e i prodotti finali saranno rimossi dalla resina con un reagente di scissione appropriato. Dopo la purificazione con HPLC i prodotti saranno identificati e valutati per la loro attività.

Studio funzionale su strisce di corpi cavernosi umani (HCC)

Strisce longitudinali di corpi cavernosi umani sono dissezionate dalla struttura trabecolare del pene e isolate. Le strisce di corpi cavernosi umani sono montate in un bagno organico contenente una soluzione di Krebs ossigenata (95% O₂ 5% CO₂) a 37 °C. Le strisce di corpi cavernosi umani sono connesse a trasduttori di forza isometrica

(model 7002, basile, italia) e cambiamenti nella tensione sono registrati continuamente usando una acquisizione computerizzata di dati (data capsule basile, italia). I tessuti sono precaricati con due g di tensione e lasciati equilibrare per novanta minuti nella soluzione di Krebs. Dopo l'equilibratura i tessuti sono standardizzati dalle contrazioni ripetute con la fenilefrina (PE; 3 μ M; Sigma, Italia) finché 3 risposte uguali sono ottenute. L'integrità endoteliale è ottenuta usando acetilcolina (Ach 0.01-10 μ M; Sigma, Italia). Delle strisce senza endotelio funzionale sono ottenute dall'incubazione in acqua distillata per 15 secondi. Una curva risposta della concentrazione a U-II (0.1 nM-10 μ M) sarà ottenuta in presenza o assenza dell'endotelio, usando strisce di corpi cavernosi umani pre-contratti con PE(3 μ M). Per accertare il coinvolgimento di L-arginina /NO pathway, le strisce saranno incubate con inibitori farmacologici selettivi (geldanamicina, wortmanina, ODU) prima della prova UII.

Studio del Western Blot

Allo scopo di valutare la relazione tra recettore UT e l'attivazione di NOS, il tessuto sarà incubato con U-II o veicolo a concentrazione differente (1 e 10 μ M) al tempo scandito e il rapporto di eNOS/p-eNOS sarà determinato. Gli stessi esperimenti saranno eseguiti con inibitori farmacologici di eNOS. I tessuti del corpo cavernoso umano sono omogeneizzati in un tampone modificato RIPA (Tris-HCl 50 mM, pH 7.4, Triton 1%, sodium deoxycholate 0.25 %, NaCl 150 mM, EDTA 1mM, PMSF 1

mM, aprotinin 10 µg/ml, leupeptin 20 µM, NaF 1 mM , sodium orthovanadate 1 mM) da nitrogeno liquido. Dopo la centrifugazione degli omogenati a 12,000 rpm per 15 min, 40 µg di proteine denaturate sono separate su gel di poliacrilammide SDS all'8% e trasferite su una membrana PVDF. Le membrane sono bloccate dall'incubazione in PBS contenente 5% di latte in polvere senza grassi per un'ora, seguite da un incubazione notturna a 4°C con anticorpi monoclonali di topo per eNOS(1:2000,BD,Biosciences). I filtri sono purificati estensivamente in PBS contenenti 0,1% v/v di Tween 20 e 5 % di latte in polvere senza grassi, prima dell'incubazione per due ore con anticorpi secondari anti ratto perossido-coniugati (1:5000; Santa Cruz Biotechnology, Inc. Europe). Dopo le membrane sono purificate in PBS contenente 0.1% v/v TWEEN 20 e sviluppate usando Enhanced Chemiluminescence Substrate (ECL, Amersham Pharmacia Biotech, USA). Dopo l'esposizione a ECL le membrane sono denudate e riprovate con anticorpi monoclonali di ratto per eNOs fosforilato (1:2000,BD,Biosciences). I filtri sono incubati per due ore con anticorpi secondari anti ratto per ossidasi coniugati (1: 5000) e risviluppati con ECL .

Coimmunoprecipitazione

Il tessuto umano sarà incubato con U-II a differente concentrazione (1 e 10µM) o veicolo al tempo scandito. I

lisati di HCC ottenuti sono incubati tutta la notte con 20 microlitri di anticorpi di coniglio policlonale anti GPR 14 (Santa Cruz Biotechnology, Inc Europe.) e 40 microlitri di proteina agarosio in un rocker per acquisire gli immunocomplessi. I campioni di proteine sono separati in SDS PAGE al 10%, trasferiti su membrane PVDF e incubati con anticorpi monoclonali di topo anti eNOS(1:2000)(BD,Biosciences) a 4 °C, seguiti dall'incubazione di anticorpi antiratto per ossidasi coniugati (1:5000) per due ore a 4°C. Le membrane vengono poi purificate e sviluppate usando ECL (Amersham Pharmacia Biotech, USA).

Studio immuno istochimico

Allo scopo di dimostrare se le cellule endoteliali possano rappresentare una fonte del peptide U-II , uno studio immunoistochimico sarà condotto. Campioni di HCC sono fissati al 4% di formalina e incorporati in paraffina. Le sezioni sono tagliate (6 µm) e usate per investigare specifiche proteine dall'immunofluorescenza. Sezioni in paraffine dopo essere state deparaffinate e reidratate, sono bollite per trenta minuti in tampone citrato per il ripristino antigenico. Le sezioni sono incubate in tampone bloccato per un'ora alla temperatura ambiente in una camera umidificata. Biotina endogena è stata bloccata con Avidin/Biotin Blocking Kit (Vector Laboratories, Burlingame, CA). Le sezioni sono incubate (4°C) tutta la notte con anticorpi non coniugati policlonali peptide antiurotensina II(C19) (1:100; Santa Cruz, Biotechnology,

Inc Europe) diluito in un reagente bloccante all'1% (Perkin Elmer)/ 0.3 % Triton X-100 in PBS. Le sezioni incubate con siero di capra all'1% sono usate come controlli negativi. In seguito, le sezioni sono incubate con anticorpi secondari d'asino anticapra coniugati con rosso texas (1:100, Jackson Immunoresearch) per trenta minuti . Dopo la purificazione le sezioni sono incubate per un'ora con anticorpi monoclonali di topo anti cellula α muscolare liscia FITC coniugati (1:250;Sigma) o per due ore con anticorpi policlonali anti- von Willebrand fattore, come marcatore di cellule endoteliali (vWF,1:100;Dako) e coniugati con anticorpi secondari anti coniglio d'asino FITC per 30 minuti. DAPI è stato usato per colorare il nucleo. Le immagini sono state riprese con il supporto di una videocamera(Leica,Italia) connessa a un microscopio usante un software Leica Application Suite V2.4.0 e processate usando il software di Adobe Fotoshop 7.0.

Consenso

Il protocollo sarà sottoposto al comitato etico della scuola di medicina dell'Università Federico II di Napoli. Ai volontari sani, pazienti affetti da D.E. e transessuali sottoposti a cambiamento di sesso sarà chiesto di sottoscrivere un consenso informato.

Studio clinico

Un campione di 50 volontari sani e 100 pazienti sarà

arruolato e i livelli di plasma del U-II saranno misurati dal kit EIA . I pazienti saranno sottoposti ad una visita standard nell'unità di Andrologia dell'Università "Federico II" di Napoli. Tutti i pazienti affetti da DE **da almeno 6 mesi**, anche se già in trattamento farmacologico , che accetteranno di firmare il consenso informato, saranno arruolati nello studio. Informazioni anagrafiche e sessuologiche saranno ottenute da ogni paziente durante una intervista strutturata, che esplorerà la presenza di fattori di rischio, comorbidità e trattamento medico relativo a disfunzione erettile o ad altre malattie . In più sarà chiesto a tutti i pazienti di compilare un questionario (IIEF). L'international index of erectile function (IIEF) è un questionario di quindici items costruito per essere compilato dallo stesso paziente al fine di esplorare tutte le fasi della funzione sessuale (erezione, soddisfazione nel rapporto sessuale, funzione orgasmica, desiderio sessuale e soddisfazione in generale). Ogni risposta apporta un punteggio che va da 0 e arriva a 5, identificando con 0 lo stato del paziente più severo per quell'ambito e con 5 quello meno severo, tra questi due valori limite si inseriscono i valori 1,2,3 e 4. Sommando i punteggi delle risposte si arriva a definire il grado della D.E. : grave (punteggio 6-10), moderata(11-16), lieve(17-25), assenza di disfunzione erettile (26-30). In particolare il questionario indaga l'attività sessuale del paziente dell'ultimo mese e tale precisazione deve essere evidenziata prima di iniziare la compilazione del questionario. Inoltre tale questionario può essere utilizzato per seguire l'andamento nel tempo della

D.E. e valutare eventuali miglioramenti o peggioramenti.

L'esame fisico includerà il calcolo della BMI e la misurazione sanguigna della pressione arteriosa. Alla fine della visita il medico esprimerà un giudizio sull'eziologia della DE : organica, psicogena o mista. I campioni di sangue saranno ottenuti nello stesso giorno o nei giorni seguenti: sarà esaminata una routine sierica, comprensiva dei livelli plasmatici di O₂, testosterone e prolattina.

Forma e valutazione dei risultati

I risultati estrapolati dallo studio funzionale saranno espressi come il valore principale +/- SEM e saranno analizzati usando ANOVA seguito da test di Bonferroni.

I risultati ottenuti dagli studi clinici saranno riportati con significatività +/- SD. La percentuale e le proporzioni saranno espresse come intervallo di confidenza di Wilson al 95%(CI). Sono riportati due test di significatività a due code , e valori di p minori di 0.05 saranno considerati significativi. Il test di Kolmogorov-Smirnoff sarà utilizzato per valutare la normalità di distribuzione delle variabili continue, il livello plasmatico di U-II e data la normalità significativa osservata in partenza, è applicata la trasformazione logaritmica e mantenuta quando i risultati vengono riportati. Allo scopo di analizzare le variabili cliniche riportate durante la visita strutturata, ed i punteggi dei questionari IIEF e MSHQ, sarà condotta l'analisi fattoriale. I componenti con i valori uguali o superiori ad 1 saranno presi in considerazione.

Questo studio può essere d'aiuto nello svelare il complesso meccanismo sottostante la fisiopatologia dell'erezione peniena umana, ed in particolare il ruolo del pathway U-II/UT. In più questa ricerca potrebbe condurre allo sviluppo di nuovi approcci terapeutici nel trattamento della DE, e la correlazione dei livelli plasmatici di U-II e la severità della DE, può essere un rilevante endpoint come biomarker nella DE.

RISULTATI

La via biochimica dell'NO è risultata essere coinvolta, da studi precedenti, nel rilassamento dei corpi cavernosi causato dall'U-II [14]. Si è osservato in studi preliminari che, incubando campioni di tessuto penieno con U-II, si induce un'augmentata produzione di NO, suggerendo il coinvolgimento della eNOS. Sapendo che fisiologicamente l'attivazione della eNOS è mediata dallo ione calcio, abbiamo utilizzato sia un chelante del calcio (EDTA), tale da impedire l'ingresso dello ione nella cellula, sia l'inibitore del rilascio del calcio intracellulare (acido ciclopiazonico). L'EDTA e l'acido ciclopiazonico riducevano significativamente il rilassamento da U-II ($P < 0.05$; Fig. 2). Evento chiave coinvolto nella attivazione della eNOS è la formazione del complesso Ca/calmodulina. Su tale presupposto abbiamo utilizzato antagonisti della calmodulina (calmidazolium) e si è osservato una significativa riduzione della vasodilatazione indotta dall'U-II ($P < 0.05$; Fig. 3).

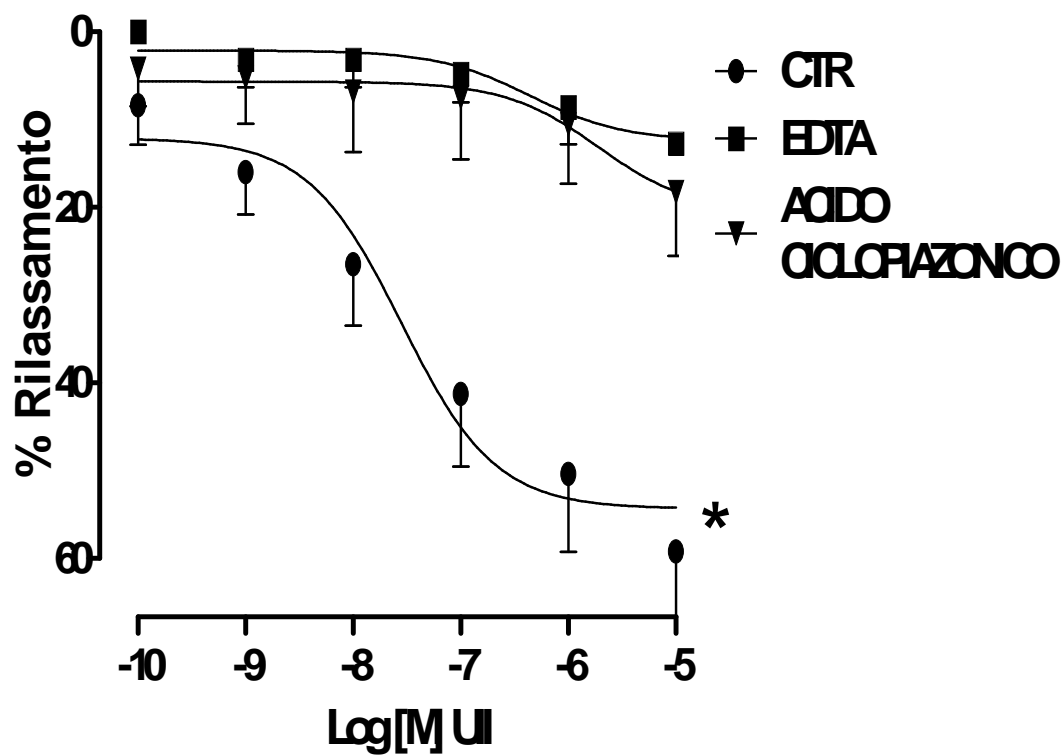


Fig. 2

L' acido ciclopiazonico e l' EDTA riducevano significativamente *($P < 0,05$) il rilassamento indotto da U-II in strisce di HCC.

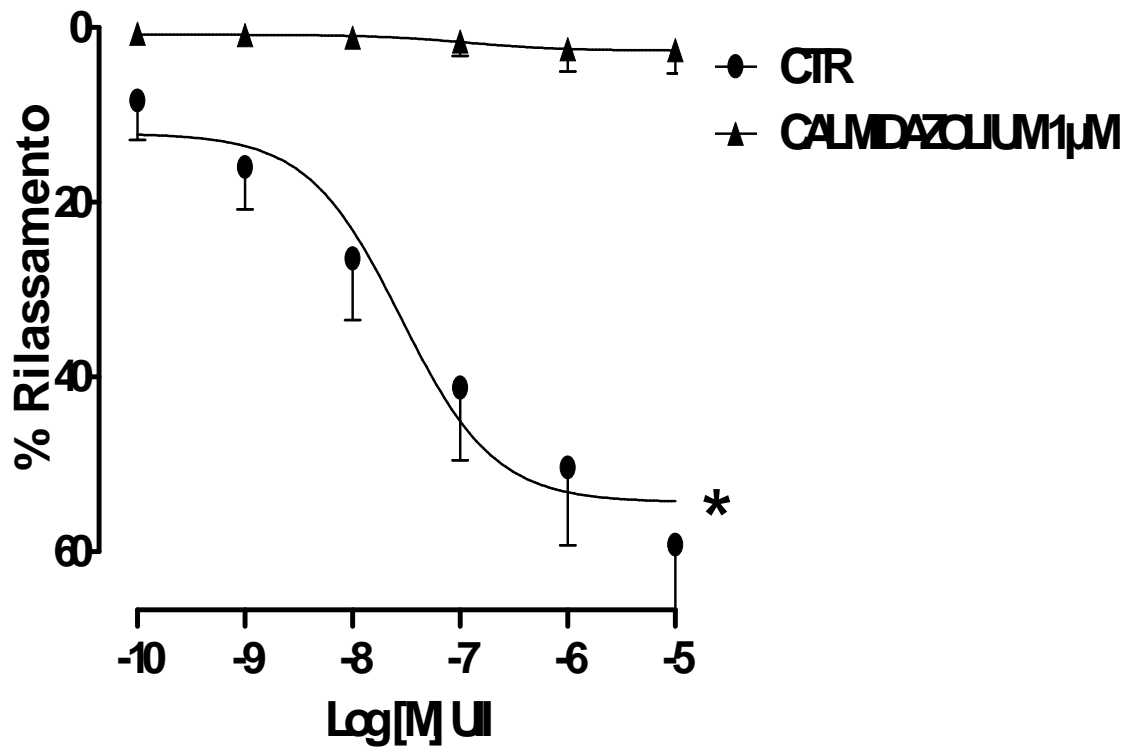


Fig. 3

Il calmidazolium riduceva significativamente *(P<0,05) il rilassamento indotto da U-II in strisce di HCC.

DISCUSSIONE

La proteina umana urotensina II (U-II), che deriva dal pre-pro-U-II dopo un taglio proteolitico effettuato dall'enzima (UCE), è un ormone peptidico ciclico isolato circa 40 anni fa dal pesce Teleosto per la prima volta, avente peptidi omologhi successivamente identificati in diverse specie, tra cui l'uomo. L' U-II è responsabile di una duplice azione: vasocostrittiva e vasodilatativa a seconda dell' endotelio, del distretto vascolare, e della specie considerata. Sebbene l'origine della produzione di U-II nel corpo umano rimane piuttosto sconosciuta, è stato recentemente dimostrato che l'U-II è secreta dal cuore e da molteplici altri tessuti e lega un recettore accoppiato a proteina G (GPR14) chiamato recettore UT [15]. Sia l'U-II che il recettore UT sono espressi ubiquitariamente in differenti tessuti come il cuore, cervello, reni e cellule muscolari lisce dei vasi [16]. Ad oggi appare evidente che l'U-II è potenzialmente un modulatore dell'omeostasi cardiovascolare nell'uomo. Più recentemente è stato dimostrato che il pathway U-II/UT riveste un ruolo importante nell'erezione peniena. Infatti la somministrazione intracavernosa di U-II causa un aumento della pressione intracavernosa nei ratti, seguita da erezione.

Si è dimostrato che il corpo cavernoso umano possiede il recettore UT che è localizzato principalmente sull'endotelio e che l'U-II, dopo essersi legato a tali recettori, agisce mediante un pathway che coinvolge il NO nell'erezione peniena[17]. Il recettore UT media un rilassamento endotelio dipendente che coinvolge il pathway L-Arg/NO. L'NO è prodotto da un gruppo di enzimi : ossido nitrico sintasi neuronale (nNOS), inducibile (iNOS) ed endoteliale

(eNOS) [18,19]. Questi enzimi convertono arginina in citrullina, producendo NO. L'attività degli enzimi NOS è soggetta a numerosi meccanismi di regolazione interconnessi. Esistono diverse vie attraverso le quali avviene la regolazione della produzione di NOS : distribuzione intracellulare, espressione genica, legame di proteine mediatrici, attivazione enzimatica da fosforilazione oppure inibizione cellulare dell'attività NOS. L'isoforma enzimatica eNOS e l'isoforma nNOS sono enzimi fisiologicamente importanti per l'erezione peniena. Queste isoforme costitutive sono regolate da una serie di cofattori quali il calcio, le proteine leganti il calcio, la calmodulina, l'ossigeno e il NADPH ridotto. Si ritiene che altre modificazioni come il legame della heat shock protein 90 (hsp90) e la fosforilazione di Ser 1177 abbiano effetto sulla attivazione di eNOS. Mentre i meccanismi calcio dipendenti iniziano l'erezione peniena, la fosforilazione di Ser1177 è invece responsabile del raggiungimento e successivo mantenimento di una completa erezione peniena. Gli eventi successivi sono dipendenti dall'iperattivazione della eNOS che avviene come risultato di PI3-K/Akt/eNOS (Ser1177), fosforilazione determinata da un sostenuto rilascio di NO. Vari stimoli chimici come VEGF, recettori estrogenici modulatori, sfingosina 1 fosfato o fattori meccanici come lo shear stress causano un importante rilascio di NO dalle eNOS. A tal proposito lo scopo del presente studio è quello di chiarire la relazione tra U-II/UT e il pathway L-Arg/NO nel tessuto penieno umano. A tal uopo abbiamo utilizzato inibitori del calcio che

riducevano significativamente il rilassamento indotto da U-II. Ipotizziamo quindi che l'U-II una volta legata al suo recettore presente sulla cellula endoteliale determini l'ingresso del calcio che a sua volta attiva i depositi intracellulari attivando così la eNOS attraverso il legame con la calmodulina. Al fine di confermare tale ipotesi abbiamo utilizzato un antagonista della calmodulina. Tale antagonista (calmidazolium) riduceva il rilassamento indotto da U-II che quindi attiverebbe la eNOS attraverso il legame Ca/Calmodulina. Inoltre l'U-II potrebbe rivestire un interesse anche da un punto di vista terapeutico, potendo essa stessa rappresentare un potenziale farmaco o in associazione con gli inibitori della PDE-5 avendo come target comune il cGMP.

Vale la pena rimarcare che i livelli plasmatici di U-II sono aumentati in pazienti con problemi a carico dell'apparato cardiocircolatorio [20,21]. Quindi un altro obiettivo in tale studio sarà quello di valutare i livelli plasmatici di U-II in pazienti affetti da DE. A tal proposito l'U-II può verosimilmente rappresentare un futuro biomarcatore nella diagnosi di laboratorio e nel trattamento nel tempo della DE.

U-II COME BIOMARCATORE

Un biomarcatore per definizione è una molecola, nella

maggior parte dei casi una proteina, che informa sul funzionamento di un organo o di un apparato o più semplicemente informa su una funzione biologica. Le caratteristiche ideali di un biomarcatore sono la facile reperibilità, l'alta specificità e sensibilità, il basso costo. Per quanto riguarda la prima caratteristica si ritiene facilmente reperibile un biomarcatore che non abbia bisogno di metodiche invasive o costose per essere valutato e dosato. Nella maggior parte dei casi i biomarcatori sono ottenuti da prelievi sanguigni che pur avendo insita in loro stessi una inevitabile invasività (seppur minima), hanno un rapporto rischi/benefici spostato verso quest'ultimo. La sensibilità e la specificità sono due caratteristiche statistiche che rendono il biomarcatore un esame valido e attendibile. E' quasi impossibile ottenere un biomarcatore che abbia specificità e sensibilità uguali al 100%. Bisogna tener presente infatti che la variabilità interindividuale è sempre presente e che gli errori di campionatura o tecnici possono sempre accadere. Però esistono diversi biomarcatori che mostrano con una certa affidabilità la funzionalità di alcuni organi, ad esempio la creatina chinasi cardiaca, le lipasi pancreatiche ecc. Il costo non è una caratteristica trascurabile del biomarcatore , proprio considerando l'ambito professionale in cui gli operatori sanitari ed i medici lavorano ogni giorno. Si intende con questo che un biomarcatore non validato e dai costi elevati sarà considerato diversamente rispetto ad un altro di provata validità e dal costo accessibile. In questo contesto si inserisce lo studio trattato in questa tesi , che alla luce della

ricerca biochimica, farmacologica e medica alla base di qualsiasi progetto scientifico, si riserva anche l'obiettivo di valutare l'utilizzo dell'urotensina -II come biomarcatore nel follow up e nel trattamento della disfunzione erettile. Il lavoro in oggetto pur avendo in sé qualcosa di pionieristico, perché da circa 2 anni l'attenzione si è spostata verso gli effetti dell'U-II su corpi cavernosi dell'uomo, sta fornendo i primi risultati. Abbiamo estratto dallo studio in questione un campione contenente i risultati relativi al dosaggio dell'U-II di 21 pazienti affetti da DE e di 14 controlli sani arruolati in un periodo di tempo che va dal 18/05/2010 al 28/09/2011. I criteri di inclusione dei pazienti maschi in tale studio sono i seguenti:

-età compresa tra i 18 ed i 75 anni;

-affetti disfunzione erettile (DE);

-non affetti da malattie infettive quali epatite B, C, AIDS ecc.

-non affetti da diabete oppure affetti da diabete ma in trattamento con metformina;

-non affetti da ipertensione oppure ipertesi ma sotto controllo farmacologico (eccetto quelli trattati con beta-bloccanti che vanno esclusi);

-non sottoposti in passato ad interventi chirurgici pelvici quali la prostatectomia radicale;

I risultati indicano un livello crescente del valore di U-II dosato, in relazione al grado di severità della DE

riscontrata (valutata secondo il questionario IIEQ). In particolare esiste una correlazione statistica inversa considerando i valori di U-II nei malati di DE ed i corrispondenti questionari indicativi del grado di DE, dato che una DE grave è contrassegnata da un punteggio IIEF basso, mentre una DE lieve è contrassegnata da un punteggio IIEF più alto. Più grave è la disfunzione erettile e più alto è il valore di U-II rilevato. Di contro il valore dell'U-II dosata nei controlli si attesta su un valore nettamente inferiore, in alcuni casi anche 4 volte inferiore rispetto ad alcuni pazienti. Ciò induce a pensare che l'aumento dei valori di U-II nei pazienti affetti da disfunzione erettile rappresenti un tentativo fisiologico da parte dell'organismo di far fronte ad una situazione che non risulta essere più nella normalità, una sorta di meccanismo feedback simile. I dati sono stati analizzati anche con un test statistico, nel caso in questione con un test T di Student, a due code, con dati non appaiati per variabili continue quali i valori di U-II nei malati di DE e nei controlli. Il test è risultato statisticamente significativo per i gradi di libertà e l'errore alfa corrispondenti (rispettivamente 33 e 0,05). Quindi la differenza esistente tra i valori di U-II rilevata nei malati di DE ed i controlli non è dovuta al caso. Tali risultati andranno confermati per far sì che possa essere chiara la relazione esistente tra i valori di U-II ed il grado di disfunzione erettile ed anche per capire se si possa ritenere verosimile un utilizzo dell'U-II come biomarcatore nel trattamento e nel follow-up della disfunzione erettile.

BIBLIOGRAFIA

1. N Engl J Med. 1992 Jan 9;326(2):90-4.

Nitric oxide as a mediator of relaxation of the corpus cavernosum in response to nonadrenergic, noncholinergic neurotransmission.

2. Rajfer J, Aronson WJ, Bush PA, Dorey FJ, Ignarro LJ

David F, Jean PG, and William CS. *Post translational control of Endothelial Nitric Oxide Synthase: why isn't calcium/calmoduline Enough*. The Journal of Pharmacology and experimental therapeutics 2001, 220:815-61

3. Teleost caudal neurosecretory system: release of urotensin II from isolated urophyses.

Berlind A.

Gen Comp Endocrinol. 1972 Jun;18(3):557-60

4. Urotensin II: a somatostatin-like peptide in the caudal neurosecretory system of fishes.

Pearson D, Shively JE, Clark BR, Geschwind II, Barkley M, Nishioka RS, Bern HA.

Proc Natl Acad Sci U S A. 1980 Aug;77(8):5021-4

5. Studies on peptides. CVII. Synthesis of urotensin II.

Akaji K, Fujii N, Yajima H, Pearson D.

Chem Pharm Bull (Tokyo). 1982 Jan;30(1):349-53.

6. Complex effects of Gillichthys urotensin II on rat aortic strips.

Gibson A.

Br J Pharmacol. 1987 May;91(1):205-12

7. Distribution and molecular forms of urotensin II and its role in cardiovascular regulation in vertebrates.

Conlon JM, Yano K, Waugh D, Hazon N.

J Exp Zool. 1996 Jun 1-15;275(2-3):226-38

8. Eur J Pharmacol. 1988 Apr 27;149(1-2):61-6.

Functional receptors for fish neuropeptide urotensin II in major rat arteries.

Itoh H, McMaster D, Lederis K

9. Cloning of the cDNA encoding the urotensin II precursor in frog and human reveals intense expression of the urotensin II gene in motoneurons of the spinal cord.

Coulouarn Y, Lihmann I, Jegou S, Anouar Y, Tostivint H, Beauvillain JC, Conlon JM, Bern HA, Vaudry H.

Proc Natl Acad Sci U S A. 1998 Dec 22;95(26):15803-8

10. Biochem Biophys Res Commun. 1999 Dec 9;266(1):174-8.

Identification of urotensin II as the endogenous ligand for the orphan G-protein-coupled receptor GPR14.

Liu Q, Pong SS, Zeng Z, Zhang Q, Howard AD, Williams DL Jr, Davidoff M, Wang R, Austin CP, McDonald TP, Bai C, George SR, Evans JF, Caskey CT.

11. Am J Physiol Heart Circ Physiol. 2001 Feb;280(2):H925-8.

Potent vasodilator responses to human urotensin-II in human pulmonary and abdominal resistance arteries.

Stirrat A, Gallagher M, Douglas SA, Ohlstein EH, Berry C, Kirk A, Richardson M, MacLean MR

12. Circulation. 2001 Mar 13;103(10):1378-81.

Effects of urotensin II in human arteries and veins of varying caliber.

Hillier C, Berry C, Petrie MC, O'Dwyer PJ, Hamilton C

13. Effects of human urotensin II in isolated vessels of various species; comparison with other vasoactive agents.

Camarda V, Rizzi A, Calò G, Gendron G, Perron SI, Kostenis E, Zamboni P, Mascoli F, Regoli D.

Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol. 2002 Feb;365(2):141-9. Epub 2001 Nov 20.

14. J Sex Med. 2010 May;7(5):1778-86. Epub 2009 Sep 25.

Urotensin II: a novel target in human corpus cavernosum.

d'Emmanuele di Villa Bianca R, Cirino G, Mitidieri E, Coletta C, Grassia G, Roviezzo F, Grieco P, Novellino E, Imbimbo C, Mirone V, Sorrentino R

15. Amas RS, Saran HM, Chamber JK, Willette RN, Holmes SD, Mc Nutty DE. *Human urotensin II is a potent vasoconstrictor and agonist for the orphan receptor GPR 14*. Nature 1999, 401: 282-286

16. Maguire JJ, Kuc RE, Davenport AP. *Orphan receptor ligand human urotensin II : receptor localization in human tissues and comparison of vasoconstrictor responses with endothelin-1*. Br. J. Pharmacol. 2000, 131:441-6

17. D' Emmanuele R, Sorrentino R, Maffia P, Mirone V, Imbimbo C, Fusco F, De Palma R, Ignarro LJ, Cirino G. *Hydrogen sulfide as a mediator of human corpus cavernosum smoothle-muscle relaxation*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 2009, 106:4513-8

18. Alderton WK, Cooper CE, Knowles RG. *Nitric oxide synthases structure, function and inhibition*. *Biochem. J.* 2001, 357:593-615
19. Nathan C and Xie QW. *Nitric oxide synthase: roles, tools and controls*. *Cell* 1994, 78:915-918
20. Jarolim P. *Serum biomarkers for heart failure*. *Cardiovasc. Pathol.* 2006, 15:144-149
21. Joyal D, Hyrich T, Douglas S, Giaid A. *Urotensin II levels in acute coronary syndromes*. *Int. J. Cardiol.* 2006, 108:31-35