



UNIVERSITÀ DELLA CALABRIA



UNIVERSITA' DELLA CALABRIA

Dipartimento di Biologia, Ecologia e Scienze della Terra

Scuola di Dottorato

Life Sciences

Indirizzo

Biologia Animale

Con il contributo della Commissione Europea, Fondo Sociale Europeo e della Regione Calabria

CICLO

XXVIII

Il ruolo del GPER nelle arterie uterine e mesenteriche in gravidanza

Settore Scientifico Disciplinare BIO/09 Fisiologia

Direttore: Ch.mo Prof. *Marcello CANONACO*

Marcello Canonaco

Supervisore: Dott. *Maurizio MANDALA'*

Maurizio Mandala'

Dottoranda: Dott.ssa *Teresa TROPEA*

Teresa Tropea

ANNO ACCADEMICO 2014 - 2015

"La presente tesi è cofinanziata con il sostegno della Commissione Europea, Fondo Sociale Europeo e della Regione Calabria. L'autore è il solo responsabile di questa tesi e la Commissione Europea e la Regione Calabria declinano ogni responsabilità sull'uso che potrà essere fatto delle informazioni in essa contenute".

Ringraziamenti

Questa tesi racchiude solo in parte il frutto di un impegnativo ma appassionante e inatteso percorso di tre anni.

Il lavoro sperimentale condotto durante un Dottorato di Ricerca è una sfida affascinante continua: insinua dubbi, risponde ad alcune delle domande che ci poniamo, talvolta soddisfacendo le nostre aspettative, in altri casi, deludendole o smuovendo ancora di più quella forte curiosità che nutre smisuratamente la voglia e il desiderio di conoscere e capire oltre l'evidenza.

La parte che completa questo percorso, non la troverete scritta, in quanto è diventata componente integrante del mio essere e che mi auguro sia la base giusta per la mia corretta crescita professionale. Ed è per questo che non potrò mai smettere di ringraziare abbastanza il mio supervisore, il Dott. Maurizio Mandalà, per avermi dato fiducia, la possibilità di scoprire un Mondo che non immaginavo nemmeno minimamente potesse esistere, la Fisiologia Vascolare. “Le paure limitano”, questa sua espressione ricorrente mi accompagnerà per tutta la vita e sarà la spinta giusta per osare e non lasciarmi ostacolare. Grazie Maurizio, per tutto quello che mi hai insegnato e trasmesso, per l'impostazione (forse un po' rigida) che mi hai dato e per avermi avviato alla Ricerca.

Grazie al Dr. Mark Wareing, il mio supervisore presso il “Maternal & Fetal Health Research Centre” di Manchester, che mi ha guidato durante il periodo di studio all'Estero, soddisfacendo sempre le mie continue richieste finalizzate ad apprendere tecniche nuove.

Grazie di cuore alla Dr.ssa Elizabeth Cottrell, che con la sua immensa pazienza ha sempre risposto alle mie domande, anche quando sembrava impossibile capirle, grazie per avermi avviato allo studio della biologia molecolare ma soprattutto, per la grande possibilità concessami, è un sogno che diventa realtà.

Ringrazio tutto lo staff del “Maternal & Fetal Health Research Centre” di Manchester, per la disponibilità; ma un grazie particolare va ai ragazzi del MandaLab, che con la loro forza sono sempre stati un valido sostegno, soprattutto dopo la mezzanotte, quando la stanchezza si faceva sentire. Spero che la nostra amicizia cresca all'infinito, senza mai tramontare.

Un grazie diverso, ma dal profondo del mio cuore va alla mia famiglia, soprattutto ai miei genitori, che mi hanno sempre sostenuta, credendo da subito nelle mie potenzialità e spingendomi sempre a fare meglio, accantonando la delusione del momento.

Infine, ma non meno importante, è il grazie che dico a Pietro, perché in questi tre anni ha fatto di tutto per semplificare le mie difficoltà, aiutandomi senza limiti di spazio e tempo e comprendendomi con lodevole pazienza. Grazie.

A Chantal

INDICE

	SUMMARY	pag.	1
1.	INTRODUZIONE		
1.1	<i>Rimodellamento della vascolatura uterina e mesenterica associato alla gravidanza</i>	pag.	3
1.1.1	<i>Anatomia vascolare dell'utero</i>	pag.	4
1.1.2	<i>Emodinamica dell'utero in gravidanza</i>	pag.	7
1.1.3	<i>Patterns del rimodellamento circonferenziale</i>	pag.	8
1.2	<i>Meccanismi responsabili del rimodellamento vascolare</i>	pag.	14
1.2.1	<i>Alterazioni del rimodellamento vascolare e preeclampsia</i>	pag.	22
1.3	<i>Estrogeni</i>	pag.	24
1.3.1	<i>Sintesi degli estrogeni</i>	pag.	25
1.3.2	<i>Recettori estrogenici: struttura e funzione</i>	pag.	29
1.3.3	<i>Effetti genomici o a lungo termine</i>	pag.	32
1.3.4	<i>Effetti non genomici o rapidi</i>	pag.	34
1.3.5	<i>Vie di segnalazione degli estrogeni</i>	pag.	38
1.3.6	<i>Azione degli estrogeni sulle cellule endoteliali e sulle cellule muscolari lisce</i>	pag.	42
1.3.7	<i>Concentrazioni degli estrogeni e distribuzione dei recettori estrogenici in gravidanza</i>	pag.	51
1.4	<i>GPR30/GPER</i>	pag.	57
1.4.1	<i>Immunolocalizzazione e siti subcellulari di attivazione di GPER</i>	pag.	59
1.4.2	<i>Agonisti e antagonisti di GPER</i>	pag.	63
1.4.3	<i>Meccanismo di segnalazione mediato da GPER</i>	pag.	67
1.4.4	<i>Interazione di GPER con altri recettori</i>	pag.	71
1.4.5	<i>Funzione di GPER nel sistema cardiovascolare e nella regolazione del tono</i>	pag.	74
1.4.6	<i>Ruolo di GPER nella vascolatura</i>	pag.	76
2	MATERIALI E METODI		
2.1	<i>Animali e tessuti</i>	pag.	82
2.2	<i>Pressure myography</i>	pag.	84
2.3	<i>Wire myography</i>	pag.	86
2.4	<i>Protocollo sperimentale</i>	pag.	86
2.5	<i>Analisi immunoistochimica</i>	pag.	88
2.6	<i>Western blotting</i>	pag.	89
2.7	<i>Soluzioni e farmaci testati</i>	pag.	91
2.8	<i>Analisi dei dati</i>	pag.	92
3	RISULTATI	pag.	93
4	DISCUSSIONE	pag.	108
	BIBLIOGRAFIA	pag.	112

SUMMARY

Low uteroplacental blood flow has been implicated as a cause of pregnancy hypertension and intrauterine fetal growth retardation. A successful pregnancy outcome requires a sufficient uteroplacental blood flow, which increases of many fold compared to the non pregnant levels. This significant increase is achieved in part by vasodilation of the uterine vasculature because pregnancy induces a physiological remodelling of the maternal uterine circulation. Estrogen may contribute to this effect although the mechanisms involved remain unclear. It is known that estrogen receptor- α and estrogen receptor- β in the uterine vascular endothelium are both functionally implicated in the regulation of the uterine blood flow but so far nothing is known about the novel G-protein coupled estrogen receptor (GPER) in the uterine vasculature. GPER has been identified in many vascular bed exerting its potential vasorelaxing effect.

The aim of this study was to investigate the function of GPER in the regulation of the uterine vascular tone during pregnancy.

Experiments were carried out on mesenteric arterioles and uterine radial arteries isolated from both non-pregnant (NP) and age-matched pregnant (P) Sprague Dawley rats to compare reproductive and systemic vasculature effect.

Arterial segments were pressurized to 50 mmHg in the pressure myography, precontracted of 40% with phenylephrine and then incubated with incremental doses (10^{-12} - 10^{-6} M) of the specific GPER agonist, G-1.

A dose-response curve was obtained for G-1 in the 1 pM – 1 μ M range with a maximum vasodilation of uterine arteries of $97,8 \pm 2,5\%$ in P vs $66,5 \pm 3,7\%$ in NP, $p < 0.001$.

G-1 vasorelaxing effect was similar in pregnant ($45,5 \pm 6,1\%$) and non-pregnant ($53,6 \pm 2,3\%$) mesenteric arteries. Pregnancy induced a significantly higher G-1 vasodilation only in uterine artery and its protein expression was also increased. G-1 effect was significantly reduced by the GPER antagonist, G-15.

The NOS inhibitors, L-NAME+L-NNA or endothelium removal reduced the G-1 induced relaxation of uterine artery, suggesting an endothelium-dependent mechanism, involving cGMP pathway but not BK_{ca} channels.

Immunohistochemistry revealed the GPER expression in the main uterine artery of both eNOS^{-/-} and wild type pregnant mice. This receptor was functionally activated in a dose response manner with a significant less effect in knock out mice, showing the relevance of the NO in GPER pathway. GPER is also present in human chorionic plate arteries and its activation induces a slight vasodilation.

These results demonstrate for the first time that GPER may have a role in regulating vascular tone, placental perfusion and normal fetal development, suggesting a potential therapeutic target in pregnant diseases.

1. INTRODUZIONE

1.1 Rimodellamento della vascolatura uterina e mesenterica associato alla gravidanza

Il normale decorso della gravidanza è noto indurre rapide, progressive e sostanziali variazioni a carico del sistema cardiovascolare (Morris et al., 2015).

La gravidanza è di fatto associata ad un drammatico aumento del flusso sanguigno uterino che consente l'adeguato apporto di ossigeno e nutrienti al feto, di vitale importanza per il successo della crescita e dello sviluppo del nascituro (Magness, 1999; Meschia, 1983; Ramsey, 1973). Poiché la pressione di perfusione uterina cambia molto poco durante la gravidanza, è necessario si verifichi una significativa riduzione della resistenza vascolare uterina, attraverso la combinazione di variazioni funzionali (vasodilatazione) e strutturali (crescita e rimodellamento) (Magness, 1999; Meschia, 1983; Ramsey, 1973; Osol et al., 1993; Cipolla et al., 1994).

Il processo di rimodellamento vascolare, *condicio sine qua non* per il normale decorso della gravidanza nei mammiferi, implica meccanismi tridimensionali di allargamento circonferenziale e allungamento assiale, variazioni di proprietà biomeccaniche e caratteristiche vascolari basilari (shear stress, ossido di azoto, fattori di crescita endoteliale vascolare e placentare, sistema renina-angiotensina), meccanismi cellulari d'invasione trofoblastica, iperplasia, ipertrofia e cambiamenti nella composizione della matrice extracellulare.

A questi si aggiungono alterazioni della funzione cellulare secretoria, delle proprietà contrattili della muscolatura liscia e l'up-regolazione delle influenze vasodilatatrici endoteliali che contribuiscono, nel complesso, all'aumento del flusso sanguigno uteroplacentare, attraverso variazioni del tono e della struttura vascolare (Mandalà et al., 2012).

L'interfaccia materno-fetale, adibita al controllo dello scambio di nutrienti, gas e prodotti di rifiuto, richiede la formazione di un complesso sistema di trofoblasti, cellule placentari di lignaggio epiteliale, la cui differenziazione è essenziale per il rimodellamento delle arterie uterine e la funzione della placenta (Aghababaei et al., 2014). La mancata invasione della decidua dell'utero materno da parte dei trofoblasti può causare complicazioni della gravidanza clinicamente importanti, come il parto pretermine, il diabete gestazionale, la preeclampsia e la restrizione della crescita fetale.

I trofoblasti extravillosi invasivi, derivanti da una sottopopolazione di citotrofoblasti localizzata alle punte dei villi di ancoraggio placentari, che subisce una transizione epitelio-mesenchimale, allontanandosi dai villi invadono in profondità l'endometrio e il miometrio (Chen et al., 2012), avendo come target specifici due grandi assi: quello endovascolare, attraverso il lume delle arteriole spirali della decidua uterina e quello interstiziale, attraverso il tessuto materno (Pijnenborg et al., 2006).

Durante il corso della gravidanza, sono dunque le piccole arterie spirali ad essere profondamente trasformate in vasi più grandi a forma d'imbuto, a seguito dell'invasione trofoblastica, garantendo il necessario apporto sanguigno alla placenta (Ramsey, 1973; Meschia, 1983; Brosens et al., 1972; Brosens et al., 2002; Roberts, 1998), tuttavia, il processo di rimodellamento vascolare delle arteriole radiali è tutt'oggi oggetto d'interesse e studio.

Sebbene il rimodellamento vascolare sia particolarmente marcato a livello locale, nella vascolatura uterina, è stata testata l'ipotesi di come anche la vascolatura di resistenza sistemica, a livello mesenterico, vada incontro a significative alterazioni delle proprietà meccaniche passive e delle proteine della matrice extracellulare (Mackey et al., 1992), dimostrando differenze regionali nei meccanismi d'azione (Osol G et al., 2008). Questo supporta il concetto che il rimodellamento della parete arteriosa nel sistema vascolare periferico potrebbe essere un componente degli adattamenti cardiovascolari che si manifestano in gravidanza (Mackey et al., 1992).

Inoltre, poiché il rischio di patologie tipicamente gestazionali, come la preeclampsia, è più elevato nelle donne primipare e diminuisce successivamente, questo fenomeno suggerirebbe che l'adattamento associato alla prima gravidanza attenua il rischio di successive gravidanze associate ad ipertensione (Morris et al., 2015).

1.1.1 Anatomia vascolare dell'utero

Nella maggior parte dei mammiferi, inclusa la specie umana (Fig.1A), il sangue è trasportato all'utero in modo bidirezionale, attraverso un ciclo arterioso anastomotico doppio in cui una estremità (le due arterie ovariche) origina dall'aorta e l'altra (le arterie uterine) dalle arterie iliache interne.

Tale disposizione anatomica bilaterale, di contro a quella lineare, fornisce all'utero una doppia fonte di sangue e una considerevole ridondanza in caso di occlusione. Dall'arteria principale utero-ovarica nascono vasi perpendicolari che passano nel corpo dell'utero per formare le arterie arcuate. Queste circondano l'organo all'interno del miometrio, appena sotto la sua superficie sierosa (esterna) e da esse si dipartono arterie radiali più piccole che penetrano il miometrio in maniera centripeta, prima di ramificarsi in arteriole basali e spirali all'estremità mio-endometriale.

Le prime si diffondono a formare una rete lungo il confine mio-endometriale, mentre le seconde penetrano ulteriormente nell'endometrio e terminano vicino alla cavità uterina in capillari che sono, a loro volta, drenati da venule che si fondono in vene più grandi.

Nell'utero dei roditori (Fig.1B) l'arteria e la vena utero-ovarica principale decorrono parallele alla parete uterina entro un foglio planare di tessuto connettivo chiamato mesometrio, i cui vasi sono perfusi dal sangue arterioso proveniente da entrambe le estremità uterina e ovarica, secondo un flusso bidirezionale.

Vasi secondari, analoghi alle arterie arcuate negli esseri umani, possono formare con l'arteria principale una sorta di anelli ridondanti, collegati con la parete uterina dalle arterie radiali terziarie. Queste ultime, definite anche mesometriali o segmentali, possono essere ulteriormente classificate in base alla loro destinazione come premiometriali o preplacentari. Le arterie radiali premiometriali entrano nella parete uterina tra i siti placentari e si ramificano nel plesso arterioso intrauterino che rifornisce il miometrio, mentre le arterie radiali preplacentari si dilatano prima di afferire alla placenta attraverso il processo di invasione trofoblastica endovascolare.

Oltre a presentare patterns distintivi del rimodellamento durante la gestazione le arterie premiometriali, rispetto alle preplacentari, hanno anche dimostrato diversi modelli di reattività.

Negli ungulati, invece, quali la pecora o il maiale, l'arteria uterina principale ha origine dal ramo ombelicale dell'arteria iliaca interna e si divide in quattro rami principali che anastomizzano con i vasi controlaterali lungo la curvatura minore del corno uterino. Questi danno origine ai vasi a spirale ramificati che corrono lungo la superficie ventrale e dorsale dell'utero a formare le arterie arcuate, con rami più piccoli (arterie radiali) che penetrano il miometrio e terminano in arteriole all'interno dell'endometrio.

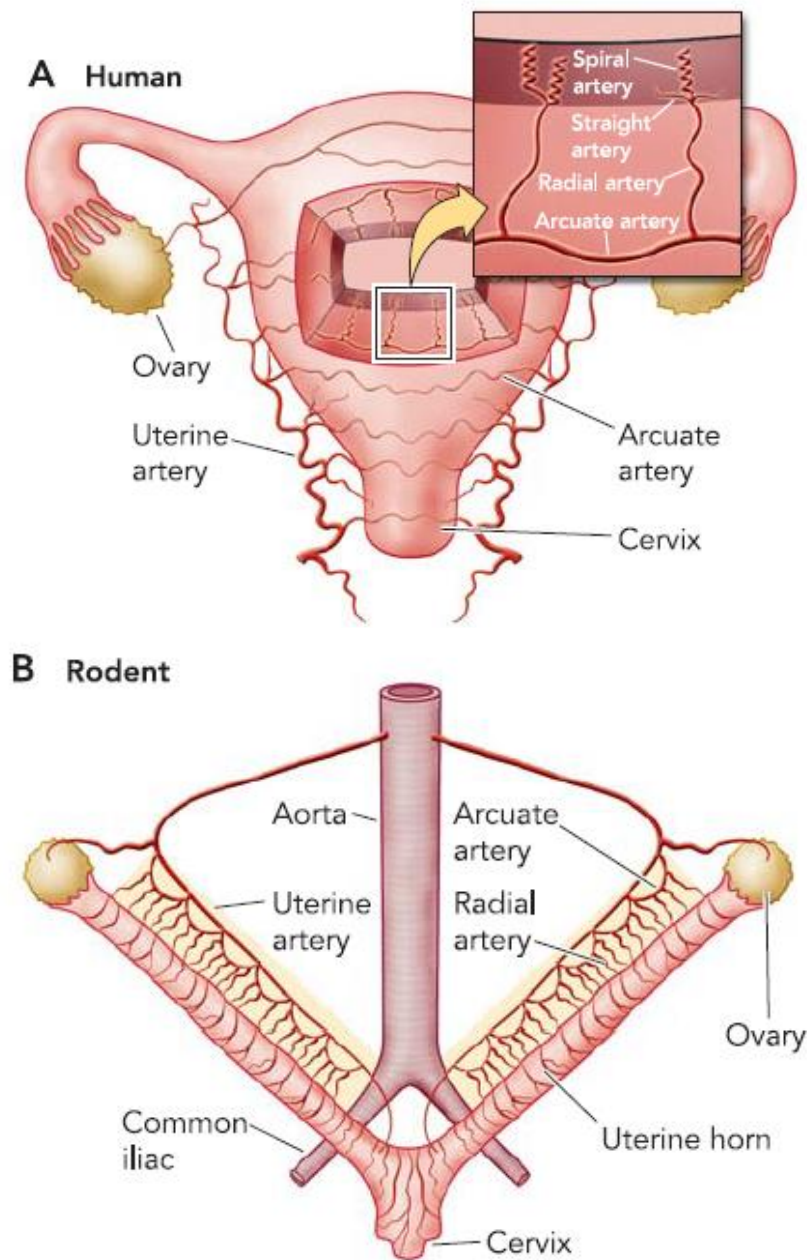


Figura 1: Anatomia comparativa della circolazione uterina nella specie umana (A) e nei roditori (B) (Osol and Mandalà, 2009).

Più in particolare, mentre gli esseri umani e i roditori presentano una placentazione di tipo emocoriale (avendo bassa resistenza), la placenta degli ungulati è epiteliocoriale, quindi più simile ad un vero microcircolo. Ad ogni modo, negli esseri

umani, così come nelle altre specie l'utero è drenato da un sistema venoso parallelo all'albero arterioso.

1.1.2 Emodinamica dell'utero in gravidanza

Nella donna e in animali da esperimento, come i roditori, il flusso sanguigno uteroplacentare aumenta notevolmente rispetto ai livelli dello stato non gravido e oltre il 90%, con l'avanzare della gravidanza è diretto alla placenta (Dowell and Kauer, 1997; Rosenfeld et al., 1974; Lees et al., 1971). I cambiamenti emodinamici sono principalmente dovuti alla profonda riduzione della resistenza vascolare uterina, che si realizza attraverso la combinazione del rimodellamento espansivo (crescita vascolare) e della maggiore vasodilatazione (variazioni funzionali nella reattività) (Mandalà et al., 2012).

I primi studi condotti sugli umani (Assali et al., 1953; Assali et al. 1960; Metcalfe et al., 1955) utilizzando il principio dell'equilibrio di diffusione e sonde elettromagnetiche posizionate direttamente sull'arteria uterina hanno riportato che il flusso sanguigno utero-placentare (UPBF) totale aumenta da un valore base di 20-50 ml/min a 450-800 ml/min in gravidanze singole, con valori superiori a 1 l/min misurati in gravidanze gemellari.

Poiché la pressione sanguigna normalmente diminuisce o rimane invariata durante la gravidanza, le variazioni dell'emodinamica uterina sono principalmente influenzate da una profonda diminuzione della resistenza vascolare uterina. Da un punto di vista sistemico, l'aumento di UPBF è facilitato dalla combinazione di un sostanziale aumento della gittata cardiaca e dall'espansione del volume vascolare, che sono caratteristici nella gestazione in ogni specie studiata (Thornburg et al., 2000).

Negli esseri umani (Assali et al., 1960; Thaler et al., 1990) e nei porcellini d'India (Bjellin et al., 1975) l'aumento di UPBF è graduale e piuttosto lineare, mentre nel ratto, che ha una gestazione di 22 giorni, è rilevabile intorno a giorno 15 o ultimo "trimestre" di gestazione (Dowell and Kauer, 1997). A livello del miometrio, il flusso sanguigno totale aumenta in proporzione alla massa uterina, mentre il flusso di sangue uterino relativo può fluttuare e diminuire (Bjellin et al., 1975; Rosenfeld, 2001; Whitney et al., 1993) o rimanere pressoché costante (Dowell and Kauer, 1997; Ford et al., 1984) durante la gravidanza.

Nei mammiferi con placentazione emocoriale (roditori e umani) in cui la pressione intraplacentale creata dal sangue materno che occupa lo spazio intervilloso deve essere mantenuta abbastanza bassa per evitare la compressione dei vasi fetali (nei roditori) e intravillosi (umani), la resistenza vascolare uterina è fornita principalmente dai vasi a monte (Moll et al., 1975) dell'arcata mesometriale.

In tali soggetti, per passare dal compartimento materno a quello fetale una molecola deve attraversare solo due strati cellulari fetali, i trofoblasti e l'endotelio extravilloso. Al contrario, negli animali con placentazione epiteliocoriale, come il maiale, il sangue materno e fetale fluiscono attraverso piccoli vasi tra loro separati ma in stretta apposizione. Il sito di scambio di gas e nutrienti è compreso tra le due microvascolature e, considerata la maggiore resistenza e l'aumento del numero degli strati cellulari che le separano, la pressione intraluminale della placenta epiteliocoriale risulta significativamente maggiore di quella emocoriale (Moll et al., 1973).

1.1.3 Patterns del rimodellamento circonferenziale

Dal punto di vista strutturale, il rimodellamento circonferenziale descrive variazioni del diametro luminale e dello spessore della parete vascolare in risposta a stimoli fisiologici o patologici (Marchi et al., 2011).

In base all'aumento o alla riduzione del diametro del lume può essere rivolto verso l'esterno o verso l'interno mentre, qualora lo spessore della parete vascolare si riduca, aumenti o rimanga invariato può essere definito, rispettivamente, ipo-, iper- o eutrofico (Mulvany, 1999). È un assunto comune che le variazioni dell'area della sezione trasversale indichino variazioni dello spessore della parete, qualora la lunghezza del vaso non sia alterata (Osol and Mandalà, 2009).

Caratteristico della gravidanza è il rimodellamento ipertrofico verso l'esterno (outward hypertrophic), che risulta in un aumento del diametro del lume, a prescindere dallo spessore della parete, poiché l'area della sezione trasversale risulta aumentata (Fig. 2).

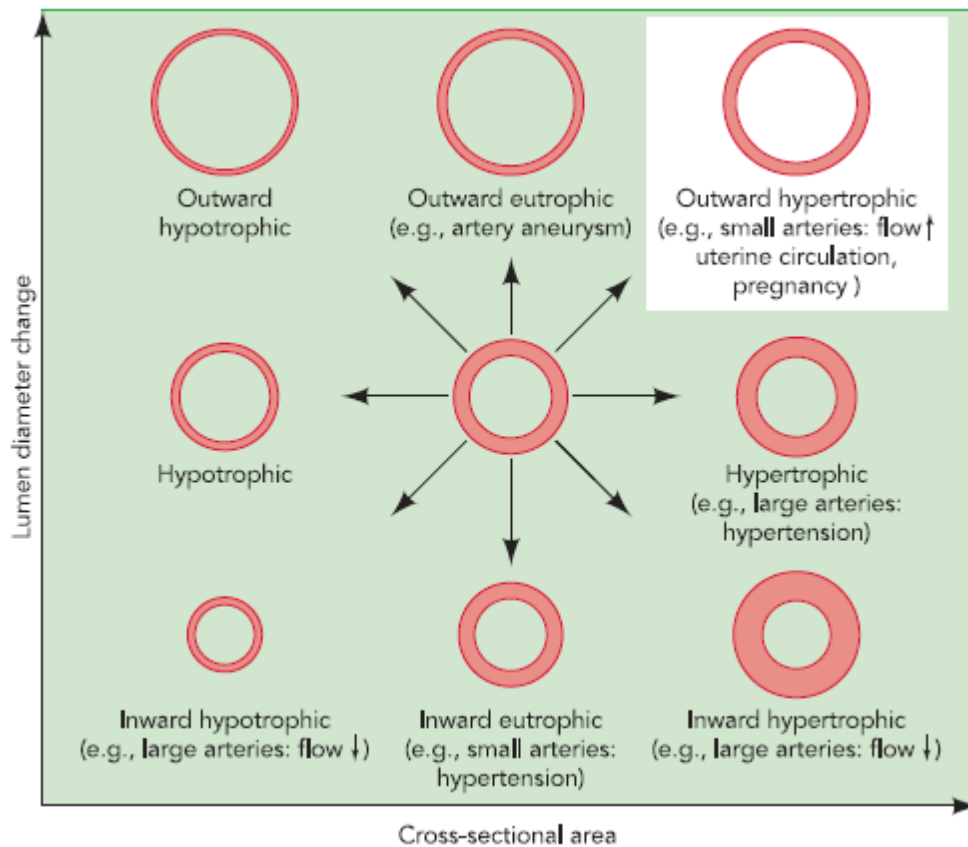


Figura 2: Patterns bidimensionali del rimodellamento arterioso (Osol and Mandalà, 2009).

Studi in letteratura su diversi animali sperimentali riportano che il diametro dell'arteria uterina aumenta in generale anche da due a tre volte (Annibale et al., 1990; Griendling et al., 1985; Guenther et al., 1988; Keyes et al., 1997; Mateev et al., 2006; Moll, 2003; Nienartowicz et al., 1989; Palmer et al., 1992; van der Heijden et al., 2005; van der Heijden et al., 2004). L'allargamento del calibro arterioso si verifica molto spesso con un ridotto o assente ispessimento della parete vascolare (Annibale et al., 1990; Osol and Cipolla, 1993), con l'unica apparente eccezione nel topo in cui lo spessore della parete aumenta significativamente durante il corso della gestazione (van der Heijden et al., 2005(a); van der Heijden et al., 2005(b)).

In uno studio condotto sulle arterie radiali miometriali di donne affette da preeclampsia (Ong et al., 2005), il pattern di rimodellamento riporta un lume più piccolo e una parete più spessa, senza variazioni nell'area della sezione trasversale, suggerendo un riarrangiamento degli elementi della parete preesistenti e un rimodellamento eutrofico verso l'interno (inward eutrophic).

Sebbene le variazioni della lunghezza venosa o arteriosa si verificano raramente nell'adulto, la circolazione uterina durante la gravidanza è un'eccezione pertinente e

degni di nota poichè i vasi esistenti subiscono un notevole allungamento (Osol and Mandalà, 2009).

Poiché la tunica media occupa la maggior parte della parete, l'allargamento luminale sarebbe dovuto all'aumento della lunghezza delle cellule muscolari lisce vascolari, secondo un meccanismo di ipertrofia assiale. Dati di letteratura riportano un aumento del 20% della lunghezza delle cellule muscolari lisce, a riposo, dei vasi arcuati di ratte gravide rispetto a ratte vergini non gravide (Cipolla and Osol, 1994); nei porcellini d'India (Hees et al., 1987), tale aumento è di circa l'86% (21-39 µm), associato ad un analogo aumento dello spessore cellulare del 108% (4.6-9.6 µm).

Nella donna, al fine di accomodare l'unità fetoplacentare sono necessarie la crescita assiale delle arterie arcuate così come l'allargamento circonferenziale dell'utero. Resta da chiarire se questo processo è mediato realmente dalla crescita longitudinale o, piuttosto, dal progressivo stiramento delle arterie spirali poiché la tortuosità è caratteristica dell'anatomia della vascolatura uterina umana (Farrer-Brown et al., 1970 (1); Farrer-Brown et al, 1970 (2)).

Al contrario, in mammiferi che partoriscono numerosi piccoli, come il topo e il ratto, la crescita assiale dell'arteria uterina principale è chiaramente evidente e la sua lunghezza utero-ovarica raddoppia o triplica al termine della gravidanza rispetto allo stato di non gravidanza, così come nel porcellino d'India (Nienartowicz et al., 1989). Anche i vasi mesometriali (arcuati e radiali) presentano un aumento della lunghezza da tre a cinque volte (Moll et al., 1983; Osol and Cipolla, 1993). Tenendo conto del rimodellamento circonferenziale e assiale, il reale aumento della massa della parete dell'arteria uterina nel ratto è dell'ordine del 300-700%.

È interessante considerare anche il peso del rimodellamento circonferenziale rispetto a quello assiale circa l'emodinamica uterina in quanto, gli aumenti in lunghezza risulterebbero in influenze opposte alla resistenza rispetto ai casi in cui il diametro aumenta. Infatti, il rapporto tra la lunghezza e la resistenza è lineare, mentre il rapporto tra il diametro (o raggio) e la resistenza è inverso e quadratico, come espresso nella legge di Poiseuille che correla le variazioni della lunghezza del vaso, del diametro e della viscosità del sangue alla resistenza del flusso alterato secondo la seguente formulazione matematica:

$$R = \varepsilon L / r^4$$

dove R è la resistenza, ε la viscosità, L la lunghezza, ed r il raggio interno.

Tralasciando le modificazioni di tono e reattività, l'effetto combinato del raddoppio sia della lunghezza che del diametro di un tubo sarebbe teoricamente quello di ridurre la resistenza di un fattore 8 e, in assenza di cambiamenti della viscosità o della crescita di nuovi vasi, di indurre un corrispondente aumento del flusso sanguigno. Chiaramente, il rimodellamento circonferenziale espansivo e la riduzione della resistenza distale dovuta alla placentazione esercitano un effetto sinergico che può risultare in aumenti di UPBF di molte volte. Infine, ulteriori fattori reologici, quali la riduzione della viscosità del sangue (Oosterhof et al., 1993), si verificano durante la gravidanza contribuendo a ridurre la resistenza al flusso sanguigno secondo la legge di Poiseuille.

Durante la gravidanza, anche le proprietà biomeccaniche dei vasi uterini si modificano in modo significativo. Nell'arteria uterina principale delle pecore, la massa muscolare liscia vascolare e il contenuto proteico, comprese actina e miosina, raddoppiano, con un corrispondente aumento del volume cellulare (Annibale et al., 1990). Oltre all'ipertrofia cellulare, vi è anche una forte evidenza di iperplasia della parete vascolare, dovuta all'aumento del tasso di divisione delle cellule muscolari lisce in vene e arterie uterine di ratti e porcellini d'India (Cipolla and Osol, 1994; Cipolla et al., 1997; Hammer and Cipolla 2005; Keyes et al., 1996; Keyes et al., 1997; Page et al., 2002). Le variazioni dell'ultrastruttura del muscolo liscio sono associate all'aumento della tensione per l'area della sezione trasversale.

Da uno studio condotto nel 1985 da Griendling et al., l'incremento passivo del modulo elastico, che descrive il rapporto tra lo sforzo applicato e la deformazione che ne deriva, aumenta da 4 a 29 dyn/cm² nelle arterie uterine principali di pecore in gravidanza prossime al termine, rispetto alle non gravide (Griendling et al., 1985). Poiché questo è espressione del rapporto tra tensione e deformazione, i valori più alti indicano un materiale meno conforme, dati indicativi di un aumento della rigidità arteriosa e diminuzione della compliance. Nello stesso studio, tuttavia, la distensibilità arteriosa come funzione della pressione risulta chiaramente aumentata, in accordo con la distensibilità delle arterie uterine principali di cavie gravide (Keyes et al., 1997; Mateev et al., 2006). Nei ratti, le arterie arcuate e radiali sono molto più distensibili durante la gravidanza (Osol et al., 1993; Page et al., 2002) e nel coniglio, le arterie radiali preplacentari risultano significativamente molto più distensibili dei vasi premetriali (Cipolla et al., 1997).

Più comunemente, le variazioni della compliance sono attribuite ad alterazioni del volume della matrice extracellulare, alla sua composizione e all'orientamento delle

fibre di collagene ed elastina, con alcune differenze in base alla specie, come ad esempio, nelle arterie uterine principali di ovini (Griendling et al., 1985) e suini (Guenther et al., 1988) ove il contenuto di collagene diminuisce significativamente senza cambiamenti nell'elastina.

Al contrario, Robertson e Manning (Robertson and Manning, 1973) hanno riportato una riduzione del contenuto di elastina delle arterie spirali di donne in gravidanza e, nei ratti, il significativo aumento della distensibilità circonferenziale correla con la riduzione del contenuto di elastina nella vena uterina principale (Page et al., 2002).

Così come le arterie, anche le vene vanno incontro al processo di rimodellamento espansivo. Il diametro della vena uterina principale, completamente distesa, nei ratti in gravidanza aumenta di circa il 65 % rispetto alla non gravidanza (1.576 μm vs 956 μm); la lunghezza raddoppia (Page et al., 2002). A questo si associa l'aumento della distensibilità, dell'indice mitotico delle cellule endoteliali e del muscolo liscio e la riduzione del contenuto di elastina.

Da uno studio condotto da Mackey e collaboratori nel 1992 sulle arterie di resistenza mesenteriche di ratto, la distensibilità risulta aumentare durante la gestazione. Al termine della gravidanza, la relazione tensione-deformazione e il modulo elastico indicano una riduzione della rigidità della parete e, con essa, una riduzione della concentrazione di elastina e collagene del 15% e del 19% rispettivamente (Mackey et al., 1992), contribuendo alla riduzione delle risposte vasocostrittorie.

La durata e il modello di rimodellamento possono anche essere caratteristici della dimensione e della localizzazione del vaso e variare tra le specie. I risultati di uno studio condotto in ratti suggeriscono che il rimodellamento può iniziare nei vasi più piccoli, prossimali ai siti di placentazione o alla parete uterina e poi, al progredire della gravidanza, procede verso i vasi a monte, di calibro maggiore (Cipolla and Osol, 1994).

Oltre all'influenza dell'età gestazionale e della specie sulla natura e sull'estensione del rimodellamento, sono state notate alcune differenze nei vasi di diverse dimensioni, tipo e posizione. Ne sono esempio i vasi preplacentari, che aumentano in dimensioni più dei premetriali (Fig. 3) nei conigli (Cipolla et al., 1997) e nei ratti (Gokina et al., 2003; Hammer and Cipolla, 2005) e potrebbero mostrare anche differenze significative nei tassi di divisione cellulare, distensibilità e reattività. I vasi preplacentari del mesometrio si dilatano progressivamente man mano che si avvicinano alla placenta, maggiormente all'estremità distale rispetto a quella prossimale.

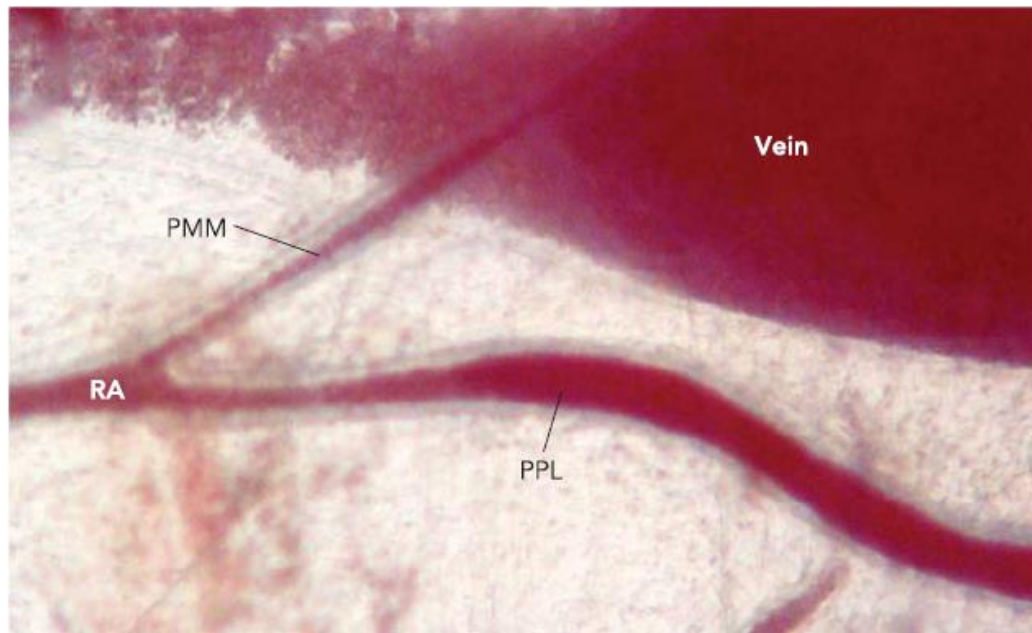


Figura 3: Segmento del mesometrio uterino di un ratto a 20 giorni di gravidanza. RA = arteria radiale prossimale, PPL = arteria preplacentare, PMM = arteria premetriale (Osol and Mandalà, 2009).

La porzione prossimale dei vasi, nel processo di rimodellamento, mediante l'allargamento e l'allungamento vascolare, preserva i suoi elementi funzionali contrattili; viceversa, la porzione distale del vaso pre-placentare si allarga ma perde completamente la sua capacità contrattile, presumibilmente a seguito dell'invasione trofoblastica endovascolare che distrugge gli elementi muscolari intramurali (muscolatura liscia vascolare) (Pijnenborg et al., 1981). Queste variazioni sono drammatiche specialmente nel porcellino d'India, con aumenti di tre volte nella circonferenza per tutta la lunghezza del singolo vaso durante la gravidanza.

Differenze strutturali localizzate potrebbero anche essere relate al diverso tasso di shear stress, un meccanismo implicato nel processo di rimodellamento espansivo o, nel caso delle arterie spirali immediatamente prossimali alla placenta, all'invasione trofoblastica associata alla placentazione (Osol and Mandalà, 2009).

1.2 Meccanismi responsabili del rimodellamento vascolare

Nella donna, durante una gravidanza normale, all'aumento dell' output cardiaco e del volume sanguigno si contrappone la riduzione della pressione arteriosa, che raggiunge il suo valore più basso nel secondo trimestre (Halligan et al., 1993). Questi adattamenti sono dovuti alla sostanziale riduzione della resistenza vascolare periferica, i cui pathways fisiologici sono corrente oggetto di ricerca, necessari per consentire il considerevole incremento del flusso sanguigno dell'unità fetoplacentare. Adattamenti vascolari anormali in gravidanza sono, di fatto, associati a complicazioni come la proteinuria e l'ipertensione, caratteristici della preeclampsia.

Il rimodellamento vascolare è un processo attivo, dipendente da crescita, morte, migrazione e produzione/degradazione della matrice extracellulare (Kelly et al., 1999), ognuno dei quali è soggetto a influenze interattive e regolatorie multiple, che includono forze fisiche come la pressione, lo stiramento e lo shear stress dovuto alla tensione di taglio del flusso sanguigno, (Noris et al., 1995; Ranjan, et al., 1995), influenze endocrine e umorali, steroidi sessuali e fattori locali provenienti dalla parete vascolare. Questi ultimi sono connessi con l'impianto, la placentazione e la crescita fetale e con cambiamenti sistemici nei livelli ormonali, in particolare relativi alle concentrazioni di estrogeni e progesterone, o ad una loro combinazione.

In particolare, in diversi modelli sperimentali animali e nella donna, nei vasi sanguigni sistemici, come le piccole arterie mesenteriche (Gant et al., 1987), la gravidanza è associata ad una riduzione della sensibilità della risposta vasocostrittoria ad agonisti adrenergici (Davidge and McLaughlin, 1992) e all'angiotensina (Paller, 1984), a cui si contrappone l'aumento della vasodilatazione endotelio-dipendente prevalentemente mediata, nel ratto, dalla maggiore modulazione del tono vascolare (Pascoal et al., 1995) da parte dell' ossido nitrico (NO).

Oltre alla riduzione del tono miogenico (Meyer et al., 1993), il ruolo dell' NO è stato dimostrato, in gravidanza, dall'aumento della risposta ad agenti vasodilatatori endotelio-dipendenti, come l'acetilcolina (ACh) nelle arterie carotidi e uterine del porcellino d'India (Weiner et al., 1989) e la bradichinina nelle arteriole mesenteriche di ratto (Learmont et al., 1996), ma è stata anche ipotizzata la stimolazione estrogeno-mediata dell'isoforma calcio dipendente dell'ossido nitrico sintasi associata all'endotelio vascolare (eNOS) (Weiner et al., 1994).

I vasi sistemici del ratto in gravidanza risulterebbero, inoltre, molto più sensibili a basse concentrazioni di agenti vasodilatatori endotelio-indipendenti (Gerber et al., 1998), suggerendo una maggiore sensibilità delle cellule muscolari lisce.

La placentazione emocoriale fornisce un pathway a bassa resistenza per il flusso sanguigno materno, come conseguenza dell'eliminazione della microcircolazione intramiometriale e la formazione dello spazio intervilloso. La resistenza al flusso è, in seguito, ridotta dall'espansione arteriosa secondaria all'invasione trofoblastica endovascolare delle arterie placentali.

Le differenze nella struttura delle arterie spirali immediatamente prossimali alla placenta sono normalmente attribuite all'invasione trofoblastica che si verifica in associazione alla placentazione. In questo unico processo endovascolare, le cellule fetali del trofoblasto migrano nel lume arterioso, rimuovono l'endotelio e la muscolatura liscia della parete arteriosa e riorganizzano gli elementi della matrice (Adamson et al., 2002; Blechner et al., 1974; Brosens et al., 2002; Caluwaerts et al., 2005; Craven et al., 1998; Espinoza et al., 2006; Kaufmann et al., 2003; Lyall 2005; Pijnenborg et al., 1981).

Il coinvolgimento di altri tipi cellulari, come le cellule natural killer (NK), implicato nello sviluppo della preeclampsia (Goldman-Wohl and Yagel, 2007; Sargent et al., 2006) potrebbe anche giocare un ruolo nella placentazione, nell'invasione e nel rimodellamento delle arteriole spirali (Eastabrook et al., 2008; Santoni et al., 2008).

L'invasione endovascolare nei vasi che perdono completamente la loro capacità di contrarsi (Gokina et al., 2003) e assumono una forma a tromba, diminuisce ulteriormente la resistenza e facilita un aumento del flusso sanguigno.

Il rimodellamento risulta completo entro la metà del secondo trimestre (Pijnenborg et al., 2006). Nella prima fase, trofoblasto-indipendente, si ritiene che l'endometrio decidualizzato controlli il movimento dei trofoblasti attraverso l'espressione di regolatori come le proteinasi della matrice (MMPs), fattori endocrini e citochine (Burton et al., 2009; Pijnenborg et al., 2006).

Successivamente, i trofoblasti extravillosi (EVTs) a seguito dell'invasione e posizionati nelle arteriole spirali, si ritiene inducano l'apoptosi e rimpiazzino le cellule muscolari lisce ed endoteliali (Ashton et al., 2005; Keogh et al., 2007; Whitley and Cartwright, 2009). Di conseguenza, le arteriole spirali diventano dilatate, a bassa resistenza, irresponsive ad agenti vasocostrittori e prive dell'innervazione simpatica (Burton et al., 2009; Chang and Lubo, 2008). Queste

variazioni, insieme all'angiogenesi, consentono un incremento di 40 volte del flusso uterino alla placenta (Chang and Lubo, 2008).

Diversi studi hanno dimostrato una riduzione di questo processo nella genesi dell'ipertensione associata alla preeclampsia (Brosens et al., 2002), suggerendo che l'insufficiente rimodellamento dell'arteria spirale porta all'ischemia placentare, innescando il rilascio di segnali placentari che aumentano la pressione sanguigna materna per fornire una maggiore forza motrice e quindi, una pressione di perfusione superiore, per assicurare un adeguato UPBF.

Studi condotti da Langille e altri gruppi di ricerca (Ben Driss et al., 1997; Buus et al., 2001; Ceiler and De Mey, 2000; Erami et al., 2005; Lang et al., 2003; Langille, 1996; Loufrani and Henrion, 2005; Schiffers et al., 2000; Tuttle et al., 2001) hanno fermamente dimostrato che un aumento dello shear stress stimola il rimodellamento espansivo delle arterie di piccolo e grande calibro, in diversi letti vascolari.

Durante la gravidanza, lo stimolo principale per l'aumento dello shear stress nella circolazione materna uterina deriva dalla riduzione della resistenza vascolare a valle, secondaria alla placentazione emocoriale, che consente l'accelerazione della velocità del flusso e lo shear stress nei vasi a monte (Palmer et al., 1992). La vasodilatazione e la crescita vascolare, in tal modo, permetterebbero al flusso aumentato di continuare, con una velocità inferiore, normalizzando la tensione d'attrito nel processo. Uno studio condotto da Palmer e collaboratori nel 1992, riporta che la velocità del sangue nell'arteria uterina di donne alla 36esima settimana di gravidanza, è circa 8 volte maggiore rispetto alla condizione di non gravidanza (61.4 vs 8.4 cm/s).

I meccanismi molecolari mediante i quali lo shear stress porterebbe alla crescita circonferenziale dei vasi non sono noti, tuttavia, studi recenti hanno indicato l'NO quale importante mediatore di questo processo (Rudic et al., 1998; Tronc et al., 2000; van der Heijden et al., 2005 (a)). In effetti, diverse linee di evidenza supportano l'up-regolazione dell'eNOS e del meccanismo di segnalazione dell'NO in gravidanza (Osol et al., 2009; Nelson et al., 2000), dovuti all'aumento delle concentrazioni degli estrogeni e di fattori di crescita (VEGF e PlGF), combinati con l'elevato shear stress endoteliale. Entrambi i livelli di mRNA e proteico dell'eNOS, l'enzima responsabile della produzione di NO endoteliale, sono aumentati dallo shear stress, così come il rilascio dell'NO endoteliale stesso (Tuttle et al., 2001). In secondo luogo, topi knockout per il gene dell'eNOS, hanno mostrato una riduzione del rimodellamento vascolare e del flusso sanguigno uterino (van der Heijden et al., 2005 (a)) e

l'inibizione chimica della produzione dell'NO mediata dall'1-NAME abolisce virtualmente il rimodellamento espansivo dell'arteria uterina principale e delle arteriole radiali nel ratto, sebbene la crescita assiale sia risultata inalterata (Osol et al., 2009).

Nei trofoblasti extravillosi del porcellino d'India, la produzione di NO sembra aumentare la possibilità che altri tipi cellulari, come i macrofagi o i trofoblasti, stimolino la vasodilatazione e il rimodellamento della parete arteriosa e venosa, attraverso un'azione NO-dipendente (Nanaev et al., 2005).

Numerosi altri meccanismi sono stati implicati nel rimodellamento arterioso indotto dal flusso sanguigno, tra cui l'attivazione delle metalloproteasi della matrice (Tronc et al., 2000), influenze adrenergiche (Erami et al., 2005), recettori toll-like (Hollestelle et al., 2004), il citoscheletro (Loufrani and Henrion, 2008), inclusa la vimentina (Schiffers et al., 2000) e tirosina chinasi associate alla membrana come PYK2 (Tai et al., 2002).

Se lo shear stress elevato, secondario alla riduzione della resistenza vascolare a valle in seguito alla placentazione fosse l'unico stimolo del rimodellamento, questo escluderebbe la possibilità di tutte le modificazioni strutturali a carico dei vasi che forniscono sangue al miometrio. Sebbene le arterie radiali premetriali vadano incontro ad una minore estensione del rimodellamento rispetto ai vasi radiali preplacentari, tuttavia, nel ratto (Gokina et al., 2003; Hammer and Cipolla; 2005) presentano un diametro ed una lunghezza maggiore di quelli osservabili nella non gravidanza.

Il processo di rimodellamento include diversi meccanismi. Tra questi, il sistema renina-angiotensina sembrerebbe coinvolto mediante l'associazione tra l'angiotensina II e l'ipertrofia delle cellule muscolari lisce (Geisterfer et al., 1988). Una teoria corrente sulla genesi dell'ipertensione caratteristica della preeclampsia, in alcune donne, postula una componente autoimmune legata alla produzione di autoanticorpi diretti al recettore AT-1 (Dechend et al., 2004): la patologia potrebbe essere prevenuta attraverso la co-somministrazione dell'antagonista recettoriale (losartan) o di anticorpi neutralizzanti l'epitopo peptidico a sette aminoacidi (Zhou et al., 2008). La sovra-attivazione del sistema renina-angiotensina per effetto della somministrazione di una dieta povera di sodio in ratte gravide, attenua significativamente il normale aumento del diametro delle arterie arcuate di circa il 50% (Goldman and Yagel, 2007).

Osservazioni appropriate sulla sovra-attivazione del sistema renina-angiotensina derivano da uno studio del 2008 condotto da Verlohren e collaboratori, in ratti transgenici, che descrive ritardo della crescita fetale, alterazioni del rilassamento endoteliale dell'arteria uterina e ipersensibilità agli effetti costrittori della fenilefrina, un agonista dei recettori α 1-adrenergici, anomalie placentali (Lang et al., 2003).

Molto probabilmente, si tratta di un meccanismo umorale con effetti simili sui vasi preplacentari e placentari.

Anche variazioni delle influenze vasodilatatorie, come l'alterazione del meccanismo di segnalazione VEGF/PlGF (fattore di crescita vascolare endoteliale/placentare) sono ricorrenti in donne affette da preeclampsia, trattandosi di fattori di crescita capaci di indurre la vasodilatazione, stimolare la mitosi delle cellule endoteliali e sono associati con l'ipervascolarizzazione e l'allargamento dei vasi esistenti (Maynard et al., 2005; Odorisio et al., 2002).

Il PlGF è un membro della famiglia dei fattori di crescita vascolari endoteliali, che diversamente da alcune isoforme che legano entrambi i recettori, VEGFR-1 (Flt) e VEGFR-2 (KDR o Flk), agisce specificamente attraverso il recettore tirosina chinasi VEGFR-1, espresso sia nella forma legata alla membrana (Flt-1) che solubile (sFlt-1). Durante la gravidanza, la placenta è la principale fonte di PlGF e le sue concentrazioni plasmatiche aumentano più di 8 volte (Molvarec et al., 2010; Jeevaratnam et al., 2010; Woods et al., 2011) rispetto alla condizione di non gravidanza e più di 40 volte rispetto alle altre isoforme, sebbene abbia un'affinità di circa 1 su 10 per il VEGFR-1, rispetto agli altri fattori di crescita (Autiero et al., 2003).

Si tratta, infatti, di un potente vasodilatatore delle arterie di resistenza umane e di ratto in numerosi letti vascolari (Osol et al., 2008), con un meccanismo endotelio dipendente e mediato dal fattore iperpolarizzante di derivazione endoteliale (EDHF) associato all'attivazione dei canali del potassio, con differenze regionali nella vascolatura (Mandalà et al., 2012).

La riduzione delle concentrazioni del PlGF e l'aumento dei livelli del recettore sFlt-1 sono stati riportati nel siero di donne preeclampsiche (Brownbill et al., 2008; Savvidou et al., 2008).

La sovraespressione dell'isoforma recettoriale solubile è in grado di indurre una sindrome gestazionale capace di mimare la preeclampsia nel ratto (Maynard et al., 2003), dovuta alla riduzione della disponibilità di VEGF e PlGF ai tessuti: la perdita di tale influenza vasodilatatoria a livello della parete vascolare, ridurrebbe il flusso

sanguigno uteroplacentale, alterando il conseguente rimodellamento espansivo (Mandalà et al., 2012).

Alcuni studi hanno mostrato la correlazione tra il VEGF e gli estrogeni, supportando l'ipotesi che la maggiore vasodilatazione potrebbe risultare da un aumento estrogeno-indotto del recettore VEGFR-1 nella parete vascolare, non escludendo la possibilità di altri meccanismi d'azione (Mandalà et al., 2012).

Le variazioni della distensibilità vascolare sono attribuite ad alterazioni del volume e della composizione della matrice extracellulare, al contenuto di collagene e all'orientamento delle fibre di elastina.

Nella riorganizzazione della matrice giocano un ruolo centrale le metalloproteasi (MMPs) (Merchant and Davidge, 2004). Questa famiglia di enzimi capace di degradare localmente la matrice extracellulare, è soggetta a regolazione da parte degli steroidi sessuali e dell'NO.

Estrogeni e progesterone, singolarmente o in combinazione, infatti, modulano il gene codificante le MMPs delle cellule del muscolo liscio e l'espressione proteica, il turnover e la deposizione della matrice (Grandas et al., 2009; Natoli et al., 2005). Durante la gravidanza, nei tessuti vascolari risulta elevata l'attività delle isoforme MMP-2 e MMP-9 (Kelly et al., 1999) che, al contrario, è ridotta in tipiche patologie gestazionali come la preeclampsia (Myers et al., 2005; Raffetto and Khalil, 2008).

Tali indicatori sono espressione della capacità invasiva del trofoblasto, a livello del quale risultano a concentrazioni elevate nelle prime fasi della gestazione (Cohen et al., 2006; Staun-Ram et al., 2004; Xu et al., 2000). In aggiunta, da uno studio condotto nel 2010, è stato dimostrato il ruolo assunto dall'isoforma 12 nella ripartizione dell' elastina mediata dai trofoblasti extravillosi nel rimodellamento delle arteriole spirali (Harris et al., 2010).

Molecole vasoattive, mitogene e ipertrofiche secrete dall'unità fetoplacentare, dalla decidua o dal miometrio in seguito all'allungamento vascolare, giungono negli spazi intervillosi e vengono riversate nelle effluenze venose in cui la loro concentrazione abbonda prima di essere diluite nella circolazione sistemica passando, attraverso la parete venosa, in quella arteriosa adiacente e, di conseguenza, alterando tono, struttura e permeabilità vascolare. E' stato postulato che l'aumento di volume del feto porta all'allungamento miometriale a cui consegue l'induzione del rilascio di segnali mitogeni nell'efflusso venoso, stimolando l'iperplasia della parete venosa e l'allungamento strutturale. Anche le arterie umane devono necessariamente allungarsi durante la gravidanza: poiché le arterie radiali e arcuate sono contenute nel

miometrio e il volume dell'utero aumenta di circa 1000 volte, sono soggette direttamente a stiramento.

Dal punto di vista molecolare la base anatomica supporta il trasferimento venoarterioso nella circolazione uterina in quanto arterie e vene sono in stretta apposizione in numerose specie (Ginther, 1974; Celia and Osol, 2002; Celia and Osol, 2005) e nell'essere umano (Stewart and Nowak, 1998).

E' stato dimostrato, *in vitro*, che piccole molecole vasoattive perfuse nella vena uterina inducono variazioni di diametro nell'arteria uterina adiacente (Celia and Osol, 2002). Inoltre, la permeabilità venosa dell'utero di ratto risulta significativamente incrementata anche a segnali ad alto peso molecolare (70kDa), essendo regolata da forze fisiche come la tensione della parete e segnali molecolari come il VEGF (Celia and Osol, 2002; Celia and Osol, 2005).

Tale scambio fornisce un meccanismo per la regolazione fetoplacentare del flusso sanguigno materno ed è stato documentato in recenti studi sulla luteolisi nei quali i prostanoidi, secreti dal miometrio passano nelle vene uterine e sono trasferiti all'arteria ovarica, provocando vasocostrizione e ischemia che risulta nella morte del corpo luteo; tuttavia, il suo ruolo nel rimodellamento gestazionale della vascolatura uterina è ancora ipotetico (Osol and Mandalà, 2009).

L'ambiente endocrino della gravidanza è caratterizzato da concentrazioni di ormoni e fattori di crescita alterate, la cui fonte può essere placentale ma è specie-dipendente e induce vasodilatazione, altera la permeabilità e stimola il rimodellamento cellulare e della matrice (Osol and Mandalà, 2009).

L'inizio e la progressione della gravidanza dipendono primariamente dalle interazioni tra fattori neuronali e ormonali tra la placenta, il feto e il compartimento materno, la cui corretta tempistica è fondamentale nel coordinare la crescita, lo sviluppo del feto e il parto. Gli adattamenti materni ai cambiamenti ormonali che si verificano durante la gravidanza, quindi, influenzano direttamente lo sviluppo del feto e la placenta.

Nella donna il ciclo mestruale implica la produzione di ormoni steroidei ovarici, quali estrogeni e progesterone, che inducono variazioni strutturali e funzionali dell'endometrio finalizzate all'impianto dell'embrione e al mantenimento della gravidanza. Le loro concentrazioni aumentano progressivamente, per raggiungere il massimo valore al termine della gravidanza. Sia gli estrogeni che il progesterone esistono potenzialmente nel tessuto placentare a concentrazioni di gran lunga superiori di quelle riscontrabili nel sangue materno (King and Critchley, 2010).

Tali ormoni sono noti per la loro capacità di modulare le rispettive azioni: ad esempio, il progesterone antagonizza l'aumento del flusso sanguigno uterino estrogeno-mediato attraverso la deplezione dei recettori estrogenici nel citoplasma (Hsueh et al., 1975); di contro, gli estrogeni sovregolano la produzione di progesterone a livello del sinciziotrofoblasto e ne inducono la produzione dei recettori nelle cellule dello stroma uterino e del miometrio (Albrecht et al., 2000; Okulicz et al., 1989). Analogamente, estrogeni e progesterone sembrano anche bilanciarsi reciprocamente nel mantenimento del flusso sanguigno al sito di impianto. In generale, tra gli estrogeni, il 17β -estradiolo riduce la resistenza vascolare e promuove la vasodilatazione dell'arteria uterina (Sprague et al., 2009) attraverso un meccanismo legato all'NO e alle chinasi regolate dal segnale extracellulare (ERKs) (Chen et al., 2004). Gli estrogeni stimolano la sintesi del DNA nelle arterie radiali uterine (Tabata et al., 1988) e promuovono l'attività mitotica nella parete dell'arteria uterina (Keyes et al., 1996; Keyes et al., 1997; Forbes and Glassen, 1972; Jose et al., 2010); favoriscono la secrezione di fattori endometriali che promuovono la migrazione delle cellule muscolari lisce della vascolatura (VSMCs), come primo step del rimodellamento vascolare endometriale, (Babischkin et al., 2009) e giocano un ruolo nella regolazione dell'invasione e del rimodellamento delle arterie spirali uterine mediato dai trofoblasti extravillosi. Infatti, già durante i primi mesi di gravidanza sono necessari bassi livelli di estrogeni nei primati, per consentire la normale progressione dell'invasione trofoblastica mentre, il picco ormonale tipico del secondo trimestre, assolve una funzione fisiologica nel reprimere l'ulteriore invasione delle arterie (Albrecht et al., 2006). Tuttavia, rispetto al rimodellamento espansivo dell'arteria uterina è noto ben poco circa gli effetti mediati dagli estrogeni e dal progesterone. I risultati di uno studio sulla pseudo-gravidanza, ovvero lo stato in cui i livelli ormonali aumentano senza la presenza del feto o della placenta, hanno mostrato un significativo rimodellamento espansivo dell'arteria uterina principale dopo 10 giorni di stimolazione nel topo (van der Heijden et al., 2005 (b)), suggerendo l'esistenza di un sinergismo tra fattori locali e sistemici. Anche il progesterone stimola la maturazione vascolare nell'endometrio del topo (Girling et al., 2007), tuttavia è da valutare il suo ruolo nel rimodellamento vascolare uterino in gravidanza.

1.2.1 Alterazioni del rimodellamento vascolare e preeclampsia

Complicazioni della gravidanza come la preeclampsia sono associate ad anomalie che si riscontrano nel processo di rimodellamento. La preeclampsia è un disordine della gravidanza caratterizzato da ipertensione (pressione sistolica ≥ 140 mmHg o pressione diastolica ≥ 90 mmHg) e proteinuria (>300 mg/24 h), che si sviluppano solitamente dopo la 20esima settimana di gestazione nella donna.

Spesso ricorrono manifestazioni multisistemiche nella madre e nel feto (Sibai et al., 2005) che consentono di distinguere la preeclampsia da disordini ipertensivi cronici. Nota anche come gestosi, è responsabile per il 12% della mortalità materna e del 2-8% di tutte le gravidanze complicate nei Paesi sviluppati (WHO, 2005).

L'impatto sulla salute ha molteplici effetti. Nel periodo perinatale aumenta il rischio di morte materna e fetale; a lungo termine, madre e figlio sono significativamente più esposti al rischio di patologie cardiovascolari e diabete (Kharfi et al., 2003).

Tra i biomarcatori per test di screening precoce stanno avendo largo impiego per l'uso clinico la proteina placentale 13 che, proposta per il suo ruolo nella immunomodulazione e nel rimodellamento dell'arteria materna, sembrerebbe aumentare significativamente nella preeclampsia (Huppertz et al., 2008; Nicolaides et al., 2006). Sebbene siano stati proposti circa altri dieci marcatori sierici in grado di predire i soggetti a rischio prima delle manifestazioni cliniche, inclusi ADAM-12, VEGF e DNA fetale privo di cellule (Grill et al., 2009), ad oggi non esiste una cura risolutiva.

Nonostante le intense ricerche, la sua patogenesi risulta attualmente da chiarire. Molti campioni istologici ottenuti da placente preeclampsiche mostrano caratteristiche di placentazione superficiale, dove i trofoblasti extravillosi non raggiungono mai i vasi in quanto non riescono a maturare in un fenotipo invasivo (Kharfi et al., 2003) o si differenziano prematuramente in cellule giganti (Gerretsen et al., 1981; Pijnenborg et al., 2006).

In alcuni casi è stato osservato un numero ridotto di EVT's infiltranti la decidua e in questi campioni, le arteriole spirali uterine presentano un rimodellamento ridotto o assente (Pijnenborg et al., 2006).

Nei casi di preeclampsia severa al massimo circa il 10% delle arteriole spirali mostra un'evidente invasione trofoblastica (Brosens et al., 2002), che si traduce nella riduzione del 50% del flusso sanguigno (Lunell et al., 1982; Murphy et al., 2006), compromettendo significativamente l'afflusso di sangue alla placenta e al feto.

Nonostante la comparsa tardiva della preeclampsia nel secondo e terzo trimestre di gravidanza, tale complicanza potrebbe affermarsi precocemente già alla 20esima settimana di gestazione (Sibai et al., 2005) quando le maggiori modificazioni della vascolatura placentare sono ormai complete.

Oltre al ruolo chiave degli EVT, anche ormoni come la gonadotropina corionica umana (hCG) secreta dai trofoblasti, il progesterone e gli estrogeni assumono un'importante funzione regolatoria nel controllo dell'invasione trofoblastica durante il rimodellamento vascolare materno. Pertanto, si potrebbe ipotizzare che i difetti di questo processo derivano dalla disregolazione della produzione o dell'azione di tali ormoni. Ne consegue la possibilità di una correlazione tra l'inizio, lo sviluppo e la severità della preeclampsia e la concentrazione di tali ormoni.

Dal punto di vista clinico, le concentrazioni di hCG risultano ridotte nelle gravidanze preeclampsiche. La minore concentrazione dell'isoforma β hCG nel primo trimestre, è stata associata alla diagnosi successiva di restrizione della crescita fetale dovuta alla compromissione della perfusione placentare (Krantz et al., 2004).

E' stato dimostrato che la forma iperglicosilata (HhCG) secreta dai EVT (Handschuh et al. (2007b)) è in grado di stimolare l'invasione; pertanto, basse concentrazioni di HhCG nel secondo trimestre sono associate ad un rischio 10 volte maggiore di sviluppo della preeclampsia (Bahado-Singh et al., 2002). E' stato ipotizzato che la ridotta secrezione di HhCG causa un'insufficiente infiltrazione di EVT e rimodellamento delle arteriole spirali, determinando ipossia placentare.

Studi clinici hanno mostrato che l'aumento sierico del progesterone all'inizio del terzo trimestre è associato allo sviluppo tardivo della preeclampsia (Tamimi et al., 2003) e variazioni delle sue concentrazioni potrebbero essere osservate già alla 16esima settimana di gestazione. Considerando tale ormone come un regolatore negativo dell'invasione trofoblastica, il suo aumento nella fase iniziale della gravidanza potrebbe predisporre allo sviluppo tardivo della preeclampsia.

E' stata identificata una correlazione tra le concentrazioni di estradiolo significativamente più basse e la preeclampsia grave ad esordio precoce (Zeisler et al., 2002), postulando un effetto indiretto degli estrogeni atto a modificare altri sistemi coinvolti nella fisiopatologia di tale disordine. Ne è esempio la correlazione positiva rispetto alla concentrazione plasmatica di leptina: l'estradiolo ne stimolerebbe la produzione, il cui aumento contribuirebbe alla disfunzione endoteliale osservata nella preeclampsia (Atamer et al., 2004), tuttavia l'esatto meccanismo non è chiaro.

1.3 Estrogeni

Per quanto gli estrogeni siano principalmente riconosciuti per la loro funzione predominante nel sistema riproduttivo femminile, giocano un ruolo centrale nella maggior parte dei sistemi fisiologici del corpo (Edwards, 2005), non solo nella donna ma anche nell'uomo (Lombardi et al., 2001; Finkelstein et al., 2013).

Nella prevenzione e nel trattamento delle malattie cardiovascolari il dibattito sulla loro esposizione è ad oggi controverso ma è chiaro che gli estrogeni hanno importanti effetti sulla fisiologia e sulla fisiopatologia vascolare, con potenziali implicazioni terapeutiche.

La validazione dei meccanismi d'azione degli steroidi sessuali e l'identificazione di nuovi effetti, come la regolazione delle funzioni mitocondriali e lo sviluppo di nuove teorie sull'efficacia del trattamento, supportano la possibilità che la terapia ormonale costituisca una buona opzione nella prevenzione di alcune malattie croniche legate all'invecchiamento (Miller and Duckles, 2008).

Osservazioni epidemiologiche estensive e studi clinici hanno suggerito che l'incidenza delle patologie cardiovascolari aumenta con la menopausa e la terapia ormonale sostitutiva, specificamente estrogenica, è associata ad effetti benefici nelle donne dopo la menopausa (Barret-Connor and Bush, 1991; Kanel et al., 1976).

A livello cardiovascolare, infatti, gli estrogeni favoriscono il profilo lipidico, l'attività antiossidante, la fibrinolisi, mediante un'azione parzialmente diretta alla parete vascolare. Tali ormoni sono attivi sia a livello endoteliale che sulle cellule muscolari lisce, dove sono stati identificati recettori estrogenici funzionalmente competenti.

Sia in animali da esperimento che nell'uomo, gli estrogeni promuovono una vasodilatazione in parte dovuta alla stimolazione delle prostacicline e alla sintesi di ossido nitrico, nonché alla riduzione della produzione di vasocostrittori come prodotti derivati dalla ciclossigenasi, specie reattive dell'ossigeno, angiotensina II, endotelina.

In vitro, gli estrogeni esercitano un effetto inibitorio diretto sulla muscolatura liscia attraverso l'attivazione dell'efflusso di potassio e l'inibizione dell'influsso di calcio.

In vivo, invece, il 17 β -estradiolo, principale ormone estrogenico, previene l'ispessimento della neointima e migliora le lesioni che si verificano nei processi aterosclerotici.

L'effetto degli estrogeni sulla parete vascolare implica sia una componente non-genomica rapida che coinvolge fenomeni di membrana, come l'alterazione della permeabilità ionica e l'attivazione di enzimi di membrana, che una componente genomica classica, ovvero l'attivazione dei recettori estrogenici e l'espressione genica (Miller and Duckles, 2008).

1.3.1 Sintesi degli estrogeni

Gli estrogeni, i principali ormoni sessuali steroidei femminili, rappresentano il prodotto terminale della complessa via biosintetica degli ormoni steroidei la cui sintesi, prevalente a livello ovarico, si verifica anche nella placenta durante la gravidanza e in altri tessuti non riproduttivi come fegato, cuore, muscoli, ossa, cervello, ghiandole surrenali e mammelle in piccole quantità, nonché nelle cellule adipose (Nelson and Bulun, 2001), costituendo una fonte secondaria importante nelle donne, dopo la menopausa.

Le vie biochimiche e i principali enzimi di questi composti lipofili, assieme alle localizzazioni intracellulari, sono simili nell'ovaio, nel testicolo e nel surrene (fig. 4). Gli ormoni steroidei sono sintetizzati a partire dal colesterolo, che è presente nella ghiandola sia in forma libera che esterificata con acidi grassi, ovvero esteri colesterinici. Il colesterolo, derivato sia dalle lipoproteine circolanti (LDL), che dagli esteri colesterinici all'interno della ghiandola viene convertito a pregnenolone per opera dell'enzima P450_{scc}, tramite la rimozione di un frammento a 6 atomi di carbonio, l'acido isocaproico, un passaggio limitante del processo biosintetico controllato nelle cellule della teca dall'ormone luteinizzante (LH), proveniente dall'ipofisi anteriore.

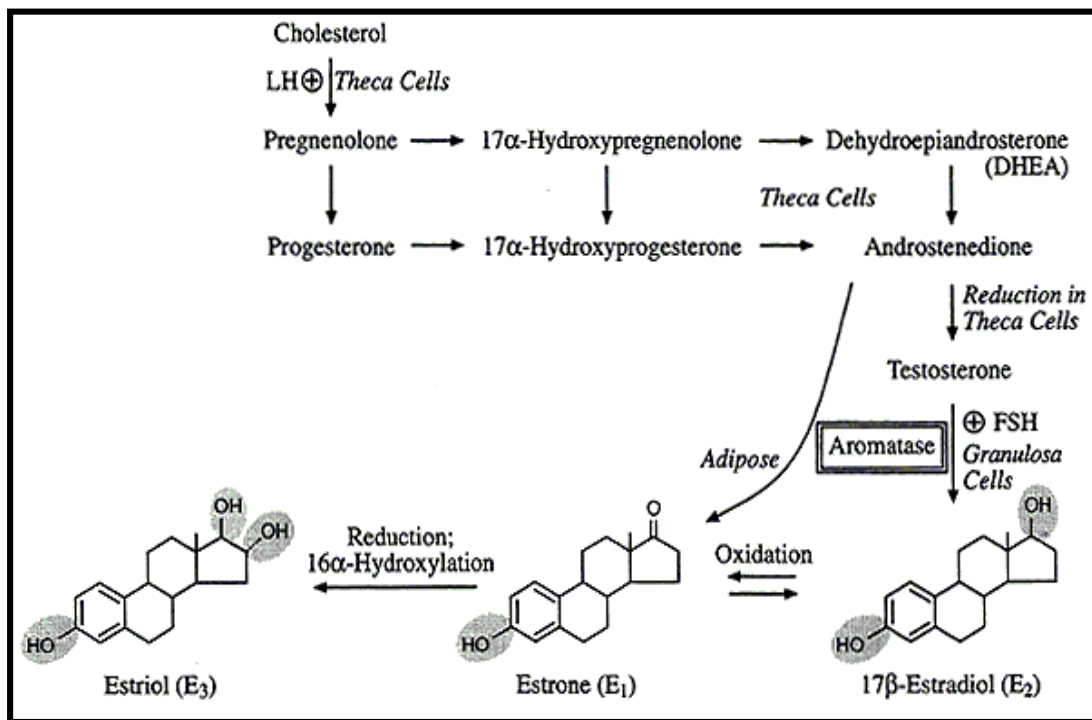


Figura 4: Biosintesi e metabolismo degli estrogeni (Greenspan and Strewler, 2000).

Il pregnenolone così formato può essere convertito sia a progesterone sia a 17 α -idrossipregnenolone. La conversione a progesterone richiede l'azione della 3 β -idrossi-steroidodeidrogenasi e della $\Delta^{5,4}$ -chetosteroido-isomerasi, che sposta il doppio legame dalla posizione Δ^5 alla posizione Δ^4 . Il progesterone viene secreto in grandi quantità dal corpo luteo dopo l'ovulazione, fungendo da precursore di androgeni ed estrogeni poiché è un substrato della P450c17 (17 α -idrossilasi), che lo converte in 17 α -idrossiprogesterone nel reticolo endoplasmatico. In seguito alla 17 α -idrossilazione, la catena laterale a 2 atomi di carbonio (20-21) viene rimossa dall'enzima P450c17 α (17,20-liasi), per formare gli androgeni.

Il 17 α -idrossipregnenolone viene convertito dalla liasi a deidroepiandrosterone (DHEA), che può a sua volta essere convertito in androstenedione, il principale androgeno secreto dalle ovaie, oltre a piccole quantità di DHEA e di testosterone.

Tra i principali estrogeni naturali sono compresi il 17 β -estradiolo (E2), l'estrone (E1) e l'estriolo (E3), composti lipofilici a 18 atomi di C, la cui struttura è caratterizzata da quattro anelli fusi che formano un ciclopentanoperidrofenantrene. Il 17 β -estradiolo, il principale estrogeno prodotto dall'ovaio, viene sintetizzato dall'enzima P450 aromatasi, sotto il controllo dell'ormone follicolostimolante (FSH) probabilmente nella frazione microsomiale, a livello delle cellule della granulosa,

mediante tre passaggi: l'idrossilazione e l'ossidazione del gruppo metilico a livello del carbonio 19 e l'idrossilazione a livello del carbonio 3 α (Greenspan and Strewler, 2000).

Il controllo della sintesi degli estrogeni nel corpo è strettamente correlato alla regolazione di tale enzima: l'aromatasi è un membro della superfamiglia citocromo P450, ampiamente espresso in molti tessuti. La regione regolatoria del gene CYP19 dell'aromatasi umana contiene 10 promotori tessuto-specifici per la biosintesi degli estrogeni locali in condizioni fisiologiche o patologiche normali come il cancro al seno e l'endometriosi (Simpson et al, 1997). La sua attività può essere alterata da modifiche post-traslazionali, come la fosforilazione (Charlier et al., 2011) ed è potentemente inibita da un aumento delle concentrazioni di ATP, Mg²⁺, Ca²⁺, effetti che dipendono l'attività di chinasi proteiche.

Entrando in circolo, l'estradiolo si lega avidamente alla globulina di trasporto SHBG (globulina legante gli ormoni sessuali) e, con minore affinità, all'albumina. Le proporzioni di estradiolo libero e legato non variano in maniera significativa durante nelle diverse fasi del ciclo mestruale, tuttavia differenze nel legame possono assumere rilievo clinico dopo la menopausa o nelle donne con anomalie della funzione ovarica associate alla presenza di eccesso di androgeni.

Il testosterone è, di fatto, un intermedio chiave in entrambi i sessi, potendo essere convertito in estrogeni dall'aromatasi e nel più potente androgeno, diidrotestosterone, per effetto della 5 α -reduttasi. Nelle donne, dove il 17 β -estradiolo è la principale forma di estrogeni circolanti, i livelli di testosterone sono relativamente bassi mentre, negli uomini, il testosterone è il principale androgeno in circolo e i livelli di estrogeni sono molto più bassi rispetto alle donne.

Come altri ormoni, essi sono secreti in maniera pulsatile, tuttavia, è ancora poco noto circa la rilevanza delle variazioni di frequenza e di ampiezza e squilibri nel bilancio tra estrogeni e androgeni possono contribuire alle differenze legate al sesso nella fisiopatologia delle malattie cardiovascolari (Miller and Duckles, 2008).

Il livello di sintesi degli estrogeni è più alto durante gli anni riproduttivi dell'individuo, per poi essere in calo nel corso della transizione e nel periodo post-menopausale. Durante il ciclo mestruale, i livelli del 17 β -estradiolo sono più alti immediatamente prima ovulazione (110-410 pg/ml) e livelli circolanti durante le fasi luteale e follicolare sono circa 19-150 pg/ml mentre, nelle donne in menopausa, sono inferiori a 35 pg/ml (Stricker et al., 2006). Durante la transizione verso la menopausa, i livelli sierici di 17 β -estradiolo diminuiscono di circa 85-90% mentre, i

livelli sierici di estrone, del 65-75% rispetto ai livelli medi precedenti la menopausa (Khosla et al., 1997).

L'estradiolo circolante viene convertito rapidamente a estrone nel fegato di cui, la maggior parte, viene ulteriormente metabolizzato a 16α -idrossiestrone, per essere poi ulteriormente convertito ad estriolo; la parte rimanente rientra in circolo. Mentre la maggior parte dell'estrone viene coniugato a formare estrone solfato, l'estriolo viene convertito a formare estriolo-3-solfato-16-glucuronide prima dell'escrezione renale (Greenspan and Strewler, 2000).

Oltre alla presenza di tessuti extra-gonadici deputati alla sintesi e al rilascio degli estrogeni, la stessa aromatasi è stata individuata non solo nelle cellule della granulosa dell'ovaio ma anche nel muscolo, nel tessuto adiposo, osseo, cerebrale, nelle cellule di Leydig del testicolo e nell'endotelio, dove gli estrogeni agiscono a livello locale in maniera paracrina o autocrina tessuto-specifica.

Negli esseri umani, è stato chiaramente dimostrato che l'attività dell'aromatasi nelle cellule stromali adipose sottocutanee, così come i livelli di mRNA nel tessuto adiposo, aumentano con l'avanzare dell'età (Misso et al., 2005).

Delle tre maggiori isoforme fisiologiche di estrogeni presenti nella donna, il 17β -estradiolo è il principale prodotto dell'intero processo di biosintesi ed è il più potente durante il periodo precedente la menopausa al contrario dell'estrone, fondamentale dopo la menopausa, quando è sintetizzato nel tessuto adiposo a partire dal deidroepiandrosterone surrenale. L'estriolo è l'estrogeno meno potente, svolge un ruolo chiave durante la gravidanza in quanto prodotto abbondantemente dalla placenta.

La disattivazione del 17β -estradiolo può avvenire attraverso il metabolismo, mediante la conversione nelle forme meno attive, E1 o E3 (Birkhauser, 1996), o attraverso il processo di solfatazione mediato dall'estrogeno sulfotransferasi con la formazione di 17β -estra-1,3,5-trien-3,17-diol 3-solfato, incapace di interagire con i recettori degli estrogeni (Kotov et al., 1999).

Inoltre, è stato dimostrato in topi femmina che la mancanza di lipocalina 2, un nuova citochina derivante dal tessuto adiposo, può limitare la sintesi di E2 sottoregolando l'aromatasi nel tessuto adiposo (Guo et al. 2012). Pertanto, il rapporto di estrogeni circolanti potrebbe indicare un metabolismo dinamico: l'equilibrio tra la sintesi e la disattivazione degli estrogeni.

1.3.2 Recettori estrogenici: struttura e funzione

Inizialmente si pensava che le azioni degli estrogeni, e principalmente del 17 β -estradiolo, fossero mediate da un singolo recettore estrogenico, in seguito denominato recettore estrogenico α (ER α , ESR1), identificato per la prima volta nel 1960 (Jensen and DeSombre, 1973; Jensen and Jacobson, 1962).

E' al 1996 che risale l'identificazione del secondo recettore per gli estrogeni strutturalmente omologo (Kuiper et al., 1996), oggi noto come recettore estrogenico β (ER β , ESR2).

Sebbene alcune delle prime attività cellulari e tissutali descritte dagli estrogeni comprendessero la produzione di cAMP (Szego e Davis, 1967) e l'assorbimento di calcio (Pietras and Szego, 1975), molte delle funzioni fisiologiche dei recettori estrogenici sono state successivamente chiarite in quanto entrambi sono membri della famiglia dei recettori ormonali nucleari e, in generale, sono riconosciuti per la loro funzione di fattori di trascrizione regolati da ligando (Edwards, 2005; Carroll and Brown, 2006; Schultz-Norton et al., 2011).

Così come altri steroidi, è stato dimostrato che gli estrogeni mediano risposte cellulari rapide che includono la produzione di cAMP, la mobilitazione di calcio intracellulare e l'attivazione di più chinasi, come le chinasi regolate dal segnale extracellulare (ERK) e la fosfoinositide 3-chinasi (PI3K), così come canali ionici e l'ossido nitrico sintasi endoteliale (eNOS).

Nel 2000 è stato scoperto e caratterizzato un terzo recettore estrogenico (Filardo et al., 2000; Revankar et al., 2005; Thomas et al., 2005), ovvero GPR30/GPER, appartenente alla famiglia di recettori accoppiati a proteina G (GPCR), a 7 domini transmembrana, che mediano classicamente risposte rapide come l'attivazione della chinasi, la mobilitazione di ioni e secondi messaggeri (Prossnitz 2008, 2012; Prossnitz and Barton, 2009, 2011, 2014; Prossnitz and Maggiolini, 2009b; Filardo and Thomas, 2012; Han et al., 2013; Srivastava and Evans, 2013; Lappano et al., 2014; Barton and Prossnitz, 2015).

Nelle cellule che esprimono sia ER α che GPER esiste, certamente, la possibilità di una segnalazione inter/co-dipendente (Albanito et al., 2007).

Dati esistenti, infatti, non precludono la possibilità che il legame del 17 β -estradiolo ad un ER extranucleare che associa GPER sia bloccato da un antagonista legandosi a GPER nelle cellule che coesprimono entrambi i recettori.

Oltre ai ligandi fisiologici endogeni (estrone, estradiolo, estriolo), piante e funghi producono una vasta gamma di xenoestrogeni naturali (fitoestrogeni e micolestrogeni) che possono mimare le azioni degli estrogeni (Ososki and Kennelly, 2003; Lorand et al., 2010).

Considerato il loro ruolo sotto l'aspetto medico, le aziende farmaceutiche hanno sintetizzato vaste collezioni di composti, alcuni dei quali rientrano nella categoria di agonisti/antagonisti misti tessuto-dipendenti conosciuti come modulatori selettivi dei recettori degli estrogeni (SERMs) e antagonisti totali noti come downregolatori selettivi dei recettori estrogenici (SERDs) sulla base della loro attività in seno, utero, e ossa.

I recettori estrogenici classici ($ER\alpha$ e $ER\beta$), sono costituiti da domini strutturalmente e funzionalmente distinti, altamente conservati durante l'evoluzione. Tra questi, il più conservato è il dominio centrale di legame del DNA (DBD), implicato nel riconoscimento e nel legame del DNA, presenta specificità per la sequenza nucleotidica AGGTCA e contiene una regione di dimerizzazione recettoriale zinc fingers dipendente (Heldring et al., 2007).

E' presente un dominio di legame del ligando all'estremità carbossi-terminale e regioni aggiuntive sono coinvolte nell'attivazione trascrizionale, ossia il dominio di transattivazione AF-1 ammino-terminale, costitutivamente attivo e indipendente dal ligando, contenente diversi siti di fosforilazione e il dominio carbossi-terminale AF-2 ligando-dipendente (LBD), che effettua interazioni con Hsps (heat shock proteins), presenta una regione di dimerizzazione ricca in leucina e media l'ampia gamma di risposte funzionali a diversi ligandi (agonisti, SERM, SERDs, etc.).

A seconda del contesto cellulare e del promotore, AF-1 e AF-2 possono agire indipendentemente o sinergicamente nella regolazione dell'espressione genica (Heldring et al., 2007).

Mentre i domini di legame del ligando e di legame del DNA sono conservati all'interno della famiglia, i domini di attivazione sono altamente variabili e conferiscono specificità d'azione.

Infine, un dominio cerniera tra il LBD e il DBD fornisce flessibilità alle proteine.

In aggiunta all'intera lunghezza della proteina di 66-kDa, sono state descritte varianti di splicing (Taylor et al., 2010), con conseguenti proteine di 46 kDa, risultanti da un troncamento amino-terminale a causa di un introne alternato localizzato nel sito di inizio (Kim and Bender, 2009) e 36 kDa, generate dallo stesso sito di inizio

dell'ER46 ma con un troncamento aggiuntivo all'estremità carbossilica (Lin et al., 2013; Chaudhri et al., 2014).

Rimuovendo il dominio amino terminale di attivazione della trascrizione, queste proteine hanno dimostrato di agire come inibitori della trascrizione effettuata dall'ER α e di mediare un meccanismo di segnalazione rapida (Wang et al., 2006). Sono state identificate anche molteplici varianti di splicing dell'ER β , ad oggi poco caratterizzate (Heldring et al., 2007).

Tali isoforme recettoriali, codificate da geni differenti, mostrano piccole differenze di sequenza a livello dei domini di legame del ligando, con una tasca idrofobica di dimensioni più ridotte nell'ER β piuttosto che nell'ER α .

Presentano, inoltre, un'elevata omologia di sequenza (97%) nella zona che lega il DNA (fig.5) ma strutture distinte nel sito di interazione con i ligandi (59% di omologia).

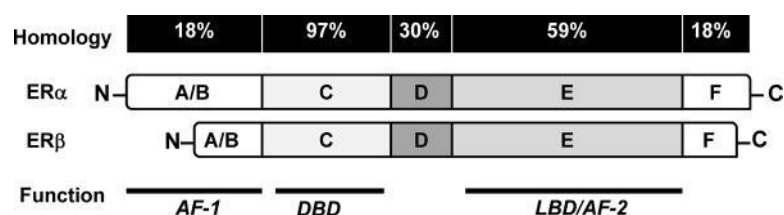


Figura 5: Comparazione di struttura e omologia tra i recettori estrogenici classici (Cui et al., 2013).

Secondo la definizione dei recettori estrogenici classici, nello stato non attivato sono localizzati prevalentemente (95%) nel nucleo e la frazione restante nel citoplasma (Hager et al., 2000). L'attivazione mediata dal ligando, in genere, si traduce nella dimerizzazione recettoriale successiva alla dissociazione del monomero dai chaperoni (Hsp90) e alla traslocazione dei recettori citosolici al nucleo. Della frazione citosolica dell'ER α e delle sue varianti di splicing, una parte è localizzata sulla membrana plasmatica, in particolare nelle caveolae, dove in seguito al legame dell'agonista, il recettore media la segnalazione rapida attraverso vie come PI3K/Akt e eNOS (Chambliss et al., 2010; Banerjee et al., 2014). La localizzazione di membrana si ritiene avvenga attraverso la palmitoilazione (La Rosa et al., 2012) e la fosforilazione (Mintz et al., 2008), nonché attraverso la recente caratterizzazione di un dominio transmembrana nella variante di splicing dell'ER46 Variante (Kim et al., 2011), che influenzano l'affinità e la specificità del ligando (Lin et al., 2013).

A livello tissutale sono localizzati nel SCV nei cardiomiociti, nei macrofagi, nelle cellule endoteliali e muscolari lisce di ratto e umane.

1.3.3 Effetti genomici o a lungo termine

Trattandosi di membri della superfamiglia dei recettori nucleari, i recettori estrogenici utilizzano un dominio di legame del DNA conservato al fine di interagire con specifici elementi di risposta ormonali nel genoma e influenzare la trascrizione genica. Tali effetti, spesso indicati come “genomici”, sono stati originariamente descritti per i recettori nucleari, tuttavia, sono stati riconosciuti anche meccanismi d’azione non genomici, per diversi membri di questa famiglia, inclusi ER α e ER β .

Come altri recettori ormonali steroidei, anche gli ERs funzionano come fattori di trascrizione attivati dal ligando che risiedono nel citosol e traslocano nel nucleo dopo il legame con il ligando, dove formano omo- ed etero-dimeri, e interagiscono con sequenze di DNA palindromiche definite elementi di risposta agli estrogeni (ERE) nella regione promotore del gene bersaglio, reclutando coregolatori, coattivatori e corepressori dell’espressione genica (Smith and O’Malley, 2004; McDonnell and Wardell, 2010; Burris et al., 2013). Una volta attivati, gli ERs possono legarsi al DNA anche indirettamente, attraverso associazioni con altri fattori di trascrizione quali AP-1 e Sp-1, e in assenza di ligandi possono regolare la trascrizione attraverso modificazioni post-traduzionali (Dahlman-Wright et al., 2006).

A differenza di altri membri della famiglia di recettori nucleari, la cavità di legame del ligando degli ERs ospita un’ampia gamma di composti strutturalmente differenti (Heldring et al., 2007), producendo stati conformazionali multipli del dominio di legame del ligando che, a loro volta, generano più siti proteici di legame per coregolatori e altre proteine (McDonnell and Wardell, 2010; Burris et al., 2013).

Sono stati distinti diversi tipi di antagonisti dei recettori estrogenici nucleari (Hall and McDonnell, 2005). ICI 182,780 (7a, 17b- [9-[(4,4,5,5,5-pentafluoropentyl) sulfanyl] nonil] estra-1,3,5(10) -triene-3,17-diolo) è un SERD che antagonizza totalmente l’azione degli estrogeni in tutti i tessuti senza distinzione tra i due tipi recettoriali, promuove la dissociazione dell’Hsp90 e previene la dimerizzazione recettoriale e il reclutamento dei coattivatori, con conseguente degradazione del recettore legato al ligando (Heldring et al., 2007).

Al contrario, i SERMs mostrano azione tessuto-specifica, agendo da antagonisti o agonisti, a seconda del tipo di cellulare. Ne è esempio il 4-idrossitamoxifene, metabolita attivo del tamoxifene, usato nella terapia del cancro al seno estrogeno-dipendente come antagonista, presumibilmente a causa dei bassi livelli dell'espressione del coattivatore, ma si rivela un agonista nell'endometrio dove l'espressione del coattivatore è maggiore (Burris et al., 2013).

Il SERM raloxifene, è un debole agonista nell'endometrio ma insieme al tamoxifene agisce da agonista/antagonista parziale su una serie di geni estrogeno-regolati (Frasor et al., 2004). La conformazione del LBD indotta dagli agonisti per promuovere il legame del coattivatore, viene prevenuta dalla catena dei SERMs (Dahlman-Wright et al., 2006) che, bloccando AF-2, agiscono come antagonisti.

In alcuni tessuti i SERMs potrebbero agire come agonisti in funzione di AF-1; anche l'interazione tra recettori e coattuatori o corepressori contribuisce alla specificità tissutale del ligando (Hall and Mc Donnell, 2005).

Così, a seconda del ligando e del tessuto, i recettori estrogenici regolano sia positivamente che negativamente l'espressione di migliaia di geni (Katzenellenbogen et al., 2000; Charn et al., 2010).

Di contro all'agonista non selettivo degli ERs, 17 β -estradiolo, sono stati sviluppati agonisti sintetici selettivi come il propilpirazoloetriolo (PPT) e il diarilpropionitrile (DPN) (Harrington et al., 2003), in grado di distinguere tra ER α e ER β . Il PPT mostra una selettività di legame per ER α di 400 volte rispetto a ER β (Stauffer et al., 2000); al contrario, il DPN è selettivo per ER β (Meyers et al., 2001).

Solo l'agonista di ER α , DPN, induce una vasodilatazione acuta NO-dipendente (Bolego et al., 2005) mentre, nelle piccole arterie mesenteriche di topi femmina il PPT aumenta il rilassamento mediato dal flusso ma sembrerebbe privo di effetto nelle arterie dei maschi (Douglas et al., 2008), supportando la conclusione che ER α sia il mediatore principale dell'azione estrogenica nelle funzioni vascolari.

In aggiunta alla regolazione della trascrizione genica, i composti estrogenici possono facilitare il trasporto di RNA dal nucleo al citoplasma (Thampan, 1985; Jacob et al., 2006), influenzare l'espressione proteica indirettamente attraverso la regolazione della stabilità dell'mRNA nel citoplasma e regolare il tasso di trascrizione genica di enzimi necessari per le modificazioni post-traduzionali di proteine mediante glicosilazione, fosforilazione e metilazione, modificando il proteoma e il fenotipo cellulare a tutti i livelli di elaborazione delle proteine.

A tal proposito, l'attacco reversibile e covalente di piccole proteine simili all'ubiquitina, implicate nel processo di sumoilazione o la fosforilazione di coattivatori dei recettori steroidei, si ripercuote sul legame dei recettori stessi e sulla conseguente trascrizione genica mediata dai recettori estrogenici (Wu et al., 2006).

Fatta eccezione per la regolazione di ossido nitrico sintasi/ossido nitrico da parte degli estrogeni nelle cellule endoteliali (Hayashi et al., 1995; Kleinert et al., 1998; Sumi et al., 2001; Okano et al., 2006) e della superossido dismutasi nelle cellule muscolari lisce vascolari (Strehlow et al., 2003a), la capacità degli estrogeni di regolare la degradazione dell'mRNA, d'inattivare proteine che causano lesioni vascolari e di stabilizzare l'mRNA richiede ulteriori studi nelle cellule vascolari di sesso maschile e femmine.

1.3.4 Effetti non genomici o rapidi

A concentrazioni fisiologiche gli estrogeni possono produrre una varietà di risposte cellulari della durata di pochi secondi o minuti, troppo corti per essere mediati dal meccanismo classico che prevede l'attivazione della trascrizione genica (Revelli et al., 1998; Hammes and Levin, 2007).

In uno studio condotto da Szego e collaboratori nel 1960 sono stati riportati aumenti delle concentrazioni di AMP ciclico uterino in pochi minuti (Szego and Davis, 1969) identificando, in seguito, siti di legame degli estrogeni nelle membrane plasmatiche isolate dall'endometrio uterino (Pietras and Szego, 1977). Similmente, in risposta al 17β -estradiolo è stato descritto un aumento di AMP ciclico nel tessuto vascolare (Kishi and Numano, 1982; Mügge et al., 1993).

Queste azioni extranucleari rapide, descritte per altri ormoni steroidei, come progesterone e aldosterone (Wehling, 1997) sono definite "non genomiche" o "signaling steroideo avviato dalla membrana" in opposizione al "signaling steroideo avviato dal nucleo" (Hammes and Levin, 2007).

Il meccanismo d'azione sembra trovare consenso in due delle principali alternative che includono gli effetti degli ERs classici a livello della membrana plasmatica e di un distinto recettore associato alla membrana (Hasbi et al., 2005; Revankar et al., 2005; Hammes and Levin, 2007).

Gli ERs, di cui esistono diverse isoforme espresse nei vari tipi cellulari, possono associarsi a livello della membrana plasmatica alle caveole o a grandi complessi proteici, attraverso i quali gli estrogeni avviano una serie di pathways intracellulari tra cui le proteine chinasi attivate da mitogeni, flussi di canali ionici, secondi messaggeri generati da recettori accoppiati a proteine G e la stimolazione di recettori per i fattori di crescita (Moriarty et al., 2006).

Gli ERs associati con la membrana plasmatica interagiscono con una varietà di proteine incluse la striatina (Lu et al., 2004) e proteine adattatrici omologhe di Src e collagene, ma una delle principali azioni rapide descritte dagli estrogeni è l'abilità di stimolare l'ossido nitrico sintasi endoteliale (eNOS) nelle cellule dell'endotelio vascolare.

Il ruolo esatto di ER α e ER β di membrana nella segnalazione cellulare è attualmente poco chiaro: sebbene non abbiano un'attività chinasi intrinseca, essi rappresentano una componente centrale del "signalosoma" di membrana (Moriarty et al., 2006), dove numerose molecole potenzialmente importanti nel mediare la cascata di segnalazione rapida, come proteine G, tirosina chinasi c-Src, modulatori dell'attività non-genomica dei recettori estrogenici (MNR), caveolina-1 e proteine da shock termico (Hsp90) interagiscono in risposta agli estrogeni (fig. 6) (Boonyaratanakornkit and Edwards, 2007; Cheskis et al., 2007; Moriarty et al., 2006).

Tra i potenziali meccanismi che portano alla traslocazione di una sottopopolazione di ERs alla membrana plasmatica, la caveolina-1 è la proteina strutturale primaria delle caveole (Okamoto et al., 1998), invaginazioni vescicolari della membrana plasmatica che rappresentano organelli specializzati di segnalazione, costituiscono il sito preferenziale degli ERs di membrana nelle cellule endoteliali (Chambliss et al., 2000; Chambliss et al., 2002; Razandi et al., 2002).

Tipicamente ER α si co-localizza con la caveolina-1 all'interno dei lipid raft, e attiva l'eNOS nelle caveole delle cellule endoteliali (Chambliss et al., 2000; Razandi et al., 2002).

Inoltre, l'iperpressione della striatina, una proteina di legame degli ERs, facilitando l'assemblaggio di molecole di segnalazione necessarie nell'azione estrogenica rapida, migliora la localizzazione dei recettori alla membrana plasmatica della linea cellulare endoteliale dell'aorta umana EAhy926 (Lu et al., 2004). In linea con questi dati, ER α si associa anche con la caveolina-1 della membrana plasmatica delle

cellule muscolari lisce vascolari primarie dopo opportuna stimolazione con 17 β -estradiolo (fig. 6) (Razandi et al., 2002).

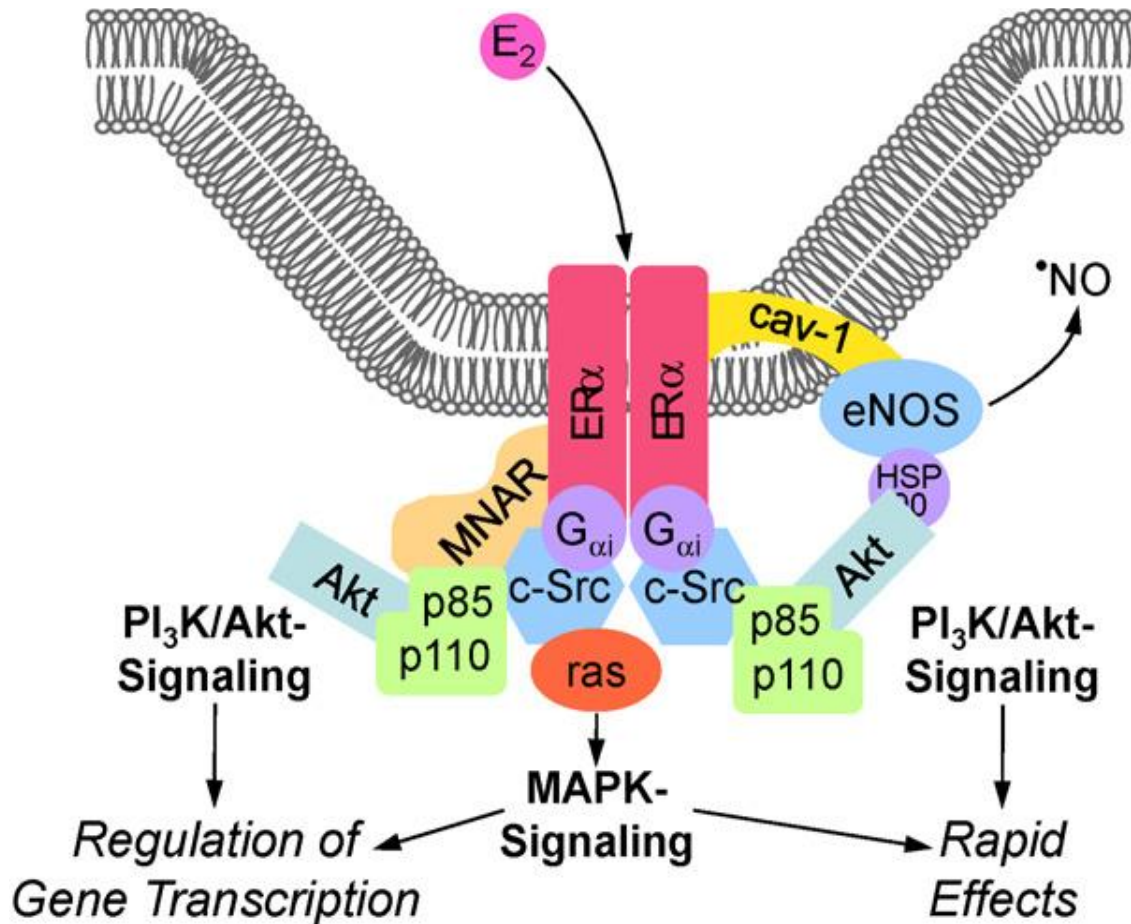


Figura 6: Meccanismo di segnalazione non genomico del recettore estrogenico α di membrana (Moriarty et al., 2006).

La proteina modulatrice dell'attività non-genomica degli ERs (MNAR) promuove e stabilizza la formazione di un complesso con $ER\alpha$, c-Src e p85, la subunità regolatrice di PI3K (raffigurata come subunità p85 e p110), facilitando così l'attivazione della via PI3K /Akt. In alternativa, c-Src attiva la GTPasi p21ras (ras) monomeric che, a sua volta, recluta le chinasi a valle del pathway MAPK.

Ad ogni modo, nelle cellule endoteliali dell'aorta bovina è indispensabile l'interazione diretta della proteina $G_{\alpha i}$ con $ER\alpha$ per l'attivazione di c-Src (Kumar et al., 2007). Una volta attivati, entrambi i pathways PI3K/Akt e MAPK possono modulare la trascrizione genica: l'attivazione della via PI3K/Akt nelle cellule endoteliali porta alla fosforilazione della serina 1177 dell'eNOS, localizzata caveole,

attraverso l'interazione con la caveolina-1 (cav-1), il cui target è proprio ER α . L'interazione PI3K/Akt - eNOS è favorita dal chaperone molecolare Hsp90 e, una volta attivata eNOS, il rilascio di NO induce effetti cellulari rapidi e migliora la vasodilatazione endotelio-dipendente.

Studi recenti hanno suggerito un ruolo anche per l'ossido nitrico sintasi neuronale (nNOS) per la generazione di NO nell'endotelio vascolare, mediante un meccanismo di attivazione non genomico da parte degli estrogeni.

Studi condotti in diversi tipi cellulari hanno dimostrato che l'attivazione del segnale a livello della membrana potenzia il meccanismo di segnalazione estrogenico nucleare, implicando diverse cascate chinasiche e canali del calcio. E' stato notato che la distinzione tra gli effetti trascrizionali e non-genomici sembrerebbe del tutto arbitraria poiché alcune delle vie di segnalazione intracellulari convergono e attivano fattori di trascrizione nucleare (Björnström and Sjöberg, 2005).

Le vie intracellulari vengono attivate anche da somministrazioni acute di estrogeni alle cellule muscolari lisce della vascolatura, a cui fisiologicamente consegue l'inibizione della proliferazione cellulare e il rilassamento vascolare. Nel muscolo liscio delle arterie tale rilassamento è il risultato dell'aumento dell'efflusso del calcio che implica l'attivazione della guanilato ciclasi ciclica e l'inibizione dei canali del K⁺ sensibili all'ATP e dei canali del K⁺ attivati dal Ca²⁺ (Kleppisch and Nelson, 1995; Quayle et al., 1995; White et al., 1995; Prakash et al., 1999).

Sia nelle cellule endoteliali native della vena ombelicale che nelle linee cellulari dell'endotelio umano, sono stati rilevati siti di legame degli estrogeni sulla superficie cellulare (Russell et al., 2000).

I risultati di studi di transfezione suggeriscono che sia la forma nucleare che quella associata alla membrana plasmatica di ER α e ER β , derivano da un unico prodotto di trascrizione (Razandi et al., 1999). In alcune cellule endoteliali e muscolari lisce vascolari il ruolo degli ERs associati alla membrana nell'attivazione di MAPK e Akt, è stato suggerito usando 17 β -estradiolo coniugato alla proteina BSA (albumina sierica bovina) in quanto impermeabile alla membrana (Chen et al., 2004; Haynes et al., 2000; Russell et al., 2000; Somjen et al., 2004).

Nelle linee cellulari non vascolari del cancro al seno MCF-7 (Razandi et al., 2002), l'iperespressione della caveolina-1 aumenta la traslocazione recettoriale alla membrana plasmatica così come la proteina adattatrice Shc sembrerebbe interagire e promuovere la traslocazione di ER α alla membrana plasmatica di queste cellule (Song et al., 2004).

In aggiunta, la palmitoilazione dipendente dalla palmitoil acil transferasi all'interno di un motivo a 9 aminoacidi altamente conservato nel dominio di legame del ligando, rilevabile non solo negli ERs ma anche nel recettore degli androgeni e del progesterone, promuove l'associazione recettoriale con la membrana plasmatica e l'interazione con la caveolina-1 in differenti tipi di cellule (Acconcia et al., 2005; Pedram et al., 2007).

È interessante notare che la cascata di segnalazione rapida attivata dagli steroidi sessuali è anche implicata in processi mediati dall'actina del citoscheletro, poiché i rapidi cambiamenti di forma e dimensione delle cellule basali che conferiscono alle cellule stesse le funzioni fisiologiche, comportano modifiche nella plasticità morfologica di tale proteina (Faul et al., 2007; Schubert and Dotti, 2007). Il riarrangiamento del citoscheletro dipende, generalmente, dal legame di stimoli esterni ai recettori associati alla membrana ed è mediato dalla conseguente azione rapida di diverse proteine fosfatasi e chinasi (Faul et al., 2007; Schubert and Dotti, 2007). Pertanto, il movimento, la crescita e la migrazione delle cellule vascolari sono caratterizzati da un dinamico rimodellamento dell'actina del citoscheletro e si pensa che siano processi necessari alla crescita, alla segnalazione intracellulare, all'angiogenesi ma anche alla riparazione del danno vascolare e al mantenimento dell'integrità funzionale dell'endotelio (Giretti and Simoncini, 2008). L'esposizione di cellule endoteliali umane isolate al 17β -estradiolo, di fatto, induce un rapido rimodellamento del citoscheletro attraverso un processo che richiede l'interazione tra ER α e la proteina G, G α_{13} (Simoncini et al., 2006).

1.3.5 Vie di segnalazione degli estrogeni

La maggior parte delle vie di segnalazione mediate dagli estrogeni sono dipendenti dagli ERs ma esistono anche meccanismi ERs-indipendenti (fig. 7). Le vie ERs-dipendenti, includono sia il meccanismo "genomico" che quello "non genomico", tuttavia, studi recenti riportano un meccanismo di segnalazione indipendente dai recettori in quanto avviato dagli estrogeni regolando attività enzimatiche o interagendo con recettori nucleari per ormoni steroidei non sessuali (Richardson et al., 2012).

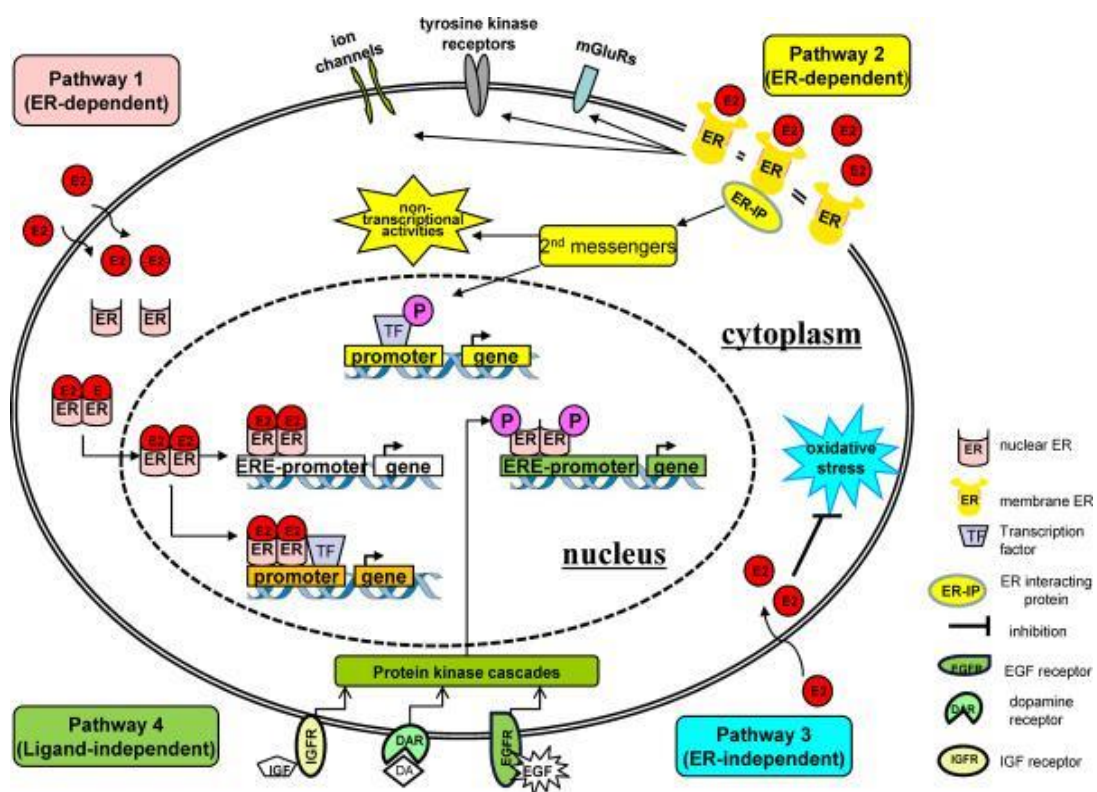


Figura 7: Vie di segnalazione mediate dagli estrogeni e dai recettori estrogenici (Cui et al., 2013).

I principali effetti trascrizionali degli estrogeni sono avviati nel nucleo e dipendono da ER α e ER β (fig. 7, pathway 1) che, sebbene condividano delle similarità, sono strutturalmente e funzionalmente distinti. Nelle cellule muscolari lisce vascolari, l'espressione dell'ossido nitrico sintasi inducibile (iNOS) è attivata da ER β e repressa da ER α (Tsutsumi et al., 2008). L'attivazione del dominio AF-1 è la regione più divergente tra i due recettori e le regioni LBD e AF-2 sono importanti per i cambiamenti strutturali indotti dal ligando che attiva i recettori (Couse et al., 1999). Oltre ad agire direttamente attraverso le sequenze ERE, i recettori nucleari sono in grado di regolare la trascrizione mediante un percorso non classico attraverso l'associazione indiretta ER-DNA. Tali recettori, infatti, interagiscono e influenzano l'attività di altri fattori di trascrizione come la proteina stimolante-1 (SP-1) il più importante mediatore (O'Lone et al., 2004) che regola, a livello del promotore, il recettore delle lipoproteine a bassa densità (LDL) (Li et al., 2001) e l'ossido nitrico sintasi endoteliale (eNOS) (Chambliss and Shaul, 2002), suggerendo un ampio

cross talk tra ERs e AP-1 a livello genomico per via di numerosi trovi nella regione di legame recettoriale (Liu et al., 2008).

Circa il 35% dei geni umani classificati come responsivi al 17 β -estradiolo sono trascritti tramite un'interazione ER-DNA indiretta (O'Lone et al., 2004), che risulta in effetti opposti anche per lo stesso fattore di trascrizione: ER α attiva, mentre ER β inibisce la trascrizione della ciclina D1 dipendente da AP-1 in presenza di 17 β -estradiolo nelle cellule Hela (Liu et al., 2002). Inoltre, nelle funzioni cerebrali estrogeno-mediate tale via di segnalazione declina durante l'invecchiamento.

Un meccanismo ER-dipendente alternativo è avviato nella membrana o nel citoplasma (fig.7, pathway 2) e gli effetti a valle sono solo in parte dovuti alla traduzione o alla trascrizione (Vasudevan et al., 2008). Questa via è la principale responsabile di una serie di azioni estrogeniche rapide e acute, che giocano un ruolo critico nel fegato, nel sistema nervoso e scheletrico (Chimento et al., 2010). Tali effetti sono il risultato del cross talk con altri recettori di membrana o dell'attivazione di una varietà di cascate di segnalazione citoplasmatica. Ad esempio, gli estrogeni attivano ER α e ER β associati alla membrana al fine di interagire con i recettori metabotropici del glutammato (mGluRs), attivandone il signaling in assenza del glutammato (Huang et al., 2012).

Gli estrogeni possono anche esercitare effetti rapidi attraverso diversi nuovi ERs di membrana nel sistema nervoso centrale, tra cui ER-X e recettori accoppiati a proteina G, come GPR30/GPER e Gq-mER (Toran-Allerand et al., 2002; Revankar et al., 2005). ER-X è un recettore estrogenico di membrana saturabile, ad alta affinità arricchito nel cervello, nell'utero e nei polmoni, funzionalmente distinto da ER α e ER β (Toran-Allerand et al., 2002). Mentre ER α può inibire ERK, ER-X promuove la fosforilazione tirosinica di ERK1/ERK2 e attiva la via MAPK/ERK (Singh et al., 1999). Nella membrana plasmatica, nell'apparato del Golgi e nel reticolo endoplasmatico (Matsuda, et al., 2008), GPR30 o GPER media l'attivazione della proteina G estrogeno-indotta di diverse cascate di segnalazione, come PI3K e calcio (Revankar et al., 2005).

Gli estrogeni possono esercitare effetti antiossidanti e sopprimere lo stress ossidativo attraverso una via indipendente dai recettori estrogenici (Haas et al., 2012), regolando l'attività enzimatica o interagendo con recettori nucleari per steroidi non sessuali (fig. 7, pathway 3) al fine di proteggere dal danno cellulare. Gli estrogeni, infatti, prevengono efficacemente lo stress pro-ossidante, limitando il rilascio di ROS in seguito al danno mitocondriale attraverso l'anello fenolico A, un antiossidante

intrinseco che fornisce un'attività ciclica antiossidante/redox nei neuroni, integrata con altre attività neuroprotettive (Richardson et al., 2012). Nei neuroni e nelle linee cellulari neuronali è stato dimostrato che il 17 β -estradiolo possiede tali proprietà antiossidanti e sopprime lo stress ossidativo indotto da perossido di idrogeno, anione superossido e altri agenti pro-ossidanti (Behl and Holsboer 1999).

Inoltre, può favorire il cancro al seno nelle femmine di topo prive di ER α e ER β endogeni, suggerendo effetti ER-indipendenti del 17 β -estradiolo nella formazione del tumore, che probabilmente si verificano attraverso metaboliti degli estrogeni (Yue et al., 2010). Inoltre, alcuni effetti vascolari degli estrogeni sono mediati attraverso recettori nucleari di ormoni non sessuali, come PPAR γ (Tiyerili et al., 2012).

In condizioni fisiologiche normali, i recettori estrogenici possono essere attivati in modo ligando-indipendente (fig. 7, pathway 4) attraverso cascate di segnalazione innescate da una varietà di fattori, tra cui neurotrasmettitori come la dopamina (Power et al., 1991), fattori di crescita come il fattore di crescita epidermico (EGF) e insulino-simile (IGF-1) (Ignar-Trowbridge et al., 1992; Klotz et al., 2002), e attivatori di particolari vie di segnalazione intracellulare, come quelle mediate dalle chinasi PKC, PKA, MAPK e PI3K (Martin et al., 2000; Schreihofner et al., 2001).

L'attivazione della via ligando-indipendente è in gran parte relativa alla fosforilazione di ER da parte di proteine chinasi cellulari. Ad esempio, EGF può innescare la fosforilazione della serina 118 nel dominio AF-1 di ER α e attivare la sua attività trascrizionale (Kato et al., 2000). Allo stesso modo, la proteina chinasi A (PKA) può anche fosforilare la serina 236 nel dominio di legame al DNA di ER α e regolare la dimerizzazione recettoriale (Chen et al., 1999). Dati recenti suggeriscono che la dopamina può regolare l'espressione dei recettori progestinici all'interno delle regioni riservate della via di sviluppo del cervello del ratto, attivando i recettori degli estrogeni in modo ligando-indipendente (Olesen and Auger, 2008). Infine, ER α media la proliferazione cellulare indotta dalla leptina secondo la stessa modalità nelle cellule tumorali ovariche (Choi et al., 2011).

1.3.6 Azione degli estrogeni sulle cellule endoteliali e sulle cellule muscolari lisce

Gli estrogeni endogeni proteggono dalle malattie vascolari e dall'aterosclerosi prima della menopausa risultando vantaggiosi sotto il profilo del colesterolo e della pressione sanguigna (Mendelsohn and Karas, 1999; Meyer et al., 2006). Gli effetti benefici diretti alla parete vascolare includono l'inibizione della proliferazione delle cellule muscolari lisce della vascolatura, una potente attività vasodilatatrice, l'inibizione dell'infiammazione, proprietà antiossidanti e un accelerato recupero delle cellule endoteliali dopo il danno vascolare (Mendelsohn and Karas, 1999; Meyer et al., 2006), perlopiù mediati dagli ERs classici.

Gli ormoni steroidei inducono sulla parete arteriosa la modificazione dei flussi ionici e dei recettori localizzati sulle cellule muscolari lisce e la modulazione della produzione e dell'attività dei fattori di derivazione endoteliale. Tuttavia, gli effetti indotti dagli estrogeni dipendono dal letto vascolare e variano in relazione alla specie animale considerata, mostrando eterogeneità sulla funzione vasomotoria.

E' stato riportato, ad esempio, che il 17β -estradiolo induce un rilassamento sia endotelio-dipendente che indipendente nell'aorta ma che è completamente endotelio-indipendente nelle arterie mesenteriche, mentre, nelle piccole arterie cerebrali contribuiscono sia i metaboliti dell'NO che della ciclossigenasi (COX). Il trattamento con estrogeni aumenta la rigidità aortica e potenzia la funzione vasodilatatoria endoteliale nei quarti posteriori, ma non nel letto vascolare carotideo (Tostes et al., 2003).

Nel controllo del tono vascolare l'endotelio gioca un ruolo importante attraverso il rilascio di fattori rilassanti e contrattili e, gli estrogeni, esercitano una serie di effetti sugli stessi fattori di derivazione endoteliale.

E' stato dimostrato che gli estrogeni migliorano il rilassamento arterioso endotelio-dipendente a livello coronarico, mesenterico, cerebrale e dell'aorta in diverse tipologie animali e, studi condotti sugli esseri umani hanno evidenziato che il trattamento ormonale sostitutivo aumenta il flusso e diminuisce sia la resistenza coronarica che il tono vascolare periferico.

Il rilascio basale di NO aumenta nelle femmine rispetto ai maschi (Hayashi et al., 1992; Nigro et al., 1990) e la somministrazione di estrogeni ne ripristina il rilascio basale *ex vivo* alterato nei ratti ovariectomizzati, così come è stato osservato (Huang

et al., 2000) il ripristino dell'NO endoteliale in risposta allo shear stress nelle arteriole muscolari pressurizzate di ratti maschi spontaneamente ipertesi (SHR), sovregolando l'eNOS. Di contro, il rilascio della prostaciclina aortica è ridotto di circa il 40% dopo il trattamento estrogenico nei tessuti di questi animali.

La produzione di NO ricopre la maggior parte dell'attività vasorilassante endotelio-dipendente. Tra i probabili meccanismi implicati nell'aumento indotto dall'estradiolo sono inclusi:

- ✓ la stimolazione trascrizionale dell'espressione del gene NOS;
- ✓ l'inibizione della sottoregolazione indotta da citochine, dell'espressione genica della NOS;
- ✓ modificazioni post-traduzionali della NOS;
- ✓ l'aumento del cofattore o della disponibilità L-arginina;
- ✓ l'attivazione non genomica di secondi messaggeri (Ca^{2+} , cAMP) e tirosina chinasi;
- ✓ la traslocazione dalla membrana ai siti intracellulari;
- ✓ la modulazione di sistemi degradanti l'NO (generazione di radicali reattivi dell'ossigeno e antiossidanti).

E' stata dimostrata in una varietà di tessuti l'induzione costitutiva Ca^{2+} -dipendente della NOS da parte degli estrogeni che, inoltre, sono responsabili anche di un effetto molto più intenso e funzionalmente rilevante, ovvero, un rapido miglioramento dell'attività dell'enzima attraverso meccanismi non trascrizionali e riducendone la dipendenza dal calcio (Caulin-Glaser et al., 1997).

L'attivazione acuta dell'eNOS, che si realizza attraverso la via PI3K/Akt, è stato osservato da Hisamoto et al. (Hisamoto et al., 2001) essere dovuta al 17β -estradiolo ma non al 17α -estradiolo nelle cellule endoteliali della vena ombelicale umana. Al contrario, l'espressione della caveolina-1 ne inibisce l'attività catalitica.

Similmente agli estrogeni, il SERM raloxifene stimola l'espressione dell'mRNA dell'eNOS e innesca l'attivazione rapida della sintesi di NO tramite il pathway PI3K (Simoncini et al., 2002).

Il 17β -estradiolo nei casi di angioplastica coronarica percutanea transluminale migliora la funzione endoteliale, consente una maggiore ri-endotelizzazione ed espressione dell'eNOS, e diminuisce la formazione della neointima.

Anche i fattori iperpolarizzanti di derivazione endoteliale (EDHFs) sono importanti mediatori del rilassamento vascolare, in modo specifico nelle arterie di resistenza, dove regolano il flusso sanguigno destinato al tessuto. Il rilascio degli EDHFs è

modulato da numerosi fattori tra cui la stimolazione da parte di un agonista, lo shear stress e stati patologici.

Nell'identificazione e nella caratterizzazione chimica e funzionale di tali fattori, i principali candidati includono gli acidi epossieicosatrienoici, il citocromo P450, metaboliti dell'acido arachidonico, K^+ e perossido d'idrogeno. Inoltre, l'accoppiamento elettrico attraverso le giunzioni mioendoteliali consente di condurre cambiamenti elettrici dall'endotelio al muscolo liscio, mediando o propagando l'iperpolarizzazione.

Una delle prime linee di evidenza dell'iperpolarizzazione estrogeno-indotta (Harder and Coulson, 1979) è stata fornita dall'osservazione dell'iperpolarizzazione della membrana e dalla riduzione all'input della resistenza in seguito all'aggiunta di dietilstilbestrolo alle arterie coronarie di cane, non riconducibile ad un aumento dell'attività della pompa Na^+/K^+ ATPasi.

In seguito, è stato dimostrato che la risposta iperpolarizzante all'acetilcolina nelle arterie mesenteriche isolate da topi di mezza età è significativamente maggiore nelle femmine rispetto ai maschi e la sua marcata riduzione, conseguente all'ovariectomia, è migliorata dal 17β -estradiolo nella terapia sostitutiva. A sostegno di ciò, durante la gravidanza, una condizione caratterizzata da livelli elevati di estrogeni, si verifica la sovraregolazione della vasodilatazione EDHF-mediata (Tostes et al., 2003).

Le azioni mediate dagli estrogeni sulle cellule vascolari possono influenzare anche il metabolismo delle prostaglandine e l'attività dell'enzima chiave nella loro sintesi, ossia la COX.

Il 17β -estradiolo, stimola la produzione di prostaglandine vasodilatanti come la PGI₂ in una varietà di preparati cellulari endoteliali, il cui aumentato livello è stato associato all'aumentata espressione di enzimi chiave, coinvolti nella sua produzione, includendo la fosfolipasi A₂, COX-1, e la prostaciclina sintetasi (IGP).

Sembrerebbe che la COX-2 svolga un ruolo specifico nella sintesi della PGI₂ indotta dall'estradiolo e nella vasodilatazione, costituendo l'isoforma di elezione nelle cellule endoteliali della vena ombelicale umana (Akarasereenont et al., 2000).

Tuttavia è stata stabilita anche un'associazione tra l'estradiolo e prostaglandine vasocostrittrici:

- 1) la sostituzione estrogenica impedisce la vasocostrizione dipendente dalla prostaglandina H sintasi (PGHS), associata all'aumentata sensibilità del recettore del trombossano A₂ (TXA₂)/prostaglandina H₂ (PGH₂), nelle arterie di resistenza mesenteriche di Ratti Sprague-Dawley ovariectomizzati;

- 2) gli estrogeni migliorano la vasodilatazione nelle arterie mesenteriche isolate da ratti Fisher anziani, diminuendo la costrizione PGHS-2 dipendente e l'espressione di PGHS-2 stessa;
- 3) gli estrogeni diminuiscono la sintesi dei metaboliti contrattili della COX.

Il rilascio della $\text{PGF2}\alpha$, ma non del TXB2 e della $6\text{-keto-PGF1}\alpha$, risulta maggiore nella microvascolatura di ratti SHR ovariectomizzati rispetto ai controlli, a seguito della stimolazione con noradrenalina, suggerendo che gli estrogeni diminuiscono la sintesi di metaboliti contrattili della COX, come $\text{PGH2/PGF2}\alpha$ (Dantas et al., 1999). Come accennato in precedenza, non tutte le arterie rispondono allo stesso modo all'estradiolo.

La modulazione del pathway della COX, da parte degli estrogeni sembra essere mediata dall'attivazione degli ERs. Nelle cellule endoteliali delle arterie polmonari, la produzione di PGI2 è mediata da $\text{ER}\beta$; d'altra parte, l'osservazione che gli estrogeni aumentano i livelli di COX-1 nei vasi sanguigni cerebrali di topi wild type, ma sono inefficaci in $\text{ER}\alpha$ knockout, suggerisce che la regolazione della COX-1 endoteliale da parte di $\text{ER}\alpha$ contribuisce agli effetti mediati dagli estrogeni (Tostes et al., 2003).

Nei processi infiammatori, citochine e altri mediatori infiammatori suscitano notevoli cambiamenti fenotipici nelle cellule endoteliali che, attivate, rilasciano NO e PGI2 , vasodilatando e, perciò, facilitando l'afflusso di leucociti ai siti della lesione. Tali cellule endoteliali esprimono molecole di adesione per i leucociti (E-selectina), molecole di adesione intercellulare (ICAM-1) e molecole di adesione cellulare vascolare (VCAM-1) e sono una fonte di chemochine che, non solo hanno effetti chemotattici sui leucociti, ma sono anche potenti attivatori delle integrine dei leucociti, permettendone l'interazione con i recettori endoteliali.

Sia i linfociti T che B, monociti, macrofagi, e mastociti sono sensibili agli estrogeni: a concentrazioni fisiologiche, essi aumentano la produzione di citochine proinfiammatorie e del fattore di necrosi tumorale- α (TNF- α). Quest'ultimo, attiva l'adesione endoteliale dei leucociti tramite l'aumento dell'espressione delle molecole di adesione endoteliale E-selectina, ICAM-1, e VCAM-1 (Cid et al., 1994). Studi di cinetica dell'mRNA per le molecole di adesione endoteliale hanno mostrato che, inizialmente, gli estrogeni aumentano i livelli di mRNA per E-selectina, ICAM-1, e VCAM-1 mentre, successivamente al trattamento, rivelano bassi livelli (Cid et al., 1994). L'aumento dell'espressione della VCAM-1 è ridotto dal 17β -estradiolo nell'aorta di animali ipercolesterolemici ovariectomizzati (Nathan et al., 1999), ed è

attenuato dalla produzione di estrogeni nell'endotelio vascolare per effetto della P450 aromatasi, contribuendo alla protezione delle arterie dall'aterosclerosi.

L'espressione del ligando Fas dell'endotelio vascolare, che inibisce la migrazione delle cellule infiammatorie nella parete vascolare, risulta favorita dal trattamento con 17 β -estradiolo, con conseguente inibizione del traffico dei leucociti attraverso l'endotelio e rappresentando, potenzialmente, un meccanismo apparente dell'effetto antiaterogenico degli estrogeni (Tostes et al., 2003).

Gli effetti vasculoprotettivi di questi ormoni, inoltre, sono stati parzialmente attribuiti ad una variazione dell'equilibrio NO/anione superossido (O²⁻) nella parete del vaso, a favore dell'aumento della biodisponibilità di NO. Nelle colture di cellule endoteliali della vena ombelicale umana, il 17 β -estradiolo diminuisce l'espressione della subunità gp91phox della NADPH ossidasi e sovraregola l'espressione dell'eNOS, migliorando il bilancio NO/O₂ (Wagner et al., 2001). D'altra parte, l'aumento dello stress ossidativo e la riduzione della produzione di NO a causa della carenza di estrogeni sono stati associati a livelli di pressione sanguigna più elevati.

La sostituzione estrogenica cronica nei ratti ovariectomizzati previene la diminuzione dei livelli plasmatici di nitriti/nitrati e l'aumento della pressione sanguigna.

Wassmann et al. (2001) hanno osservato che la terapia ormonale sostitutiva e l'antagonismo per il recettore dell'angiotensina di tipo 1 (AT1) previene il peggioramento della disfunzione endoteliale, una maggiore risposta vasocostrittoria all'angiotensina II (Ang II) e l'aumento della produzione vascolare di O₂ in ratti SHR ovariectomizzati.

Molto recentemente, è stato dimostrato che gli estrogeni riducono l'espressione della NAD(P)H ossidasi indotta dall'Ang II e del perossinitrito nelle colture di cellule endoteliali.

E' stato osservato che lo stress ossidativo nelle arterie mesenteriche risulta significativamente aumentato nei ratti SHR ovariectomizzati ed è attenuato dal trattamento con estradiolo o estradiolo associato al progesterone.

Negli esseri umani è stato suggerito che la disfunzione endoteliale secondaria alla deprivazione estrogenica endogena acuta (ovariectomia chirurgica) è causata dalla ridotta disponibilità di NO, che deriva dalla produzione dello stress ossidativo COX-dipendente (Viridis et al., 2000).

Gli estrogeni agiscono, inoltre, sul sistema renina-angiotensina: è stato dimostrato che aumentano l'espressione genica e i livelli plasmatici di angiotensinogeno e hanno effetti anche sui livelli di renina presenti nella circolazione. Rispetto agli uomini, le

donne in generale ma anche le donne in terapia ormonale sostitutiva e in menopausa manifestano livelli di renina inferiori.

La carenza di estrogeni aumenta i livelli di mRNA del sottotipo recettoriale AT1, come l'efficacia dell'Ang II stessa sulla vasocostrizione mentre, la terapia estrogenica sostitutiva nel ratto ovariectomizzato ne inverte la sovraespressione.

La sottoregolazione dell'mRNA e dell'espressione proteica del recettore AT1 da parte degli estrogeni avviene attraverso l'attivazione degli ERs e sembra essere mediata dalla via NO-dipendente (Nickenig et al., 2000).

Il trattamento con estrogeni antagonizza anche gli effetti della crescita mediata dall'interazione dell'Ang II con il recettore AT1 nella muscolatura liscia vascolare e il meccanismo coinvolto nell'azione del 17 β -estradiolo include l'attenuazione dell'attivazione di ERK e della transattivazione dell'espressione della fosfatasi-1 della via MAPK mediata dal recettore AT1 (Takeda-Matsubara et al., 2002).

Sia gli estrogeni che SERMs, come idoxifene, inibiscono il rilascio di specie reattive dell'ossigeno indotto dall'Ang II. Brosnihan et al. (1999) hanno dimostrato che l'attività dell'enzima di conversione dell'Ang (ACE) nella circolazione e nei tessuti è ridotto dalla sostituzione ormonale cronica in modelli animali di postmenopausa.

Sotto l'aspetto cardiovascolare in risposta alla somministrazione di Ang (1-7) e Ang II, ratti (mRen2) transgenici femmina trattati con la sostituzione estrogenica, hanno mostrato livelli di pressione sanguigna più bassa. Poiché gli estrogeni aumentano i livelli plasmatici di Ang (1-7) e ne amplificano l'azione vasodilatatoria riducendo la formazione e l'azione vasocostrittoria dell'Ang II, è ipotizzabile una modificazione dell'equilibrio vasocostrittore/vasodilatatore del sistema renina-angiotensina (Brosnihan et al., 1999).

Le azioni degli estrogeni sono state mostrate in diversi punti della cascata dell'endotelina-1 (ET-1). È stato riportato che il 17 β -estradiolo attenua la costrizione coronarica indotta da ET-1, sia *in vitro* che *in vivo* e, in aggiunta, in assenza di ormoni ovarici femminili è stato osservato un aumento dell'espressione dell'mRNA della prepro-ET-1 nelle cellule endoteliali dell'aorta porcina.

Barber et al. (Barber et al., 1996) hanno riportato che le fluttuazioni endogene degli estrogeni influenzano l'affinità dei recettori dell'ET-1 nella muscolatura liscia dell'arteria coronaria isolata da maiali femmina. Il rapporto differenziale dei recettori ETA e ETB, favorisce gli effetti vasodilatatori nelle donne (Ergul et al., 1998) e l'ovariectomia aumenta le risposte vasocostrittorie all'agonista del recettore ETB. L'estradiolo e i suoi metaboliti con poca o nessuna affinità per gli ERs, inibiscono la

sintesi basale e ET-1 stimolata nelle cellule endoteliali delle arterie coronarie di suino, probabilmente mediata dall'inibizione dell'attività MAPK e da un meccanismo ER-indipendente (Dubey et al., 2001).

In donne sane in postmenopausa trattate con la terapia ormonale sostitutiva è stato osservato un aumento plasmatico di nitriti/nitrati e una diminuzione dei livelli di ET-1 (Saitta et al., 2001).

Sulla muscolatura liscia gli estrogeni svolgono un ruolo nella regolazione selettiva del tono vascolare modulando e modificando la permeabilità dei canali ionici in tali cellule.

Le azioni del 17β -estradiolo sui canali del K^+ sono state descritte sia nelle cellule del muscolo liscio che in quelle endoteliali. I canali del K^+ ATP-sensibili (K_{ATP}) sembrano essere coinvolti nel rilassamento dell'aorta di ratto indotto da un meccanismo AMP ciclico-dipendente (Martinez et al., 2001).

Studi funzionali hanno dimostrato anche che il 17β -estradiolo rilassa le arterie coronarie suine attraverso un meccanismo endotelio-indipendente che coinvolge l'efflusso di K^+ e tramite l'impiego della tecnica del patch-clamp è stato confermato come siano proprio gli estrogeni a stimolare l'apertura del canale del K^+ . Dal momento che l'effetto del 17β -estradiolo sui canali a larga conduttanza del K^+ attivati dal calcio (BK_{Ca}) risulta bloccato dall'inibizione dell'attività della proteina chinasi dipendente dal cGMP ed è mimato dal cGMP esogeno o stimolando l'attività della proteina chinasi cGMP dipendente, è stato suggerito che il 17β -estradiolo rilassa le arterie coronarie aprendo i canali BK_{Ca} tramite la fosforilazione cGMP-dipendente (White et al., 1995).

In riferimento all'interazione diretta tra l'estradiolo e la subunità dei canali voltaggio-dipendenti è stato osservato che l'estradiolo si lega alla subunità β dei BK, che consistono in un poro costituito dalla subunità α e in una subunità β regolatoria che conferisce una maggiore sensibilità al Ca^{2+} . Il legame dell'estradiolo a quest'ultima subunità, attiva i canali BK che, indipendentemente dalla generazione di segnali intracellulari, possono essere attivati anche dall'ormone coniugato ad una proteina carrier di membrana impenetrabile (Valverde et al., 1999).

Evidenze funzionali hanno dimostrato che gli estrogeni modulano l'ingresso di Ca^{2+} e il suo rilascio intracellulare nelle cellule muscolari lisce della vascolatura; nell'aorta e nell'arteria mesenterica di ratto, il 17β -estradiolo riduce significativamente la massima contrazione al KCl e alla norepinefrina. In assenza di Ca^{2+} extracellulare, il 17β -estradiolo rilassa le arterie precontratte con norepinefrina,

suggerendo che l'ormone inibisce il rilascio di Ca^{2+} intracellulare, un effetto che probabilmente è dovuto all'interazione diretta con la membrana cellulare o con i canali ionici.

Kitazawa et al. (Kitazawa et al., 1997) hanno osservato che l'estradiolo attenua lo sviluppo di un'alta forza indotta dal KCl e la fosforilazione della catena leggera della miosina, producendo un rilassamento rapido e reversibile. Inoltre, considerata l'inibizione rapida dei canali del Ca^{2+} a voltaggio dipendenti di tipo L nelle cellule muscolari lisce, a concentrazioni fisiologiche riduce l'influsso di Ca^{2+} attraverso l'inibizione di tali canali e riduce la fosforilazione della catena leggera della miosina e la contrazione muscolare. Il 17β -estradiolo riduce anche la risposta del Ca^{2+} intracellulare all'ET-1 nelle cellule muscolari lisce dell'arteria coronaria, in condizioni in cui l'influsso del Ca^{2+} e la ricaptazione nel reticolo sarcoplasmatico sono bloccati.

Altre azioni degli estrogeni includono l'attivazione della via monossido di carbonio/eme ossigenasi/cGMP nelle cellule endoteliali di origine umana, a livello della vena ombelicale e dell'arteria uterina, la sovraregolazione dei recettori $\alpha 1$ -adrenergici nelle arterie mesenteriche di resistenza e la modulazione della proliferazione e della crescita delle cellule muscolari lisce (Tostes et al., 2003). La figura 8 è esemplificativa degli effetti mediati dagli estrogeni sulle cellule endoteliali e muscolari lisce della vascolatura (Gencel et al., 2012).

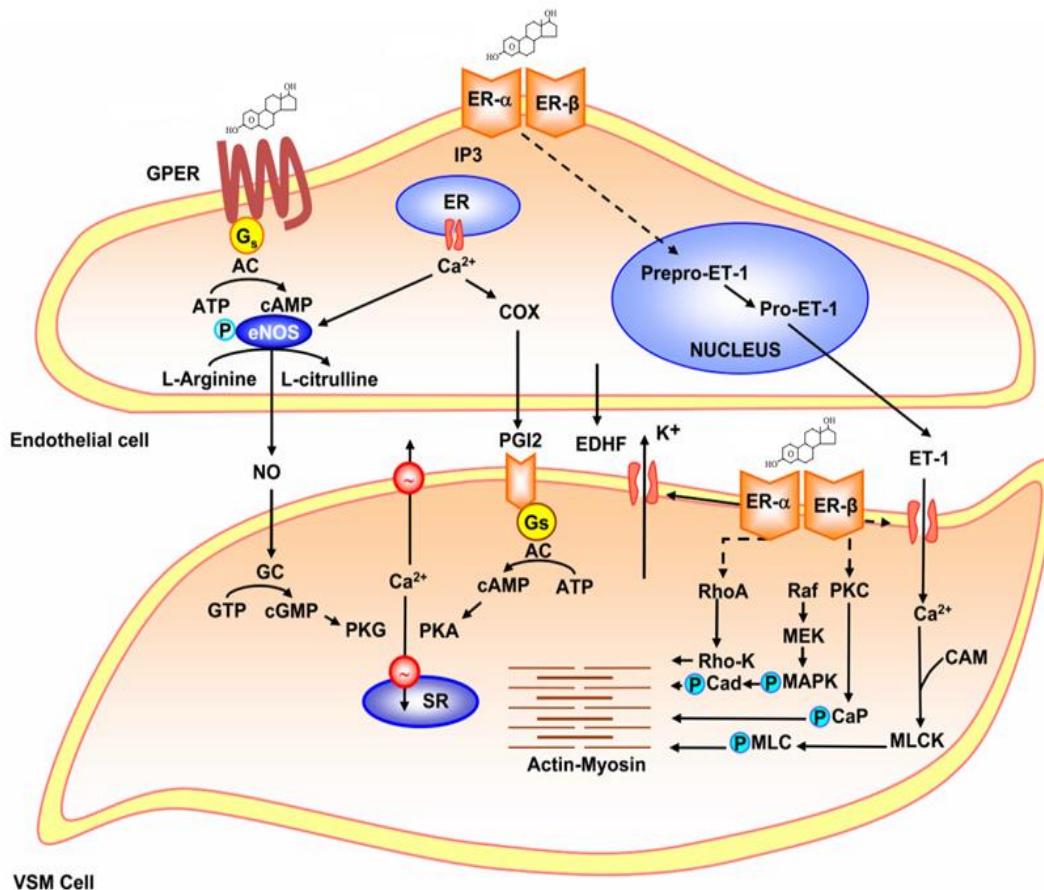


Figura 8: Effetti degli estrogeni sulle cellule endoteliali e muscolari lisce vascolari (Gencel et al., 2012).

In modelli murini ovariectomizzati di ischemia locale, il pretrattamento con estradiolo aumenta l'espressione del trasportatore del glucosio, GLUT1, e la sopravvivenza delle cellule endoteliali nei vasi sanguigni cerebrali, probabilmente contribuendo alla significativa riduzione del danno ischemico (Shi et al., 1997).

A concentrazioni fisiologiche, o anche superiori, l'estradiolo inibisce la sintesi del DNA e la proliferazione cellulare in risposta a vari stimoli plasmatici, tra cui il fattore di crescita derivato dalle piastrine (PDGF), il fattore di crescita insulino simile (IGF), ET-1 e lo stress meccanico (Ling et al., 2001).

Tali effetti possono essere mediati attraverso varie vie, compresi ERs, MAPK, pre-oncogeni (c-fos e cMyc), geni della risposta della crescita precoce (SP-1 e Egr-1) e creatina chinasi.

Analogamente, progesterone (Morey et al., 1997; Suzuki et al., 1996) e fitoestrogeni (Ling et al., 2004; Dubey et al., 1999) sortiscono un effetto inibitorio sulla proliferazione delle VSMCs.

Gli estrogeni, a concentrazioni fisiologiche basse, possono stimolare la proliferazione delle VSMCs (Somjen et al., 1998) e perdere l'azione inibitoria sulla proliferazione cellulare indotta da PDGF in condizioni di elevate concentrazioni di glucosio (Ling et al., 2002). I fitoestrogeni, invece, possono migliorarne gli effetti sulla crescita (Somjen et al., 2001) e influenzarne la produzione di collagene attraverso la mediazione degli ERs (Mizutani et al., 2000) mentre, la gravidanza, così come la supplementazione di estradiolo, può aumentare la crescita indotta da PDGF nelle arterie uterine, attraverso l'attivazione della proteina chinasi C (PKC) (Keyes et al., 1996).

1.3.7 Concentrazioni degli estrogeni e distribuzione dei recettori estrogenici in gravidanza

Il corpo luteo è l'unica fonte di 17β -estradiolo durante le prime 5-6 settimane di gestazione e, trascorso il primo trimestre, la placenta diventa la fonte maggiore (Tulchinsky and Hobel, 1973).

Il tasso di produzione e il livello circolante degli estrogeni aumenta in modo marcato durante la gravidanza. Nella donna, il 17β -estradiolo è inferiore a 0.1 ng/mL durante la fase follicolare del ciclo e arriva a circa 0.4 ng/ml durante la fase luteale (Abraham et al., 1972).

Il concepimento comporta un incremento graduale in un range di 6-30 ng/ml al termine (Lindberg et al., 1974), raggiungendo il doppio, circa, della fase luteale entro la sesta settimana, per aumentare gradualmente tra la decima e la trentesima settimana e, di poco, nelle ultime dieci settimane (De Hertogh et al., 1975).

Considerata la deficienza dell'attività della 17-idrossilasi e della 17-20 desmolasi, la placenta è incapace di convertire il progesterone in estrogeni, pertanto, sfrutta i precursori degli androgeni a 19 atomi di carbonio prodotti dalle ghiandole surrenali fetali e materne.

La principale fonte surrenale fetale di deidroepiandrosterone solfato (DHEAS) è la frazione LDL del colesterolo circolante nel sangue fetale e, solo una fonte minore,

deriva dal pregnenolone secreto dalla placenta. Circa il 20% del colesterolo fetale deriva dal compartimento materno e poiché i livelli nel liquido amniotico sono trascurabili, la principale fonte di colesterolo è il fegato fetale. All'avanzare della gestazione, crescenti quantità di 17β -estradiolo sono sintetizzate dalla conversione del DHEAS circolante materno e fetale dalle quali, al termine, è prodotta circa la stessa quantità di estrogeni (Tulchinsky and Hobel, 1973; Siiteri and MacDonald, 1966). Il sistema endocrino del feto si distingue per la vasta coniugazione degli steroidi con il solfato.

Di conseguenza, la placenta si basa sull'attività della solfatasi per scindere i coniugati solfati nel compartimento fetale e, naturalmente, una sua carenza risulta in uno stato a bassa concentrazione di estrogeni in gravidanza (Bradshaw and Carr, 1986).

L'enzima aromatasi citocromo P450 è responsabile della conversione dei precursori a 19 atomi di carbonio in estrogeni (Simpson et al., 1994).

In merito alla funzione vasodilatatoria degli estrogeni durante la gravidanza nei modelli animali, una loro iniezione diretta nelle arterie uterine produce aumenti notevoli del flusso sanguigno ma senza dubbio, è il 17β -estradiolo il più potente estrogeno implicato in questo ruolo sebbene, anche l'estriolo e l'estrone, per quanto meno attivi, producano il medesimo effetto (Resnik et al., 1974).

Considerata l'esposizione del letto utero-placentare all'enorme secrezione di estriolo, quest'ultimo può ritenersi il principale sovraregolatore del flusso sanguigno uterino, il cui ruolo è predominante nella gravidanza umana (Resnik et al., 1974).

I meccanismi regolati dagli estrogeni consentono al feto di determinare la produzione e la secrezione di progesterone durante il terzo trimestre: nei primati, rendono possibile la biosintesi del progesterone placentare in base alla disponibilità del colesterolo LDL per la conversione in pregnenolone e nei prodotti steroidei a valle (Henson et al., 1991).

I livelli di estriolo risultano molto bassi fino all'ottava settimana ma è stato osservato un incremento graduale dopo la dodicesima settimana, fino alla trentaduesima (De Hertogh et al., 1975).

L'estriolo è primariamente identificato nel siero materno alla nona settimana di gestazione (Tulchinsky and Hobel, 1973; Siiteri PK, MacDonald, 1966; Tulchinsky et al., 1971; Landon and Gabbe, 1991): questa relazione temporale trova corrispondenza con le prime fasi della maturazione degli steroidi nella ghiandola surrenale fetale (Tulchinsky and Hobel, 1973), per poi dipendere dalla presenza del

feto. Le concentrazioni di estriolo sono inferiori a circa 0.01 ng/ml nella donna non gravida: sono pari a circa 0.05 ng/ml entro la nona settimana per poi aumentare gradualmente in un range di 10-30 ng/ml al termine (Tulchinsky and Hobel, 1973; Tulchinsky et al., 1972; Tulchinsky et al., 1971; Klopper et al., 1973), riflettendo il picco finale della steroidogenesi intrauterina tra la trentacinquesima e la quarantesima settimana di gestazione.

La placenta non presenta l'attività della 16 α -idrossilasi pertanto, l'estriolo con il suo gruppo 16 α -idrossilico deve essere sintetizzato da un precursore fetale immediato.

È, infatti, il fegato fetale a provvedere alla 16 α -idrossilazione del DHEAS per la sintesi dell'estriolo placentale, attività che scompare dopo la nascita.

Per le prime 4-6 settimane di gravidanza, l'estrone si forma da fonti materne come ovaie, surreni e conversione periferica (Lindberg et al., 1974); in seguito, la placenta secerne quantità incrementali di estrone dalla conversione del DHEAS materno circolante e fetale, costituendone la fonte maggiore per il resto della gravidanza (Tulchinsky and Hobel, 1973). Le concentrazioni di estrone sono inferiori a

0.1 ng/ml durante la fase follicolare e possono raggiungere un massimo di 0.3 ng/ml nella fase luteale del ciclo mestruale normale e durante le 6-10 settimane di gestazione (Tulchinsky et al., 1972), per poi avere un aumento graduale di 2-30 ng/ml al termine (Tulchinsky and Hobel, 1973; Tulchinsky et al., 1972; Lindberg et al., 1974).

Nei 184 giorni di gestazione dei babbuini, le concentrazioni di estradiolo aumentano da livelli iniziali relativamente bassi fino a raggiungere 0.35 ng/ml tra i giorni 53-59 e mostrare un picco maggiore di 2.50 ng/ml tra i giorni 60-85 della gestazione.

Tale picco si riduce a circa 1.00 ng/ml a metà gravidanza per poi aumentare progressivamente fino ad un valore massimo superiore a 4.00 ng/ml (Albrecht et al., 2000).

Nelle ovaie di ratto non gravide, il tasso di secrezione degli estrogeni *in vivo*, è di circa 0.95 E.E. ng/ovaie/hr al termine dell'estro mostrando valori massimi di circa 11 E.E. ng/ovaie/hr al termine del diestro e in pieno proestro. La concentrazione degli estrogeni va da un minimo di 0.54 E.E. ng/ml di plasma al termine dell'estro, fino a valori massimi pari a circa 4.53 E.E. ng/ml di plasma al termine del diestro. Nel plasma venoso delle ovaie, la secrezione degli estrogeni tende a ridursi in seguito al rilascio dell'LH (Yoshinaga et al., 1969). Durante la gravidanza, contrariamente a quanto ci si attenderebbe, i livelli di estrogeni risultano essere inferiori a quelli osservati nel ciclo dell'estro, mostrando un picco bifasico nei giorni 3 e 4. La

larghezza dei due picchi a giorno 4, è tipica 24 ore prima dell'impianto dell'ovulo mentre, il significato del picco minore a giorno 3 è poco chiaro. L'aumento graduale si osserva tra i giorni 13-20, ovvero nel terzo periodo della gestazione, per avere un picco al parto, ossia nel giorno 22 (Yoshinaga et al., 1969). Nei giorni 4 e 22 sono riportate le concentrazioni maggiori: il tasso di secrezione è pari a circa 2.34 E.E. ng/ovaie/hr con una concentrazione di 1.10 E.E. ng/ml di estrogeni a giorno 4, indotta dal rilascio della gonadotropina, in cui solo l'LH sembra essere coinvolto (Yoshinaga et al., 1969). A giorno 22, invece, il tasso di secrezione è circa 14.65 E.E. ng/ovaie/hr mentre, il picco della concentrazione di estrogeni raggiunge 3.12 E.E. ng/ml (Yoshinaga et al., 1969).

Anche nel topo è stato osservato un aumento dei livelli di estradiolo al quarto di diciannove giorni di gravidanza, che si riduce nel giorno successivo e aumenta nuovamente nel sesto giorno (Jacquet et al., 1977).

Nel sangue venoso delle ovaie del ratto, anche la concentrazione dell'estrone risulta maggiore durante l'estro: in questa fase del ciclo, è circa 416 pg/ml di plasma, con un tasso massimo di secrezione di 947 pg/hr/ovario e, sebbene durante il parto il tasso di secrezione sia superiore (1216 pg/hr/ovario), tuttavia la concentrazione di estrone è circa 220 pg/ml di plasma (Shaikh, 1971).

Anche in tal caso è stato osservato un picco al quarto giorno di gravidanza, al fine di preparare le cellule luteali all'azione della prolattina. Tuttavia, in generale per gli estrogeni, le concentrazioni non risultano crescenti gradualmente nel corso della gravidanza: il mantenimento di livelli fluttuanti, intorno al periodo centrale della gestazione molto probabilmente potrebbe essere associato alla crescita del follicolo in assenza dell'ovulazione, evidenziando il persistere dell'attività follicolare ciclica durante la gravidanza (Shaikh, 1971).

Nel topo l'aumento graduale di estradiolo nel plasma si verifica dopo un marcato incremento della produzione di androgeni tra i giorni 8-10 della gravidanza. La maggiore produzione di androgeni, a metà gestazione, è finalizzata a fornire un substrato utile per l'aromatizzazione e il successivo declino nel rilascio, probabilmente a causa della riduzione della secrezione di LH, segnala la regolazione placentare della steroidogenesi ovarica; tuttavia la placenta di ratto è capace di produrre anche un ormone LH-simile, che può stimolare la sintesi di estrogeni.

Inoltre, il numero delle placente determina i livelli plasmatici degli ormoni sessuali femminili, infatti, in seguito ad una loro riduzione, il supporto luteotropico

placentare risulta inferiore, riflettendosi in livelli di estrogeni bassi (Barkley et al., 1979).

Garland e collaboratori (1987) hanno osservato che nel ratto le concentrazioni di progesterone, a differenza di altri ormoni, sono significativamente più alte in tutte le fasi della gravidanza (~ 0.5-10 $\mu\text{mol/l}$) eccetto al termine (~ 0.2 $\mu\text{mol/l}$) mentre, quelle di estradiolo, lo sono significativamente a giorno 16 (~ 0.18 nmol/l).

Le concentrazioni di prolattina circolanti hanno mostrato valori più alti durante la prima metà della gestazione (~ 7 $\mu\text{g/l}$) per poi avere una riduzione durante la seconda metà e aumentare drammaticamente al termine (~ 22 $\mu\text{g/l}$).

L'attività della renina plasmatica risulta avere un picco a giorno 9, per poi ridursi a giorno 16 e poi aumentare nuovamente in modo significativo.

Per quanto concerne i livelli di aldosterone, risultano significativamente superiori rispetto ai controlli nei giorni 3 e 9 della gravidanza (2.5 nmol/l vs 1.4 nmol/l); un lieve aumento è stato osservato anche nella seconda metà della gravidanza, tuttavia significativo solo nel sedicesimo giorno.

Infine, non è stato riportato alcun cambiamento significativo della concentrazione plasmatica di corticosterone, tranne al termine, caratterizzato da una netta riduzione (Garland et al., 1987).

Dati di Chung e collaboratori (2012), invece, hanno evidenziato come nei topi C57Bl/6 vergini di tre mesi il progesterone sierico aumenti gradualmente, con un picco a metà gravidanza (~ 58.57 ng/ml), i cui livelli sono mantenuti fino al concepimento.

In un lavoro del 1982, Puri e Garfield riportano che nei ratti Sprague Dawley, i livelli di progesterone si riducono notevolmente al diciannovesimo giorno, in maniera molto più rapida nel tessuto uterino che nel plasma, di contro ai livelli di estradiolo che iniziano ad aumentare dopo tale giorno, con un picco al parto (Puri and Garfield, 1982).

Per quanto concerne invece l'espressione proteica di $\text{ER}\alpha$ e $\text{ER}\beta$, studi condotti *in vivo* e in coltura sull'arteria uterina e sulle relative cellule (UAEC) di pecore in gravidanza (120-130 giorni) hanno evidenziato livelli di circa 8 volte maggiori per l'mRNA di $\text{ER}\alpha$ rispetto a quello di $\text{ER}\beta$, giungendo a conclusione che $\text{ER}\alpha$ gioca un ruolo predominante rispetto a $\text{ER}\beta$ nella risposta agli estrogeni delle UAECs (Liao et al., 2004).

I livelli di entrambi i recettori, tuttavia, nell'endotelio dell'arteria uterina (UAendo) sono risultati elevati nella fase follicolare della pecora: $\text{ER}\beta$ verrebbe aumentato

dalla gravidanza sia nell'endotelio che nella muscolatura liscia dell'arteria uterina mentre ER α , sembrerebbe non particolarmente alterato. Al contrario, nell'arteria uterina di pecore ovariectomizzate (OVEX) si verifica una sostanziale riduzione di ER β nell'endotelio ma ER α resta inalterato. Nel muscolo liscio, invece, entrambi i recettori aumentano.

Il solo trattamento con 17 β -estradiolo, ma non con il progesterone o in combinazione, aumenta i livelli di ER α mentre, la riduzione di ER β nell'endotelio uterino di tali animali è ristabilita dalla combinazione del 17 β -estradiolo e del progesterone (Byers et al., 2005).

Lo studio di Pastore e collaboratori (2012) condotto sull'arteria uterina di pecore in tarda gravidanza, ha messo a confronto le modifiche dell'espressione proteica di ER α e ER β nell'endotelio del sistema riproduttivo rispetto a quello non riproduttivo, a seguito dell'aumento degli estrogeni nella fase follicolare e dell'aumento del progesterone nella fase luteale e nella gravidanza. Durante la fase follicolare è stato riportato un aumento di 1.5 volte di ER α nell'endotelio dell'arteria uterina rispetto alla fase luteale. Un significativo aumento è stato riportato anche per l'espressione proteica di ER β nell'endotelio in gravidanza, in modo preponderante in quello dell'arteria placentare, che è risultato maggiore di quasi 2.5 volte rispetto alla fase luteale (Pastore et al., 2012).

Il gruppo di Leiberman (1993), nell'arteria uterina di ratto ha riportato un drastico incremento dei recettori estrogenici a partire da metà gravidanza fino al parto, raggiungendo una concentrazione citosolica superiore a 25 fmol/mg di proteina. Sebbene con minore intensità, anche il recettore del progesterone subisce un aumento che supera i 15 fmol/mg di proteina nel citosol, dieci giorni dopo la gravidanza. L'aumento del livello dei recettori steroidei a 19-20 giorni di gravidanza potrebbe essere interpretato come un livello più elevato di legame in ciascuna cellula nel tessuto o un aumento del numero di cellule dotate di recettori per estrogeni e progesterone (Leiberman et al., 1993).

1.4 GPR30/GPER

GPER possiede caratteristiche strutturali e funzionali condivise dai membri della superfamiglia dei recettori a 7 domini transmembrana accoppiati a proteina G (GPCR), la più grande classe di recettori di membrana plasmatica. Questo recettore estrogenico è localizzato prevalentemente all'interno delle membrane intracellulari nella maggior parte, ma non in tutti i tipi cellulari e la sua espressione di superficie è modulata dagli ormoni steroidei e durante il danno tissutale. La constatazione che GPER abbia una predisposizione intracellulare suggerisce interazioni recettoriali con ER α e ER β (Gaudet et al., 2015).

GPER è una proteina strutturalmente non correlata a ER α o ER β , che si lega con alta affinità al 17 β -estradiolo e può mediare alcuni dei suoi effetti non-genomici (Revankar et al., 2005). L'esistenza di questo recettore è stata suggerita da prove di segnalazione della proteina G mediata da estrogeni e dalla localizzazione di siti di legame per estrogeni sulle membrane (Wyckoff et al., 2001). GPER è stato clonato nel 1998 ed è localizzato sul cromosoma 7p22 (O'Dowd et al., 1998). E' stato identificato da due differenti gruppi come nuovo recettore estrogenico (Revankar et al., 2005; Filardo et al., 2007) sebbene sia stato originariamente riconosciuto da numerosi laboratori alla fine del 1990 come un recettore orfano, ovvero un recettore clonato senza ligando endogeno noto, e formalmente definito GPR30 sulla base dello schema di numerazione sequenziale per i recettori orfani. Il suo cDNA è stato identificato in più fonti tra cui le cellule endoteliali esposte a shear stress puro (Takada et al., 1997). L'omologia di sequenza suggerisce che GPR30 sia più simile alla sottofamiglia di chemoattrattori/chemochine, sebbene non confermato dai ligandi attivazione (Owman et al., 1996). Dati esistenti dimostrano in modo schiacciante che GPR30 lega specificamente gli estrogeni e in tal modo attiva cascate di segnalazione intracellulari comunemente associate con i recettori accoppiati a proteina G, portando alla sua più recente designazione di recettore estrogenico accoppiato a proteina (GPER) da parte dell'Unione Internazionale di Farmacologia Clinica e di Base nel 2007 (Alexander et al., 2013).

L'organizzazione a sette α eliche transmembrana delle GPCRs è tale che il terminale amminico risulta localizzato esternamente alla cellula, dove viene spesso glicosilata, e il terminale carbossilico è localizzato nel citoplasma, dove svolge un ruolo importante nella desensibilizzazione del recettore, nel legame con le subunità di proteine G e nell'internalizzazione attraverso la fosforilazione mediata da proteine

chinesi (Gurevich et al., 2012) e arrestine, che avviano anche cascate di segnalazione secondarie (Liggett, 2011; Luttrell and Miller, 2013). I 3 anelli extracellulari sono implicati nel legame del ligando mentre, i quattro anelli citoplasmatici sono coinvolti nel legame selettivo e nell'attivazione di proteine G eterotrimeriche, con numerose GPCR in grado di attivare più proteine G (Wong, 2003; Moreira, 2014).

Il punto di vista classico della funzione dei recettori di membrana comporta la trasmissione, attraverso la membrana plasmatica, di segnali provenienti dall'esterno all'interno della cellula e GPCR e altri recettori sono quasi esclusivamente raffigurati come funzionanti a livello della membrana plasmatica. Questo modello è coerente con la maggior parte dei ligandi per GPCR che non possono permeare passivamente le membrane.

Sebbene sia stata inizialmente suggerita una localizzazione di membrana plasmatica sulla superficie cellulare (Filardo et al., 2002), utilizzando derivati estrogenici fluorescenti (E2-Alexas), la microscopia confocale ha rivelato che GPER è, in primo luogo, localizzato sul reticolo endoplasmatico e che questa espressione correla con la sua espressione endogena (Revankar et al., 2005).

In molti tipi cellulari, la maggior parte dei recettori è localizzata nelle membrane intracellulari, tra cui il reticolo endoplasmatico e l'apparato del Golgi (Revankar et al., 2005). Ad oggi, la localizzazione di GPER rimane controversa, nonostante nella maggior parte degli studi prevalga la localizzazione di membrana plasmatica intracellulare (Sakamoto et al., 2007; Albanito et al., 2008; Matsuda et al., 2008; Otto et al., 2008; Liverman et al., 2009; Terasawa et al., 2009) e nucleare (Smith et al., 2009; Madeo and Maggiolini, 2010; Pupo et al., 2013).

Sebbene in contrasto con la sua localizzazione di membrana plasmatica (Filardo et al., 2007; Kanda and Watanabe, 2003; Thomas et al., 2005), GPER espresso a livello citoplasmatico è capace di avviare la segnalazione cellulare (Revankar et al., 2007). Questa discrepanza può essere spiegata con l'osservazione che i recettori accoppiati a proteina G si spostano tra il reticolo endoplasmatico e la membrana plasmatica durante la biogenesi recettoriale e l'internalizzazione in risposta alla stimolazione da parte dell'agonista (Kleuser et al., 2008). L'idea che GPER funzioni dalle membrane intracellulari è supportata da studi che hanno dimostrato che solo i derivati degli estrogeni permeanti le cellule sembrerebbero attivare rapidamente GPER (Revankar et al., 2007) e che la somministrazione intracellulare di un ligando selettivo per GPER determinerebbe una risposta più rapida e potente del calcio rispetto all'applicazione di un ligando extracellulare (Deliu et al., 2012).

GPER subisce un movimento retrogrado costitutivo mediato dalla clatrina, dalla membrana plasmatica al reticolo endoplasmatico e studi recenti indicano la sua interazione con proteine leganti domini PDZ che smistano i recettori transmembrana ai sinaptosomi e agli endosomi (Gaudet et al., 2015). Tale movimento alla superficie delle cellule è regolato da coespressione della proteina modificante l'attività del recettore 3 (RAMP) (Lenhart et al., 2013).

L'attività delle proteine G eterotrimeriche da parte di GPER avvia numerosi effettori, tra cui l'adenilato ciclasi e c-Src (Filardo et al, 2002; Thomas et al, 2005). Filardo e collaboratori (2000), hanno dimostrato che l'espressione di GPER è necessaria all'attivazione rapida estrogeno-mediata di ERK1/2 (Filardo et al., 2000).

Sia nei tessuti vascolari che in quelli non vascolari, si verifica un rapido aumento di cAMP conseguente alla stimolazione del 17 β -estradiolo (Aronica et al, 1994; Mügge et al., 1993; Revankar et al., 2005). La proteina c-Src attiva le metalloproteinasi della matrice che, a loro volta, sono coinvolte nella transattivazione dei recettori del fattore di crescita dell'epidermide (EGFR) (Filardo et al., 2000). Ciò comporta una serie di eventi a valle, tra cui l'attivazione di MAPK e PI3K (Filardo et al, 2000; Revankar et al., 2005; Thomas et al., 2005) che, a loro volta, possono attivare proteine nucleari coinvolte nella regolazione trascrizionale di geni i cui promotori non necessariamente contengono un ERE (Prossnitz et al., 2008).

È interessante notare che gli antagonisti degli ERs classici, tamoxifene, raloxifene e ICI 182,780, sono agonisti di GPER (Filardo et al., 2000; Thomas et al., 2005), come anche alcuni fitoestrogeni tra cui genisteina e quercetina (Maggiolini et al., 2004), di importanti implicazioni per l'uso clinico.

1.4.1 Immunolocalizzazione e siti subcellulari di attivazione di GPER

Le GPCRs sono proteine integrali di membrana sintetizzate nel reticolo endoplasmatico rugoso che si muovono attraverso l'apparato del Golgi e vengono trasportate dinamicamente attraverso le vescicole da e verso la membrana plasmatica. Si tratta di un trasporto anterogrado ordinato, un processo che richiede piccole GTPasi, tra cui Rab-1 e Arf e proteine chaperoni di trasporto, come COP I/II (Beck et al., 2009) che valutano lo stato di glicosilazione, ripiegamento e dimerizzazione.

In seguito all'interazione con i loro ligandi, le GPCRs subiscono alterazioni conformazionali che provocano lo scambio di GDP per GTP all'interno della

subunità $G\alpha$ della proteina e la sua successiva dissociazione dalle subunità proteiche $G\beta\gamma$, che determina la transizione del complesso recettoriale in uno stato di minore affinità. La trasduzione del segnale risulta nell'attivazione di enzimi della membrana plasmatica o canali ionici dipendenti dalla natura del tipo di subunità $G\alpha$ ($G\alpha_s$, $G\alpha_i/o$, $G\alpha_q11$ o $G\alpha_{12/13}$), così come altre proteine del complesso del recettore attivato, come le β -arrestine e proteine chinasi recettore-G e chinasi Src. Anche i complessi della subunità $G\beta\gamma$ sono in grado di trasdurre i segnali intracellulari, più comunemente mediante un meccanismo di segnalazione che provoca l'attivazione di PI3K, il rilascio di calcio intracellulare e la stimolazione di esoproteasi che permettono il rilascio di fattori di crescita legati alla membrana (Lin and Smrcka, 2011).

La prima evidenza a sostegno della funzione di GPER come recettore accoppiato a G è stata fornita dalla sua associazione fisica a $G\alpha_s$ nel suo stato inattivo, complesso che si dissocia a seguito della stimolazione estrogenica (Filardo et al., 2007). In secondo luogo, è stata misurata la produzione di cAMP intracellulare e la segnalazione cAMP-dipendente mediata dal recettore in cellule tumorali e cheratinociti intatti (Filardo et al, 2002; Kanda and Watanabe, 2003; Thomas et al., 2005) in seguito alla stimolazione delle membrane plasmatiche contenenti GPER ed estrogeni (Filardo et al., 2002). In terzo luogo, il pretrattamento di frazioni di membrana plasmatica contenenti GPER con la tossina del colera, che rilascia il recettore legato a $G\alpha_s$, è risultato in una riduzione del legame di estrogeni (Thomas et al., 2005), in linea con l'idea che Gs disaccoppiato comporta una minore affinità recettoriale.

E' stato riportato che GPER impiega un meccanismo dipendente dalla subunità proteica $G\beta\gamma$ nel promuovere la transattivazione estrogeno-mediata di EGFR per la segnalazione lungo l'asse di ERK (Filardo et al, 2000; Ding et al, 2009).

Non è stata dimostrata alcuna interazione fisica con $G\alpha_i/o$, ma dati collezionati da Leeb-Lundberg e colleghi hanno riportato che GPER forma un complesso tramite il suo motivo PDZ C-terminale con la proteina chinasi A-ancorante la proteina 5 (AKAP5) che porta all'inibizione della produzione di cAMP (Broselid et al., 2014).

GPER, come diverse GPCRs, mostra una localizzazione intracellulare in diversi tipi tissutali. Ne sono esempio l'epitelio ovarico e mammario normale, le linee cellulari tumorali mammarie, dell'endometrio e derivate (Filardo et al., 2007; Revankar et al., 2005, 2007; Filardo and Thomas, 2012; Prossnitz and Barton, 2014). Similmente, modelli predominanti di distribuzione intracellulare per GPER sono stati osservati

nelle cellule endoteliali della vena ombelicale umana (HUVECs) (Fredette et al., 2014), in cellule muscolari lisce vascolari (Meyer et al., 2014) nell'insulinoma e nelle cellule delle isole pancreatiche (Meyer et al., 2011a, b; Balhuizen et al., 2010). Diversi gruppi hanno mostrato che GPER è fortemente localizzato sulla membrana plasmatica dell'epitelio uterino (Gao et al., 2011), del miometrio (Maiti et al., 2011), renale (Lindsey et al., 2011; Cheng et al., 2011a, b, 2014), dei neuroni dell'ippocampo (Funakoshi et al., 2006; Akama et al., 2013) e degli ovociti di pesce (Pang et al., 2008; Peyton and Thomas, 2011).

Studi recenti hanno dimostrato cambiamenti quantitativi e qualitativi nell'espressione di GPER nella membrana plasmatica degli epitelii della corteccia renale durante il ciclo estrale (Cheng et al., 2014). Nelle fasi proliferative/follicolari, quando i livelli sierici di 17 β -estradiolo raggiungono il picco, GPER è sovraregolato negli epitelii corticali e localizzato sulla superficie basolaterale e ridistribuito intracellularmente durante l'estro. Al contrario, GPER è sottoregolato durante le fasi di secrezione/luteale dell'estro, quando le concentrazioni sieriche E2 declinano, con una significativa riduzione recettoriale sulla superficie degli epitelii renale e corticale (Cheng et al., 2014).

Analogamente, i progestinici aumentano la trascrizione di GPER nelle linee cellulari di cancro al seno umano (Ahola et al., 2002). Questi risultati sono coerenti con l'idea che i singoli tessuti del corpo possono modulare l'azione degli estrogeni via GPER, in risposta a fattori estrinseci (estrogeni disponibili o altri stimoli extracellulari, lesioni) ed eventualmente, a fattori intrinseci (genere, età) per determinare la sua relativa abbondanza nella membrana plasmatica.

L'espressione ectopica di GPER ha generato risultati contrastanti per quanto riguarda la sua distribuzione subcellulare e il sito d'azione (Filardo and Thomas, 2012). L'inclusione di grandi tag fluorescenti (circa 26 kDa di peptide contro 38 kDa di sequenza GPER) comporta il mantenimento di GPER nel reticolo endoplasmatico (Revankar et al., 2005; Funakoshi et al., 2006; Revankar et al., 2007), con poca o nessuna espressione osservabile sulla superficie cellulare. Al contrario, l'uso di piccoli tag di epitopo virale (inferiori ad 1 kDa di peptide) si traduce in piccole quantità di GPER rilevabili sulla superficie di cellule intatte (Funakoshi et al., 2006; Filardo et al., 2007; Pang et al., 2008; Sandèn et al., 2011; Akama et al., 2013; Tran et al., 2015). Una spiegazione probabile circa la ritenzione di GFP-GPER nel reticolo endoplasmatico è che i meccanismi di controllo dell'esportazione impiegati da GPCR, per impedire la presentazione di strutture recettoriali varianti sulla superficie

delle cellule possono più facilmente riconoscere GFP-GPER come proteine mal ripiegate o impropriamente glicosilate relative a GPER fuso ai piccoli tag virali e trattenerli all'interno del reticolo endoplasmatico per la modifica o la degradazione.

Utilizzando un approccio di frazionamento subcellulare e ligandi radiomarcati con H³-17β-estradiolo è stato dimostrato che il legame di GPER si limita a frazioni di membrana di ER-negative nelle cellule SKBR3 di tumore al seno umano (Thomas et al., 2005; Filardo et al., 2007).

Il pretrattamento delle cellule SKBR3 con progesterone ha portato ad una maggiore espressione di GPER nelle frazioni di membrana e ad un corrispondente aumento di 9 volte del legame con H³-17β-estradiolo (Thomas et al., 2005).

Pretrattamenti con la tossina colerica o con GTP-γS tiostere, riducono significativamente il legame con gli estrogeni suggerendo che il sito di legame è un recettore accoppiato a proteina G (Filardo et al., 2007).

Utilizzando una serie di composti ionici e non ionici sintetici derivati dal 17β-estradiolo in grado di legare GPER, è stato dimostrato che solo i derivati non carichi possono promuovere la mobilitazione di calcio intracellulare (Revankar et al., 2007). Questo risultato implica che GPER media segnali dalle membrane intracellulari ma non esclude la possibilità che i derivati polari degli estrogeni sintetici possano non riuscire a promuovere effetti dovuti al legame, in quanto non sono in grado di interagire con la tasca di legame di GPER.

L'idea che GPER medi una segnalazione endosomale è una possibilità interessante. L'espressione ectopica di GPER in cellule HEK-293 è risultata nell'endocitosi costitutiva, mediata da vescicole rivestite di clatrina, di GPER internalizzato entro 15 minuti in assenza dell'agonista con oltre il 50% della superficie etichettata (Cheng et al., 2011a, b). Anche Leeb-Lundberg e colleghi hanno riportato l'endocitosi costitutiva di tale recettore dalla membrana plasmatica di HEK-293 e da cellule MDCK (Sandèn et al., 2011). Il dominio PDZ codificato all'estremità C-terminale della coda citoplasmatica di GPER è stato implicato nel suo trattenimento a livello della membrana plasmatica di dette tipologie cellulari (Broselid et al, 2014; Tran et al., 2015) e nel reclutamento a livello delle spine dendritiche dei neuroni dell'ippocampo (Akama et al., 2013). Questi studi forniscono la prova che il dominio PDZ in GPER forma complessi recettoriali che possono influenzare la dimerizzazione del recettore, la segnalazione e l'endocitosi.

L'attivazione di ERK 1/2, dipendente da GPER, richiede la stimolazione dell'agonista e la sua cinetica di attivazione e successiva attenuazione è fortemente in

linea con il lasso di tempo dell'endocitosi mediata da GPER nelle cellule HEK-293, in contrasto con l'idea che l'endocitosi costitutiva ne amplifica l'attivazione mediata dal recettore.

L'attivazione promossa dal legame con il 17 β -estradiolo è rapida e sostenuta, con un livello di fosforilazione di ERK 1/2 di 8-10 volte maggiore rispetto ai livelli basali, e un picco di risposta 15 minuti dopo l'esposizione ad una concentrazione 1 nM di 17 β -estradiolo (Filardo et al., 2000). I livelli di attivazione di questo pathway declinano rapidamente dopo la stimolazione di GPER, ritornando a valori basali entro un'ora.

L'attivazione di ERK1/2 mediata da GPER è completamente inibita dal sequestro delle subunità G $\beta\gamma$ libere, mediante la sottomodulazione di proHB-EGF (fattore di crescita dell'epidermide legato all'eparina) alla superficie cellulare o dalla presenza di anticorpi neutralizzanti HB-EGF, sostenendo il concetto che ERK 1/2 viene attivato da un meccanismo dipendente dalla subunità G $\beta\gamma$ che determina il rilascio esterno alla membrana plasmatica di HB-EGF.

È interessante notare che le cellule HEK-293 esprimenti GPER mostrano livelli di cAMP fosforilato superiori ai livelli basali e, nelle cellule di cancro al seno, l'inibizione della proteina chinasi cAMP-dipendente prolunga l'attivazione di ERK 1/2 indotta da EGF, implicando che la segnalazione mediata da GPER non è costitutivamente attiva (Filardo et al., 2002).

1.4.2 Agonisti e antagonisti di GPER

In svariati sistemi il 17 β -estradiolo presenta un'affinità per ER α e ER β di circa 0,1-0,4 nM (Anstead et al., 1997; Kuiper et al., 1997; Bologna et al., 2006), mentre l'affinità misurata per GPER è di circa 10 volte inferiore, nel range di 3-6 nM (Revankar et al., 2005; Thomas et al., 2005). Estrone ed estriolo manifestano un'affinità per ER α di 0,3 e 1,4 nM, e per ER β di 0,4 e 0,7 nM rispettivamente, (Kuiper et al., 1997). Al contrario, GPER esibisce un'affinità di legame maggiore di 10 μ M e 1 μ M per estrone ed estriolo, rispettivamente (Thomas et al., 2005), ed è stata segnalata un'azione antagonista a bassa affinità dell'estriolo per GPER nel range di circa 1-10 μ M (Lappano et al., 2010). Ad ogni modo, poiché l'estrogeno è un piccolo ligando privo di flessibilità conformazionale e con siti di riconoscimento

stereospecifici limitati, si potrebbe ipotizzare che le due tipologie recettoriali, con nessuna omologia in struttura primaria o secondaria, possano legare uno spettro simile di composti strutturalmente correlati. I recettori per gli estrogeni classici mostrano una forte preferenza per l'isomero fisiologico degli estrogeni 17 β -estradiolo, rispetto al 17 α -estradiolo che, non solo è incapace di legare GPER (Thomas et al., 2005) ma induce una risposta al calcio a concentrazioni 1000 volte maggiori del 17 β -estradiolo (Revankar et al., 2005).

L'anti-estrogeno sintetico non steroideo tamoxifene (fig. 9) è il più noto tra i modulatori dei recettori selettivi per estrogeni (SERMs) (Ariazi et al., 2006). Presenta un'attività di antagonista/parziale agonista tessuto-dipendente rispetto alle azioni note degli estrogeni e si è dimostrato una terapia adiuvante ed efficace nel cancro al seno (Jordan, 2007). Il metabolita 4-idrossi rappresenta il ligando ad alta affinità per i recettori estrogenici mentre, l'estrogeno sintetico derivato, 7 α -sostituito, noto come ICI 182780, che si lega ad ER α con alta affinità, presenta un profilo anti-estrogenico (Ariazi et al., 2006). Studi di legame hanno dimostrato che tamoxifene (SERM) e ICI 182,780 (SERD) mostrano un legame significativo con GPER (Thomas et al., 2005), fungendo da agonisti (Filardo et al., 2000; Revankar et al., 2005) con un'affinità di legame di circa 30 nM per ICI 182,780 (Thomas and Dong, 2006). Sebbene l'effetto biologico di questi composti sia stato interpretato principalmente attraverso risposte genomiche derivanti dalle loro interazioni con i recettori nucleari classici, vi è una crescente evidenza di effetti di signaling cellulare non genomici in vari tipi di cellule e tessuti.

Una moltitudine di composti chimici, compresi i fitoestrogeni naturali e gli xenoestrogeni artificiali sono noti per mimare gli effetti biologici degli estrogeni sia nell'essere umano che negli animali.

Tra i fitoestrogeni, l'isoflavone fenolico genisteina presente nei prodotti a base di soia, mostra un'elevata affinità di legame e selettività per ER β e altrettanto significativa verso GPER (Maggiolini et al., 2004; Thomas and Dong, 2006). La genisteina e il relativo flavonoide quercetina, sembrerebbero mediare la sovraregolazione di c-fos GPER-dipendente e la fosforilazione di ERK nelle cellule di cancro al seno (Maggiolini et al., 2004), e la proliferazione delle cellule del cancro alla tiroide (Vivacqua et al., 2006) tramite GPER. Sono inoltre inclusi, in tali processi, l'azione del resveratrolo, dell'oleuropeina e dell'idrossitirosolo (Chimento et al., 2013).

Gli esseri umani sono esposti a molteplici xenoestrogeni, dai precursori sintetici della plastica ai pesticidi (Singleton and Khan, 2003). Gli xenoestrogeni alogenati come p,p'-DDT, orto, para-diclorodifenildicloroetilene (o,p' -DDE) e kepone mostrano una bassa ma significativa affinità per GPER e agiscono da agonisti (Thomas et al., 2005; Thomas and Dong, 2006). Studi di legame, rivelano che anche un certo numero di xenoestrogeni fenolici, compresi bisfenolo A (BPA) e nonilfenolo presentano affinità per GPER (Albanito et al., 2008). Pesticidi come metoxicloro e atrazina hanno dimostrato una limitata capacità di legame per GPER (Thomas and Dong, 2006): l'atrazina induce l'espressione di *c-fos* GPER-dipendente nelle cellule di cancro al seno e produce effetti proliferativi nelle cellule di cancro ovarico in presenza sia di ER α che GPER (Albanito et al., 2008).

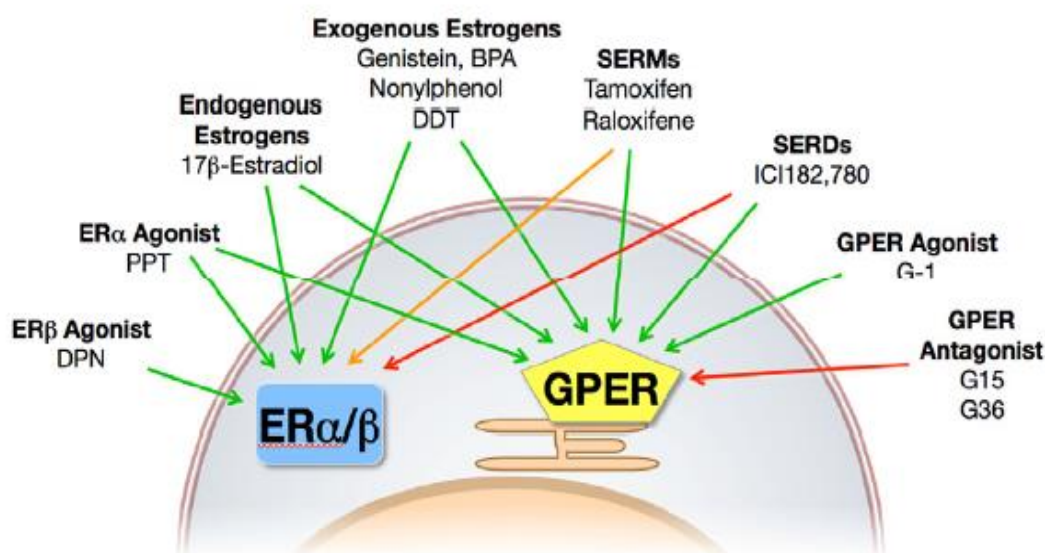


Figura 9: Ligandi di GPER e ERs (Prossnitz and Barton, 2014).

È importante sottolineare che all'interno della famiglia degli steroidi, il legame degli estrogeni con GPER presenta un'elevata selettività, circa 1000 volte superiore a testosterone, cortisolo e progesterone (Thomas et al., 2005) e alcuni studi hanno suggerito come requisito come requisito l'espressione di GPER in alcune azioni rapide dell'aldosterone (Ding et al., 2009).

Nel 2006 è stato identificato un composto non steroideo, denominato G-1, mediante la combinazione tra screening virtuale e screening biomolecolare di GPER (Bologna et al., 2006). Studi di legame hanno dimostrato un'affinità di legame di G-1 per GPER di circa 11 nM, a fronte di 6 nM per gli estrogeni. Non è stata riportata affinità di legame dell'agonista G-1 per ER α o ER β fino a concentrazioni pari a 10 μ M. La

sua caratterizzazione funzionale ha dimostrato un'attivazione GPER-dipendente della mobilitazione di calcio e dell'attivazione di PI3K indipendentemente dall'attivazione o dall'inibizione dei recettori classici. Dalla sua scoperta, G-1 è stato utilizzato in un vasto numero di studi per comprendere il ruolo del GPER in numerosi sistemi tra cui quello nervoso, immunitario, riproduttivo e sistemi vascolari.

Per complementare l'attività dell'agonista G-1, è stato recentemente identificato un antagonista strutturalmente correlato, ovvero G-15, che ha facilitato lo studio del ruolo di GPER nel sistema riproduttivo e nervoso (Dennis et al., 2009).

Come risultato di bassi livelli di attività verso ER α e ER β a concentrazioni di circa 10 μ M, è stato sintetizzato un derivato, G-36, antagonista di GPER che inibisce selettivamente la mobilitazione di calcio e l'attivazione estrogeno-mediata di PI3K da parte di GPER, ma non da parte di ER α , ripristinando l'ingombro sterico di G-1 (Dennis et al., 2011).

È stato descritto come antagonista sia di ER α che di GPER il composto MIBE (etil 3-[5-(2-etossicarbonil-1-metilvinilossio)-1-metil-1H-indol-3-il]but-2-enoato), anche se l'affinità per entrambi i recettori è superiore a 10 μ M (Lappano et al., 2012b). Due ulteriori composti, GPER-L1 e GPER-L2 sono stati segnalati in qualità di agonisti selettivi di GPER, con un'affinità di legame di circa 100 nM (Lappano et al., 2012a). È interessante notare che il noto agonista selettivo per ER α (410 volte rispetto a ER β) PPT, è stato recentemente dimostrato essere capace di agire come agonista di GPER a concentrazioni di 10-100 nM, mentre l'agonista selettivo di ER β , DPN, non sembrerebbe mostrare alcuna corrispondente attività verso GPER fino a concentrazioni di 10 μ M (Petrie et al., 2013).

Sebbene la sequenza aminoacidica di GPER presenti omologia rispetto alla sottofamiglia delle GPCR dei recettori della chemochina (Owman et al, 1996; Feng and Gregor, 1997), i primi studi non hanno dimostrato alcuna attivazione in risposta alle chemochine (owman et al., 1996).

Prove successive suggeriscono che la chemochina CCL-18 modula l'attività di GPER, forse attraverso un legame diretto (Feng and Gregor, 1997) e agendo come un inibitore endogeno (Dripps et al., 1991).

1.4.3 Meccanismo di segnalazione mediato da GPER

L'espressione di GPER può essere rilevata nei tessuti tumorali maligni, dove è sovraespresso in alcune cellule del cancro al seno e del carcinoma dell'endometrio "ad alto rischio" (Filardo et al., 2006; Smith et al., 2007), ma la sua attivazione può anche inibire la crescita di alcuni tipi di cellule del cancro al seno (Kleuser et al., 2008). I prodotti della trascrizione di GPER sono ampiamente distribuiti nei tessuti umani, compreso il cervello, il fegato, l'apparato riproduttivo maschile e femminile. Sono stati recentemente riportati alti livelli dell'espressione di GPER nelle cellule muscolari lisce arteriose e nelle arterie intatte di pazienti affetti da aterosclerosi coronarica (Haas et al., 2007).

Studi condotti sui cardiomiociti hanno suggerito che la segnalazione estrogenica comporta percorsi che necessitano dei classici recettori estrogenici ma anche ER-indipendenti (Ullrich et al., 2008). Questa osservazione è sostenuta dalla scoperta che l'attivazione di GPER mediata da ICI 182,780 (tamoxifene), inibisce la crescita dei cardiomiociti e dei fibroblasti (Mercier et al., 2003).

È stato suggerito un potenziale ruolo di GPER nella suscettibilità all'ipertensione in condizioni di bassi livelli di renina (Lafferty et al., 2000), ma resta da chiarire la sua azione nell'omeostasi vascolare.

Da una serie di esperimenti condotti sul suo ruolo nelle cellule vascolari, nei roditori e negli esseri umani *in vitro* e *in vivo* (Haas et al., 2009), utilizzando ligandi selettivi di GPER, è stato dimostrato che questo recettore effettivamente controlla il tono vascolare direttamente e indirettamente, promuovendo la vasodilatazione e inibendo la crescita cellulare. L'iniezione di G-1, infatti, nei ratti normotesi è stata associata ad una marcata riduzione della pressione arteriosa.

L'andamento temporale delle variazioni del calcio intracellulare nelle cellule muscolari lisce vascolari umane dipende dalla modalità di applicazione, extracellulare o intracellulare dell'agonista: quest'ultima causa risposte molto più veloci circa l'aumento di calcio (Haas et al., 2009), dati coerenti con l'idea che GPER è un recettore intracellulare accoppiato a proteina G, in linea con la sua localizzazione sul reticolo endoplasmatico (Prossnitz et al., 2008).

La stimolazione acuta con G-1, di cellule umane muscolari lisce della vascolatura, prive di ER α e ER β , aumenta la fosforilazione di MAPK (Haas et al., 2009).

L'attivazione selettiva di tale recettore, utilizzando diversi agonisti, ne inibisce potentemente anche la crescita, in modo coerente con i potenti effetti inibitori del tamoxifene della crescita nei cardiomiociti di ratto e nei fibroblasti (Mercier et al., 2003).

E' stato scoperto che la carenza di GPER e, quindi, dei suoi effetti, è associata ad una marcata obesità addominale nei topi sia maschi che femmina, indicando che la segnalazione estrogenica mediata da questo recettore contribuisce alla funzione degli adipociti e metabolica in modo indipendente dal genere. Anche l'alterazione della tolleranza al glucosio, in assenza di un fenotipo obeso, è stata collegata alla carenza di GPER (Mårtensson et al., 2009) che, nel complesso, è un importante regolatore del tono, della muscolatura liscia vascolare, della crescita cellulare e dell'obesità, risultati forse rilevanti per gli effetti di protezione vascolare degli estrogeni negli esseri umani, nonché nella terapia ormonale.

In uno dei primi studi sull'attivazione di ERK dipendente da GPER, Filardo e collaboratori hanno dimostrato che questo processo avviene attraverso la transattivazione di EGFR (Filardo et al., 2000). Il pathway (fig.10) coinvolge l'attivazione mediata da recettore di una proteina G, sensibile alla tossina della pertosse, l'attivazione mediata da $G\beta\gamma$ di Src e la fosforilazione di Shc, risultando nel rilascio di HB-EGF mediato dalle metalloproteinasi della matrice e la transattivazione di EGFR.

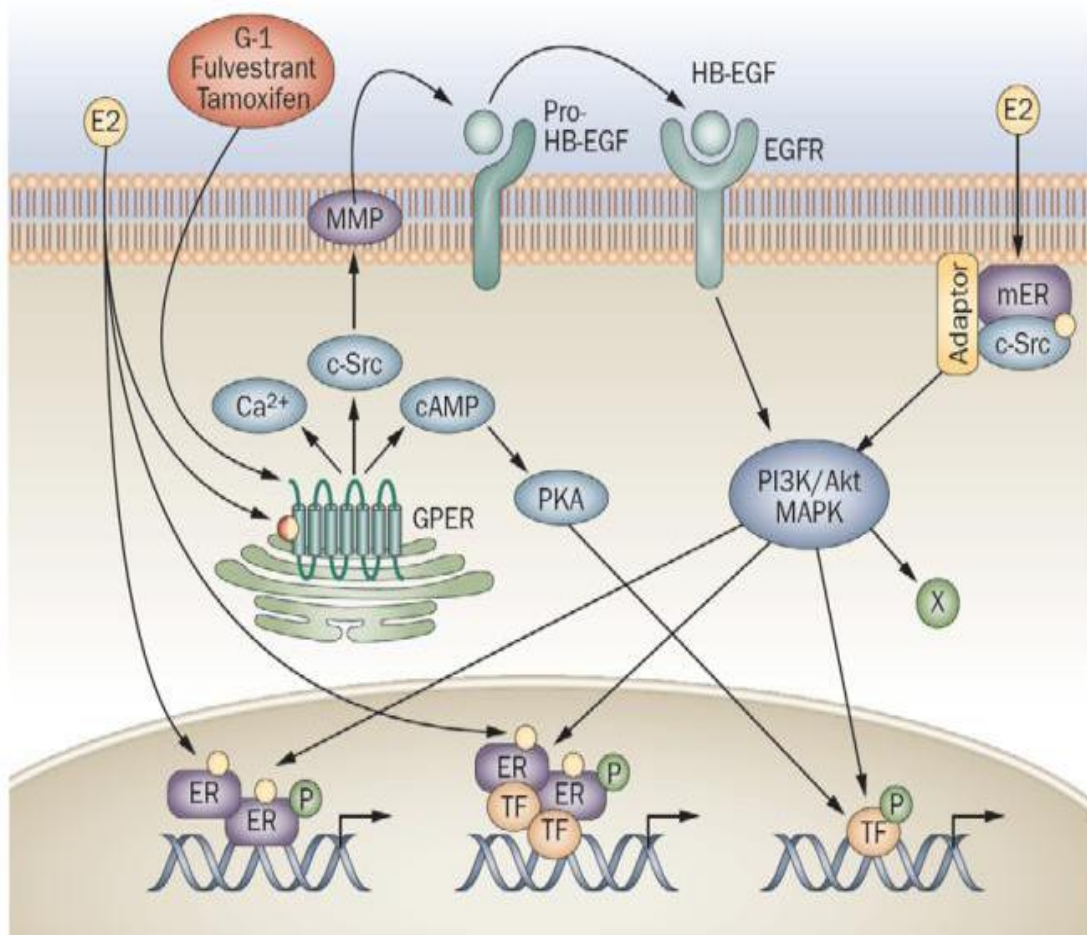


Figura 10 : Signaling avviato da GPER e ERs (Prossnitz and Barton, 2014).

Altri studi hanno riferito la transattivazione di EGFR mediata da ER α (Razandi et al., 2003).

Per confrontare direttamente la capacità di segnalazione di ER α e GPER sono state utilizzate cellule COS7 transfettate con ciascun recettore ed è stato valutato il signaling cellulare di PI3K (Revankar et al., 2005). La stimolazione estrogenica di cellule che esprimono entrambi i recettori, infatti, ne stimola l'attivazione che risulta bloccata dal suo inibitore, LY294002, rivelando quindi che ER α e GPER sono capaci di mediare questa risposta. Il 4-idrossitamoxifene provoca l'attivazione di PI3K nelle cellule che esprimono GPER ma non in quelle esprimenti ER α . Infine, l'inibitore di EGFR, AG1478, blocca solo l'attivazione di PI3K mediata da GPER ma non da ER α , dimostrando la possibilità di due diversi pathways in base al recettore utilizzato.

In aggiunta, GPER attiva eNOS per produrre NO nella vascolatura (Meyer et al., 2012a; Lindsey et al., 2014) e media la regolazione dei canali del potassio (Yu et al., 2011; Dong et al., 2013).

E' stato proposto anche un ruolo per la sfingosina 1 fosfato prodotta dalla sfingosina chinasi come intermedio nella transattivazione estrogenica di EGFR effettuata da GPER (Sukocheva et al., 2006).

Il primo aumento di cAMP mediato dagli estrogeni nell'utero di ratto (Szego and Davis, 1967) è stato associato alla regolazione genica. È stato anche notato un rapido aumento dei livelli di cAMP dopo la stimolazione estrogenica delle arterie coronarie umane (Mugge et al., 1993), l'attivazione della PKA (Zucchetti et al., 2013), l'attivazione trascrizionale di CREB (Kanda and Watanabe, 2004). La generazione di cAMP comporta l'attenuazione dell'attività di MAPK da parte degli estrogeni attraverso la stimolazione di adenilato ciclastasi GPER-dipendente che successivamente inattiva Raf-1. I risultati hanno suggerito un pathway in cui gli estrogeni prima stimolano e poi attenuano l'attività MAPK attraverso un singolo GPCR, GPER, tramite due distinte vie di segnalazione proteina G dipendente con effetti opposti sugli eventi di segnalazione a monte, che portano all'attivazione di MAPK. Anche numerosi fito e xenoestrogeni possono stimolare la produzione di cAMP tramite GPER (Thomas et al., 2005; Thomas and Dong, 2006).

Nella mobilitazione di calcio intracellulare mediata da GPER solo i derivati estrogenici permeabili alle membrane potrebbero mediare una risposta rapida del calcio (Revankar et al., 2007). L'attivazione di GPER da parte di G-1 nella muscolatura liscia vascolare dell'aorta umana inibisce la successiva variazione di calcio intracellulare indotta dalla vasocostrizione (Haas et al., 2009).

Sebbene ER α , e in qualche modo ER β , siano quasi esclusivamente associati alle risposte trascrizionali degli estrogeni, anche gli eventi della segnalazione rapida promossi da GPER regolano l'espressione genica (Prossnitz and Maggiolini, 2009 (a)), come la sovraregolazione del gene *c-fos* (e di altri geni) nei macrofagi (Kanda and Watanabe, 2003), della ciclina D2 e Bcl-2 nei cheratinociti (Kanda and Watanabe, 2003-2004) e del VEGF (De Francesco et al., 2013, 2014).

Gli estrogeni e il tamoxifene inducono l'espressione di *c-fos* attraverso il GPER nella tiroide e nelle cellule tumorali dell'endometrio con conseguente proliferazione (Vivacqua et al., 2006). Nelle cellule tumorali ovariche, G-1, così come l'estradiolo, sovraregola diversi geni responsivi agli estrogeni tra cui *c-fos*, pS2 e le cicline A, D1

ed E. Tuttavia, G-1 non è in grado di indurre la trascrizione del recettore del progesterone, che è un noto target primario di ER α (Albanito et al., 2007).

Circa il 25% di tutti i geni regolati dagli estrogeni sono indotti indipendentemente dal reclutamento di ER α da elementi di risposta degli estrogeni (Madak-Erdogan et al., 2008). Inoltre, gli anti-estrogeni o ER α knockdown, nonché l'inibizione di MAPK e della chinasi c-Src, impediscono la sovraregolazione di questi geni.

La stimolazione sia con gli estrogeni che con il tamoxifene determina la marcata induzione di una serie di geni, compresi quelli per il fattore di crescita del tessuto connettivo (CTGF), EGR1, ATF3, FOS, TNF e molti altri. La secrezione di CTGF mediata da GPER contribuisce alla proliferazione e alla migrazione cellulare e CTGF viene indotto anche dal tamoxifene nei fibroblasti ottenuti da biopsie di tumori al seno.

1.4.4 Interazione di GPER con altri recettori

La co-espressione di ER α e ER β con GPER suggerisce la possibilità d'interazione tra questi recettori e le loro vie di segnalazione (Prossnitz and Barton, 2011).

Esiste un cross-talk funzionale in cui è richiesta l'espressione di GPER nell'attività estrogeno mediata delle cellule tumorali (Albanito et al., 2007) e nell'inibizione delle funzioni delle cellule epiteliali uterine mediata da ER α (Gao et al., 2011).

L'interazione funzionale tra ER α e GPER risulta evidente anche da studi vascolari funzionali condotti sull'arteria coronaria suina, dove è stata osservata una vasodilatazione acuta NO-dipendente solo con agonisti selettivi per ER α come PPT, completamente abolita quando ER α , ER β e GPER vengono attivati contemporaneamente dagli estrogeni (Traupe et al., 2007).

Secondo Mauvais-Jarvis e colleghi (Tiano et al., 2011), gli effetti protettivi degli estrogeni sulle isole pancreatiche sono comparabili e indipendenti dall'attivazione selettiva di ER α , ER β o GPER. Pertanto, il cross-talk esistente tra i recettori degli estrogeni e GPER e, eventualmente, altri recettori steroidei, deve essere tenuto in considerazione nel valutare possibili azioni patogene e terapeutiche relative all'attivazione o all'inibizione dei recettori degli estrogeni (Barton, 2012).

Sia il cross-talk recettoriale che la ridondanza funzionale sono importanti ai fini della comprensione delle azioni dei farmaci destinati a uno o più recettori per gli estrogeni.

ER α -36, una variante di splicing di ER α umana localizzata sulla membrana è stata identificata nelle cellule di cancro al seno come un effettore dominante negativo, della lunghezza di ER α (Wang et al., 2005) ed è stato anche proposto come un effettore della segnalazione GPER-dipendente (Wang et al., 2005; 2006). In relazione alla sua funzione, Lindsey e colleghi hanno suggerito gli effetti renoprotettivi di G-1, ma non hanno rilevato ER α -36 laddove, invece, ER α -46 e ER α -66 risultano abbondantemente espressi (Lindsey et al., 2011) mancando, così, dati *in vivo* circa il ruolo diretto di ER α -36 nel mediare gli effetti di GPER.

La segnalazione rapida dipendente da questa variante di splicing di ER α è attivata anche dall'estrone, dal 17 α -estradiolo, dall'estriolo e dall'estetrolo e l'attivazione di ERK1/2 indotta dagli estrogeni è ulteriormente potenziata dagli agonisti di GPER, ICI e tamoxifene (Wang et al., 2006).

Anche il recettore estrogenico nucleare orfano correlato a ER α , ERR α , è stato implicato nella segnalazione mediata da GPER così come la sua attivazione causa la trascrizione della sintesi proteica di ERR α e regola gli effetti a valle e la proliferazione cellulare mediati dallo stesso ERR α (Li et al., 2010).

I glucocorticoidi sono importanti regolatori dell'energia e del metabolismo osseo (Tisdale, 2002; Meyer et al., 2011a) nel cui mantenimento è stato suggerito anche un ruolo per GPER, poiché la sua attivazione riduce l'assunzione di cibo (Washburn et al., 2013) e stimola la secrezione di insulina (Sharma and Prossnitz, 2011), mentre topi GPER deficienti manifestano obesità e insulino-resistenza (Haas et al., 2009; Ford et al., 2011; Meyer et al., 2011a; Sharma et al., 2013). E' stato anche dimostrato che GPER regola negativamente l'attività trascrizionale dei recettori dei glucocorticoidi (Ylikomi et al., 2004) influenzando indirettamente, quindi, il metabolismo energetico, l'energia omeostatica complessiva e il peso corporeo attraverso l'attività di tali recettori.

L'aldosterone, un potente vasocostrittore e mitogeno sintetizzato dalla ghiandola surrenale e dalle cellule muscolari lisce vascolari (Matsuzawa et al., 2013), sembrerebbe agire attraverso GPER per compiere determinate funzioni (Gros et al, 2011; Gros et al, 2013). Sebbene non leghi GPER (Cheng et al., 2013), escludendo che sia un suo recettore, è possibile che, analogamente a quanto riportato per i recettori degli estrogeni, vi sia un cross-talk funzionale con i recettori dei mineralcorticoidi (MR).

Alcuni studiosi hanno ipotizzato il contributo di GPER nel potenziamento della contrazione mediata dall'aldosterone; tuttavia, i dati presentati non hanno mostrato

effetti significativi all'antagonista recettoriale G-15 (Batenburg et al., 2012). L'aldosterone potrebbe fungere da ligando per GPER, evidenziando anche meccanismi alternativi e recettori con cui esso media i suoi effetti rapidi (Wendler and Wehling, 2012-2011; Krug et al., 2011; Osanai et al., 2011) ma ad oggi non è stato riportato nessun legame e l'attivazione del GPER, così com'è stato dimostrato da diversi laboratori, indurrebbe vasodilatazione (Lindsey and Chappell, 2011; Meyer et al., 2011) e abbasserebbe la pressione sanguigna nei modelli animali di ipertensione arteriosa (Lindsey and Chappell, 2011).

Sia l'eliminazione vascolare del MR (McCurley et al, 2012; Schiffrin 2013; Pruthi et al, 2014) che l'attivazione farmacologica di GPER (Haas et al., 2009) riducono la pressione sanguigna, mentre diversi studi riportano l'effetto vasocostrittore dell'aldosterone, che incrementa la pressione sanguigna.

Infine, poiché l'aldosterone viene prodotto tramite un meccanismo dipendente dal recettore AT1 (Volpe et al., 1997), l'effetto inibitorio dell'attivazione di GPER sull'espressione del recettore AT1 (Koganti et al., 2013) può rappresentare un nuovo meccanismo d'interazione tra l'aldosterone e GPER .

GPER è espresso nelle ossa umane (Heino et al., 2008) e ne regola la crescita (Heino et al, 2008; Ford et al, 2011; Ren e Wu, 2012). La vitamina D (coleciferolo) mantiene la funzionalità del midollo e la crescita attraverso l'attivazione dell'omonimo recettore (VDR) (Norman and Powell, 2014). La sua interazione con GPER, dipendente dall'infiammazione, è stata suggerita dagli effetti inibitori estrogenici della vitamina D sull'encefalite autoimmune, un modello animale di sclerosi multipla, in cui l'effetto della vitamina D è completamente abolito nei topi femmina privi di GPER (Subramanian et al., 2012). Le interazioni GPER/VDR sembrano essere coinvolte negli effetti benefici della vitamina D sulla struttura ossea nelle donne in postmenopausa e dipendono dagli estrogeni (Durusu Tanriover et al., 2010).

Nelle ovaie, la funzione di GPER dipende dalla GPCR transmembrana, che media gli effetti dell'ormone luteinizzante, una glicoproteina eterodimerica che condivide la stessa subunità α con FSH, TSH, TSH e hCG (Dufau, 1998). E' stato dimostrato che l'ormone luteinizzante regola l'espressione di GPER a livello dell'mRNA e proteico nelle cellule umane della granulosa (Pavlik et al., 2011). Sono state riportate interazioni e cross-talk tra GPER e i recettori per i fattori di crescita, in particolare EGFR e IGFR (Bartella et al., 2012; Lappano et al, 2013).

1.4.5 Funzione di GPER nel sistema cardiovascolare e nella regolazione del tono

Studi sulla fisiologia vascolare di GPER ne dimostrano il ruolo nella regolazione del tono vascolare e nella protezione in seguito a danno da riperfusione miocardica (Meyer et al., 2011b; Chakrabarti et al., 2013; Han et al., 2013; Holm and Nilsson, 2013). Oltre alle linee cellulari tumorali, GPER è stato clonato da cellule endoteliali vascolari umane esposte a shear stress (Owman et al., 1996; Takada et al., 1997; O'Dowd et al., 1998) responsabile dell'aumento della formazione del potente vasodilatatore NO (Kim et al., 2008; Haynes et al., 2002).

Numerosi laboratori hanno dimostrato che l'attivazione di GPER in diversi distretti vascolari e specie induce vasodilatazione attraverso meccanismi mediati da NO, endotelio-dipendenti, i cui effetti sono bloccati dalla denudazione endoteliale o da inibitori della NOS, come L-NAME (Meyer et al., 2010; Broughton et al., 2010; Lindsey et al., 2009).

Lo shear stress è un forte induttore dell'espressione di tale enzima, suggerendo che la funzione di GPER potrebbe essere collegata alla via L-arginina/NO (Meyer et al., 2011b).

Almeno nei roditori, questo effetto dipendente dall'endotelio può essere osservato sia nei maschi che nelle femmine (Broughton et al., 2010), concludendo che le concentrazioni estrogeniche non sono determinanti nella reattività vascolare correlata all'attivazione di GPER. SERMs come il raloxifene (Abdelhamid et al., 2011) o SERDs come ICI 182,780, essendo agonisti di GPER esercitano effetti simili sul tono vascolare e sulla pressione arteriosa (Meyer et al., 2010), tuttavia, l'ipotensione arteriosa è un effetto collaterale frequente nei pazienti trattati con fulvestrant/Faslodex (ICI 182, 780) (Meyer et al., 2010). Dati ottenuti da topi maschi GPER⁰ indicano che GPER endogeno non solo aumenta il tono vasodilatatore, simultaneamente alla bioattività di NO, ma inibendo anche l'attività di prostanoidi ad azione vasocostrittoria, derivanti dalla ciclossigenasi endoteliale (Meyer et al., 2012). Similmente all'inattivazione cronica dovuta alla delezione del gene GPER, anche l'inibizione farmacologica acuta degli antagonisti G-15 (Dennis et al., 2009) o G-36 (Dennis et al., 2011) aumenta la vasocostrizione (Meyer et al., 2012). Mentre l'attivazione estradiolo mediata di ER α e ER β promuove la proliferazione cellulare endoteliale, l'angiogenesi e la guarigione delle ferite, l'attivazione di GPER

mediante G-1 o ICI 182,780 inibisce potentemente la proliferazione delle cellule endoteliali, sebbene in misura diversa a seconda del letto vascolare e del tipo di cellule endoteliali in esame (Holm et al., 2010).

GPER suscita effetti anche sulle cellule muscolari lisce vascolari, importanti nello sviluppo dell'aterosclerosi (Ross and Glomset, 1973) e fondamentali nell'elevata resistenza vascolare nell'ipertensione arteriosa (Schiffrin and Role, 2001). Sia le arterie umane intatte che le cellule muscolari lisce isolate esprimono GPER, e la sua attivazione inibisce la crescita cellulare (Meyer et al., 2009; Haas et al., 2009; 2007). In uno studio comparativo condotto su cellule muscolari lisce di ratto, GPER è risultato essere altamente e similmente abbondante in maschi e femmine, con un'espressione di gran lunga superiore a ER β (Ma et al., 2011). L'attivazione selettiva di GPER induce una vasodilatazione acuta attraverso il rilassamento della muscolatura liscia vascolare, cosa che non si verifica nei topi GPER⁰ (Haas et al., 2009). Inoltre, inibisce la vasocostrizione coronarica indotta dall'endotelina-1 (Meyer et al., 2010) e dati provenienti da studi sulle arterie carotidi pressurizzate di topo suggeriscono che GPER endogeno interferisce con la vasocostrizione indotta dall'endotelina-1 in condizioni basali (Meyer et al., 2012) attenuando il conseguente aumento delle concentrazioni di calcio vascolare.

Sia nell'insufficienza cerebrovascolare che renale acuta, la protezione estrogeno mediata è in parte dovuta a GPER, sia nei maschi che nelle femmine (Hutchens et al., 2012; Murata et al., 2013). Nelle arterie di resistenza mesenteriche, che dilatano in parte secondo un meccanismo di iperpolarizzazione endotelio-dipendente, le risposte vasodilatatorie mediate da GPER coinvolgono l'NO endoteliale (Lindsey et al., 2013b). GPER è stato identificato anche come un regolatore inibitorio delle proteine pro-infiammatorie nelle cellule endoteliali (Chakrabarti and Davidge, 2012): il trattamento cronico con G-1 migliora, infatti, la vasomotilità endotelio dipendente in condizioni di malattia associata a infiammazione vascolare, come nel diabete mellito (Li et al., 2012).

Gli effetti non genomici rapidi degli estrogeni nelle arterie coronarie e mammarie interne umane di pazienti di sesso maschile e femminile (Mugge et al., 1993; Haas et al., 2007), suggeriscono un possibile ruolo di GPER nella regolazione della funzione vascolare e d'organo nei maschi.

La mancanza d'ipertensione nei topi GPER knockout suggerisce meccanismi controregolatori che facilitano la vasodilatazione, probabilmente coinvolgimento

effetti centrali (Brailoiu et al., 2012), cardiaci, renali o modulanti le risposte del sistema nervoso autonomo.

Gli effetti ateroprotettivi di GPER endogeno, interferiscono con l'adipogenesi, l'infiammazione e la dislipidemia, fattori chiave implicati nell'aterogenesi (Barton, 2013), come è risultato nei topi maschi GPER deficienti (Sharma et al., 2013). Il silenziamento di GPER non solo è causa di obesità viscerale, ma anche della formazione di tessuto adiposo perivascolare (Meyer et al., 2013).

Diversi fattori sembrano influenzare la funzione vascolare di GPER. L'invecchiamento nei ratti normotesi e ipertesi si traduce in una sottoregolazione di GPER sia nei maschi che nelle femmine, ed è associato ad un ridotto rilassamento in risposta a G-1 o E2 (Lindsey et al., 2013a).

Gli agonisti selettivi dei recettori estrogenici mostrano una marcata eterogeneità nelle arterie dei roditori di sesso femminile, poiché alcuni vasi rispondono in maniera trascurabile mentre altri mostrano un rilassamento rapido in risposta all'attivazione di ER o GPER (Reslan et al., 2013), come è stato recentemente riportato nelle arterie uterine umane e placentari (Corcoran et al., 2013).

L'attivazione di GPER ha effetti protettivi sul cuore, in quanto migliora la funzione diastolica, il rimodellamento del ventricolo sinistro nei ratti ipertesi (Wang et al., 2012) e la funzione cardiaca nel modello di infarto indotto dall'isoproterenolo (Kang et al., 2012). Infine, le risposte al trattamento con G-1 possono mostrare un dimorfismo sessuale, come recentemente riportato in un modello di ictus (Broughton et al., 2014) e genetico di ipertrofia cardiaca e fibrosi (Lenhart et al., 2013).

1.4.6 Ruolo di GPER nella vascolatura

Studi condotti nei ratti di sesso femminile mRen2.Lewis, un modello di ipertensione dipendente dall'angiotensina II e dagli estrogeni, hanno rivelato che l'attivazione cronica di GPER indotta dagli estrogeni riduce notevolmente la pressione sanguigna nelle femmine ovariectomizzate attenuando la segnalazione dell'Ang II (Lindsey et al., 2009). Le misure della vasodilatazione acuta all'agonista selettivo di GPER, G-1, e al 17 β -estradiolo (10^{-9} - $10^{-5.5}$ M) negli anelli aortici isolati e nelle arterie mesenteriche precontratte (con fenilefrina) di tale modello, hanno riportato un rilassamento maggiore nei vasi mesenterici rispetto all'aorta sia in risposta a G-1 che

all'estradiolo (Lindsey et al., 2011b). Tali effetti sono entrambi attenuati dall'antagonista G-15, tuttavia, la risposta vasocostrittoria al solo antagonista recettoriale non è risultata evidente nei vasi mesenterici, riflettendo forse, un livello inferiore di sintesi dell'estradiolo in questi vasi. La rimozione dell'endotelio e il pretrattamento con L-NAME attenua parzialmente la vasodilatazione.

La similarità tra i due agonisti di indurre la vasodilatazione e la capacità di G-15 di attenuare entrambe le risposte vasodilatatorie suggeriscono che GPER è un mediatore primario del rilassamento agli estrogeni in questo modello d'ipertensione (Lindsey et al., 2011b).

In particolare, la vasodilatazione in risposta a G-1 e all'estradiolo nelle arterie mesenteriche è risultata da entrambe le componenti endotelio dipendente e non dipendente, riflettendo la localizzazione di GPER nelle cellule endoteliali e muscolari lisce e supportando l'ipotesi che il rilassamento indotto dall'estradiolo, nei vasi di conduzione e di resistenza di femmine mRen2.Lewis è mediato da GPER e la risposta vasodilatatoria diretta di G-1 nei vasi di resistenza costituisce un meccanismo di riduzione della pressione arteriosa (Lindsey et al., 2011b).

G-1, non diminuisce la pressione arteriosa nei ratti mRen2.Lewis maschi, implicando differenze legate al sesso nell'espressione vascolare di GPER.

Nel lavoro del 2009 condotto da Lindsey e collaboratori sul medesimo modello animale ovariectomizzato, è stata riportata una riduzione dell'ACE e dell'mRNA codificante per il recettore AT1, in contrapposizione all'aumento dell'mRNA dell'enzima ACE2 negli anelli aortici, in seguito alla somministrazione *in vivo* di G-1. Questo trattamento non è stato associato alle alterazioni dell'espressione di eNOS e del rilassamento indotto dall'acetilcolina (Lindsey et al., 2009).

Isensee e colleghi hanno riportato che nelle piccole arterie sistemiche GPER è localizzato nelle cellule endoteliali, ma solo nella muscolatura liscia vascolare nei vasi cerebrali (Isensee et al., 2009).

L'immunoreattività di GPER è stata dimostrata nell'endotelio vascolare e nelle cellule muscolari lisce dell'aorta toracica, della carotide e delle arterie cerebrali medie in ratti Sprague-Dawley di entrambi i sessi (Broughton et al., 2010). In questo studio sulle carotidi di entrambi i sessi, G-1 effettua una leggera ma significativa azione vasorilassante, concentrazione-dipendente, senza differenze legate al genere, a concentrazioni pari a 10 nM che potrebbe riflettere una segnalazione più efficiente dei recettori accoppiati a proteine G o una maggiore affinità di legame da parte di GPER. Anche in tal caso l'effetto è risultato abolito in seguito alla rimozione

dell'endotelio e ridotto dall'inibitore dell'eNOS, L-NAME, suggerendo un'azione vasorilassante dipendente dalla produzione di NO endoteliale (Broughton et al., 2010).

Studi addizionali hanno mostrato che il pretrattamento con G-1 riduce significativamente la contrazione mediata da U-46619 nelle arterie endotelio-intatte, ma non in quelle denudate.

Questo lascia ipotizzare che GPER localizzato nelle cellule muscolari lisce non contribuisca alla regolazione del tono vascolare (Broughton et al., 2010).

Inoltre, in questi vasi, G-1 riduce i livelli vascolari di superossido, probabilmente mediante l'inattivazione diretta piuttosto che l'inibizione enzimatica mediata da GPER (Broughton et al., 2010).

Anche nelle arterie coronarie dell'epicardio di maiale GPER ha un'azione vasodilatante (Meyer et al., 2010). E' stato dimostrato, infatti, che l'attivazione di GPER mediata da ICI 182,780, in concomitanza al blocco dei recettori estrogenici nucleari classici ha effetti dilatatori simili a G-1 (Bologa et al., 2006). In questi vasi, la contrazione con endotelina-1 è inibita in modo analogo da entrambi gli agonisti di GPER, ICI 182,780 e G-1, a differenza della contrazione con la serotonina che risulta, invece, inalterata (Meyer et al., 2010). In questo caso, è interessante notare che la contrazione in risposta alla serotonina è risultata molto più debole rispetto a quella indotta dall'endotelina-1. Di contro, nelle arterie mammarie e carotidi di topo l'attivazione di GPER inibisce la contrazione mediata dalla serotonina (Haas et al., 2009), probabilmente per ragioni anatomiche o relative alla specie in esame.

Questi dati, oltre a dimostrare gli effetti vasodilatatori coronarici sostengono il ruolo di GPER nella regolazione del tono vascolare in modo indipendente da ER α e ER β (Meyer et al., 2010).

Nelle arterie cerebrali centrali isolate da ratti Sprague Dawley, sono stati indagati *ex vivo* gli effetti acuti in risposta al 17 β -estradiolo e agli agonisti selettivi dei recettori estrogenici, PPT, DPN e G-1 (Patkar et al., 2011). A elevate concentrazioni micromolari, è stato osservato che il 17 β -estradiolo induce una vasodilatazione rapida, indipendente sia dall'endotelio sia dall'NO, che non risulta bloccata dall'antagonista ICI 182,780. Testando i singoli agonisti selettivi, il PPT ha mostrato una vasodilatazione maggiore, mentre DPN e G-1 hanno avuto un effetto minore rispetto all'azione del 17 β -estradiolo (Patkar et al., 2011).

Nelle arteriole cerebrali di ratto maschio e femmina la vasodilatazione mediata da GPER è in parte dovuta all'eNO e indotta dal rilassamento diretto delle cellule

muscolari lisce e, il trattamento con G-1, migliora il danno microvascolare da ipossia/riperfusionazione (Murata et al., 2013).

In uno studio del 2013, Lindsey e collaboratori hanno dimostrato che il rilassamento indotto da GPER nelle arterie mesenteriche di ratto Lewis femmina coinvolge sia la via di segnalazione endoteliale che le cellule muscolari lisce. Nelle cellule endoteliali, GPER stimola il rilascio di NO che diffonde alla muscolatura liscia e attiva la guanilato ciclasi. Nelle cellule del muscolo liscio GPER attiva l'adenilato ciclasi con conseguente aumento di cAMP (Lindsey et al., 2013): poiché è noto che la subunità *G α s* della proteina G attiva l'adenilato ciclasi e stimola la produzione di cAMP, è stato proposto l'accoppiamento di GPER a tale subunità e al successivo meccanismo di segnalazione che induce la vasodilatazione (Lindsey et al., 2013).

Questo studio supporta il contributo di entrambi i tipi cellulari nella vasodilatazione mediata da GPER similmente a quanto osservato nell'aorta toracica di ratti Sprague-Dawley ovariectomizzati (Li et al., 2012). Tuttavia, è stata anche dimostrata una risposta completamente endotelio dipendente, da parte di GPER, nelle coronarie dell'epicardio suino (Meyer et al., 2010) e nelle arterie carotidi Sprague-Dawley (Broughton et al., 2010).

Nella vena cava inferiore di Sprague-Dawley femmine e nell'arteria coronaria di maiale (Yu et al., 2011), l'effetto di GPER è completamente indipendente dall'endotelio (Raffetto et al., 2010).

La ragione di questi risultati disparati non è chiara ma potrebbe trovare risposta nei livelli di espressione di GPER o nel rapporto di segnalazione tra cellule endoteliali e cellule muscolari lisce, a seconda del modello e del letto arterioso indagato. Ad esempio, Reslan et colleghi hanno riportato una maggiore vasodilatazione a G-1 nelle arterie mesenteriche e renali rispetto alle carotidi e alle arterie polmonari (Reslan et al., 2013).

L'aumento di cAMP può attivare la proteina chinasi A e crossattivare altre proteine chinasi come la proteina chinasi G (Lincoln et al., 1990), che fosforilano proteine effettrici che riducono lo stato contrattile delle cellule muscolari lisce. Possibili bersagli includono i canali ionici della membrana plasmatica, come i canali del calcio di tipo L (Xiong and Sperelakis, 1995) e i canali del potassio a larga conduttanza (White et al., 2000), come recentemente scoperto nelle coronarie di suino (Yu et al., 2011). Inoltre, è stato dimostrato che GPER aumenta la fosforilazione della catena leggera della miosina nelle cellule muscolari lisce dell'aorta di ratto (Gros et al., 2011).

Haas e collaboratori (Haas et al., 2009) hanno dimostrato che la vasodilatazione mediata da G-1 è assente nei topi GPER deficienti, coerentemente con l'idea che G-1 è un agonista specifico di tale recettore. Nel medesimo studio, inoltre, è stato riportato che la stimolazione di GPER da parte di G-1 blocca le variazioni di calcio intracellulare indotte dalla serotonina nelle cellule muscolari lisce vascolari, indicando che la vasodilatazione mediata da GPER implica effetti antagonisti o desensibilizzanti del calcio.

La deficienza cronica di GPER, studiata nell'aorta toracica di topi GPER⁰, è associata ad un aumento della vasocostrizione mediata dai prostanoidi endoteliali, sebbene non presenti alcun effetto sulla bioattività di NO endoteliale, sull'espressione genica di eNOS e del recettore del trombossano né sulla struttura vascolare. In parallelo, l'inibizione acuta di GPER avvia la contrazione endotelio-dipendente e riduce la bioattività di eNO; G-15 non influenza la contrazione avviata dal recettore del trombossano (Meyer et al., 2012). In questo studio, GPER è stato interpretato come il primo recettore estrogenico in grado di regolare specificamente l'attività vasocostrittoria dei prostanoidi endoteliali (Meyer et al., 2012).

Nell'aorta toracica di ratti diabetici ovariectomizzati il trattamento cronico con G-1 potrebbe intervenire sulla disfunzione endoteliale: poichè l'eNO ha un ruolo fondamentale non solo nel modulare il tono vascolare ma anche nell'aterosclerosi, un aumento della sua biodisponibilità indotto da G-1 potrebbe migliorare la funzionalità vascolare nei soggetti diabetici (Li et al., 2012).

L'espressione dell'mRNA di GPER nei vasi sanguigni umani e l'aumento della pressione sanguigna osservata nei topi GPER knockout, sottintende un ruolo per questo recettore nel sistema cardiovascolare (Haas et al., 2007; Mårtensson et al., 2009).

E' stato infatti dimostrato che GPER (Thomas et al., 2005; Revankar et al., 2005) è espresso nelle cellule muscolari lisce di arterie e vene umane. In particolare, nelle arterie mammarie di pazienti aterosclerotici, l'mRNA di GPER, così come dei recettori classici, risulta essere sottoregolato dopo una breve esposizione al 17 β -estradiolo. I meccanismi alla base di questo processo sono attualmente poco chiari (Haas et al., 2007).

L'azione degli estrogeni è ben documentata sotto diversi aspetti clinici, ma non nella gravidanza umana. Corcoran e collaboratori hanno condotto, a tal proposito, degli studi su arterie del miometrio uterino e placentari isolate da biopsie ottenute al parto di donne in gravidanza non complicata (Corcoran et al., 2013). L'esposizione a

concentrazioni incrementali (0.03-30 μ M) dei principali agonisti selettivi dei recettori estrogenici ha mostrato una riduzione della contrazione indotta dall'agonista del recettore del trombossano U-46619 (10⁻⁶M). Nello specifico, il 17 β -estradiolo e il DPN rilassano le arterie della placenta con un effetto minore rispetto alle arterie del miometrio, mentre il PPT mostra una vasodilatazione acuta solo nel miometrio. L'esposizione a G-1 non inibisce la contrazione in nessuna delle due tipologie vascolari sopra citate. Tali effetti sono parzialmente endotelio e NO mediati nelle arterie del miometrio ma endotelio indipendenti nelle arterie della placenta umana (Corcoran et al., 2013).

E' stato suggerito che l'endotelio dei vasi fetoplacentali umani esprime ER β ma ER α risulta assente o espresso a livelli molto bassi (Su et al., 2007; Su et al., 2009) e le arterie miometriali presentano livelli di mRNA di ER α e ER β maggiori (Corcoran et al., 2013).

L'assenza dell'effetto vasodilatatorio dovuto all'interazione tra G-1 e GPER potrebbe essere un fattore tessuto-specifico, dovuto al tempo di esposizione (Corcoran et al., 2013) o al vasocostrittore utilizzato nella precontrazione. Infatti, una variante genetica missenso a singolo nucleotide di GPER, P16L GPER, è ipofunzionale quando è espressa nelle cellule del muscolo liscio vascolare e risulta associata ad una significativa riduzione della fosforilazione di ERK, mediata da G-1, nelle cellule muscolari lisce dell'aorta di ratto. Le donne, ma non i maschi, che esprimono questa variante manifestano un aumento della pressione arteriosa e le donne ipertese sono più predisposte a manifestarla (Feldman et al., 2014).

Nelle arterie di resistenza umane del grasso sottocutaneo di donne in gravidanza, in menopausa e di uomini di pari età precontratte con norepinefrina, GPER media una vasodilatazione concentrazione e endotelio dipendente, maggiore nella menopausa (Arefin et al., 2014). Questo potrebbe essere spiegato da meccanismi compensatori della riduzione dell'attività di NOS e degli estrogeni in circolo dopo la menopausa (Arefin et al., 2014).

2. MATERIALI E METODI

2.1 Animali e tessuti

In questo studio sono stati utilizzati ratti Sprague-Dawley (fig. 11) di età compresa tra 12-16 settimane e topi eNOS KO/C57BL6 di sesso femminile, mantenuti in un ciclo luce-buio di 12 ore con acqua e cibo disponibili *ad libitum*. I vantaggi nell'uso di questi animali come cavie sono: il basso costo, la facile reperibilità e la presenza di caratteristiche comuni ai mammiferi superiori.

Tutti gli esperimenti sono stati condotti in conformità con le Linee Guida Europee per la cura e l'uso degli animali da laboratorio (Direttiva 2010/63/UE) e dietro approvazione del Comitato Etico Locale dell'Università della Calabria per il ratto e dell'Università di Manchester per il topo.



Figura 11: Topo eNOS KO/C57BL6 e ratto Sprague Dawley.

Gli animali gravidi sono stati ottenuti accoppiando una femmina in proestro con un maschio fertile durante la notte; la mattina in cui sono stati trovati gli spermatozoi nello striscio vaginale è stata considerata il primo giorno di gravidanza.

La ratta è stata posta all'interno di una campana di vetro e dopo essere stata anestetizzata con dietil etere si è proceduto al sacrificio e all'asportazione dell'utero e del mesentero, conservati in soluzione fisiologica HEPES-PSS a 4°C fino al momento dell'uso. A seguire, è stato effettuato l'isolamento delle arterie radiali del miometrio dell'utero (fig.12) e mesenteriche di terzo-quarto ordine (fig.13).

Similmente, sono state isolate le arterie di resistenza uterine di diametro non superiore a 300 μm dal topo.

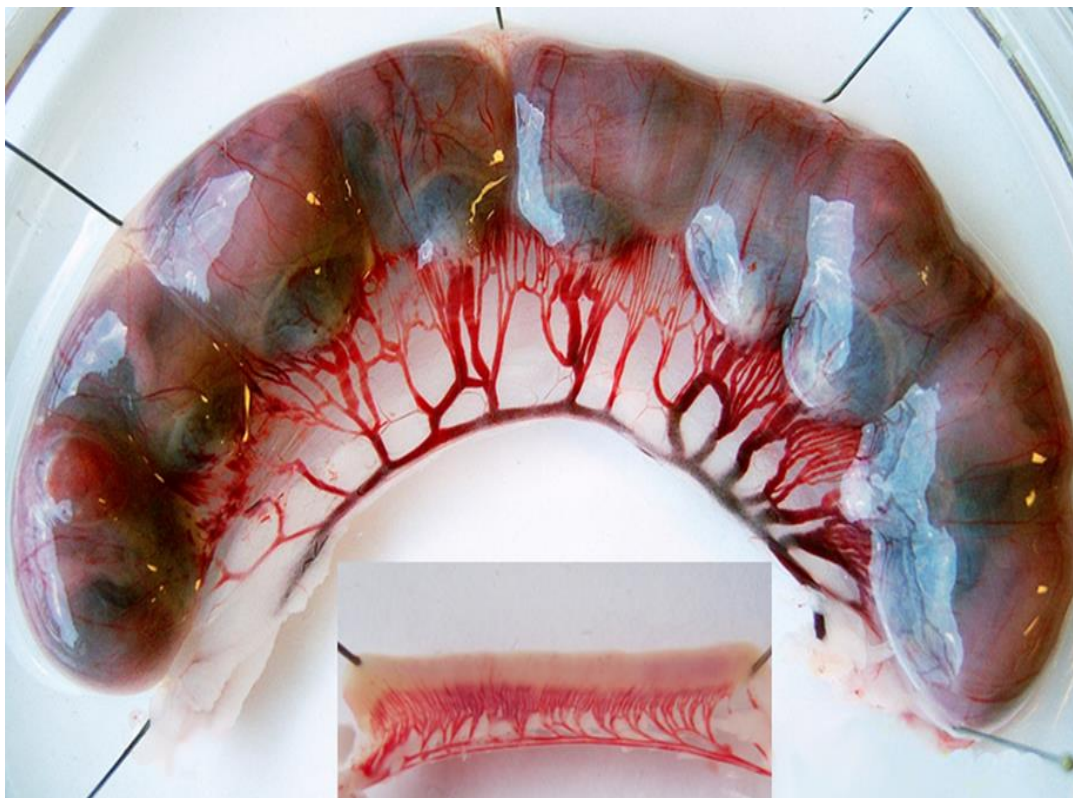


Figura 12: Utero e relativa vascolatura in gravidanda e non.



Figura 13: Vascolatura mesenterica.

Al fine di effettuare un confronto diretto con la vascolatura umana, la ricerca è stata estesa allo studio di arterie di resistenza isolate dalla piastra corionica della placenta umana (fig.14) a 38-40 settimane di gestazione, di diametro intorno ai 500 μm , da gravidanze non complicate in donne sane con un BMI (indice di massa corporea) non superiore a 30.



Figura 14: Placenta umana.

2.2 Pressure myography

Le arteriole uterine e mesenteriche ottenute da ratte non gravide (NP) e gravide a 14 giorni di gestazione, isolate e ripulite dal tessuto connettivo circostante sono state montate (1-2 mm di lunghezza) in una camera per arterie (University of Vermont, Instrumentation & Model Facility) riempita con la soluzione salina fisiologica HEPES-PSS. Tale camera contiene due micro-cannule in vetro: un'estremità del vaso è stata legata dapprima su una delle due cannule e lavata di qualsiasi contenuto

luminale aumentando la pressione prima di fissare l'estremità distale sulla seconda cannula, (fig. 15) assicurando una perfetta tenuta pressoria. L'apparato di perfusione (Living Systems, Instrumentation, Burlington, Vermont; fig. 15), costituito da un serbatoio d'ingresso e uno di uscita è collegato alla camera e, per mezzo di una pompa peristaltica, garantisce la continuamente perfusione dell'arteria. In questo sistema, la pressione trasmurale prodotta da una pompa peristaltica collegata alla cannula prossimale, è impostata manualmente a 50 mmHg. Un regolatore elettronico è attaccato ad un trasduttore di pressione in linea che regola la pressione trasmurale nel range di 1 mmHg. Un bagnetto termostato consente di mantenere la soluzione nella camera alla temperatura costante di 37 °C. Il diametro del lume è stato misurato mediante trans-illuminazione del segmento vascolare e con un video analizzatore di dimensione (Living Systems Instrumentation), in combinazione con un software di acquisizione e registrazione dati (Ionoptix).



Figura 15: Pressure myography e arteria incannulata.

2.3 Wire myography

Gli esperimenti eseguiti sulle arteriole della piastra corionica della placenta umana e sull'arteria uterina principale di topo wild-type (C57BL6) e eNOS^{-/-} a giorno 18,5 di gravidanza per la valutazione della funzione vascolare sono stati condotti al wire myography (M610; Danish Myotechnologies, Denmark). Si tratta di un dispositivo a quattro canali che opera mediante tecniche isometriche (fig. 16). I vasi sono stati normalizzati rispettivamente a 0.9L5.1kPa e a 0.9L13.3kPa in 6 ml di soluzione salina fisiologica ossigenata (PSS) e riscaldata a 37°C.

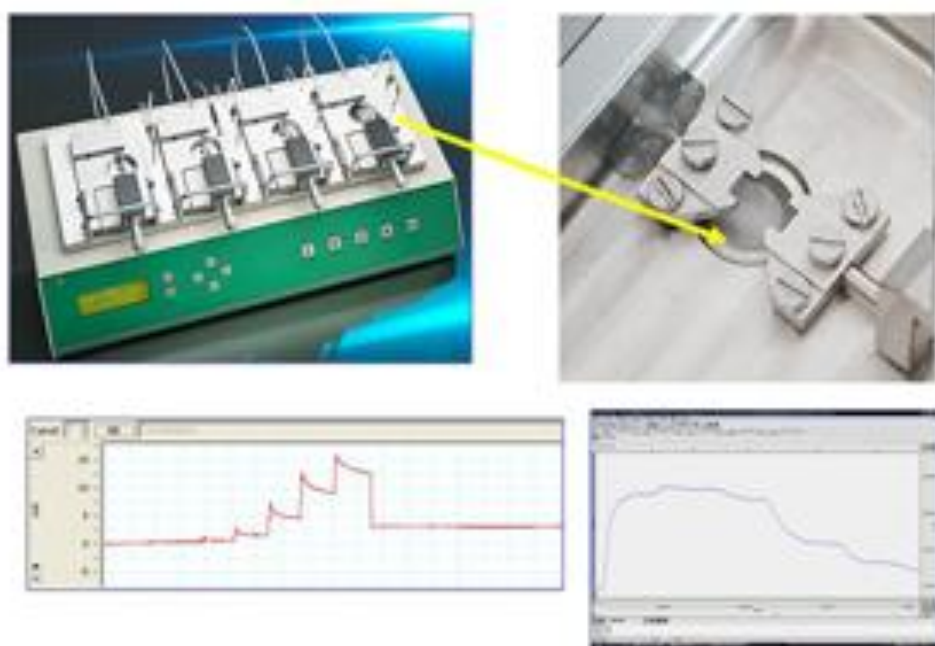


Figura 16: Wire myography.

2.4 Protocollo sperimentale

Inizialmente, tutte le arteriole di ratto sono state continuamente perfuse con HEPES-PSS a 37 °C ad una pressione trasmurale di 10 mmHg. Successivamente sono state equilibrate alla pressione di 50 mmHg per circa 45 minuti prima di iniziare la sperimentazione.

A seguito dell'equilibrio, tutti i vasi sono stati precostretti con fenilefrina (0,1 - 1µM), (R)-(-)-1-(3-Hydroxyphenyl)-2-methylaminoethanol hydrochloride, (R)-(-)-

3-Hydroxy- α -(methylaminomethyl)benzyl alcohol hydrochloride per produrre una riduzione del 40-50% del diametro basale, stabile per circa 10 minuti.

In una prima fase, è stato testato l'effetto di G-1, 1-(4-(6-Bromobenzol(1,3)diodo-5-yl)3a,4,5,9b-tetraidro-3Hcyclopenta(c-)quinolin-8yl)ethanone, agonista specifico di GPER, sulle arteriole uterine e mesenteriche di ratte non gravide (assunte come controllo) e gravide, a concentrazioni cumulative non tossiche, nel range di 10^{-12} - 10^{-6} M, come similmente riportato in letteratura (Lindsey et al., 2011b).

Ulteriori esperimenti farmacologici sono stati eseguiti testando G-1 su arterie denudate meccanicamente o dopo aver incubato il vaso intatto per 20 minuti con i seguenti inibitori:

- 1) G-15 (10^{-5} M), (3aS*,4R*,9bR*)-4-(6-Bromo-1,3-benzodioxol-5-yl)-3a,4,5,9b-3H-cyclopenta[c]quinoline, inibitore selettivo di GPER;
- 2) L-NNA (10^{-4} M), N-nitro-L-arginine + L-NAME (10^{-4} M), N ω -nitro-L-arginine methyl ester, inibitori NOS;
- 3) ODQ (10^{-5} M), 1H-[1,2,4]Oxadiazolo[4,3-a]quinoxalin-1-one, per la guanilato ciclasi;
- 4) Paxillina (10^{-5} M) per i canali BK_{Ca}.

Ottenuta, anche in questo caso, con le medesime modalità una contrazione costante di almeno 10 minuti pari al 40-50% del diametro iniziale, è stato testato l'effetto di G-1 10^{-7} M, registrandone le eventuali variazioni di diametro. Ogni protocollo è stato terminato testando la reattività endoteliale con acetilcolina (10^{-5} M) e, in seguito, HEPES-PSS contenente diltiazem (10^{-5} M), (2S,3S)-(+)-cis-3-Acetoxy-5-(2-dimethylaminoethyl)-2,3-dihydro-2-(4-methoxyphenyl)-1,5-benzothiazepin-4(5H)-one hydrochloride, CRD-401 e papaverina (10^{-4} M), 6,7-Dimethoxy-1-veratrylisoquinoline hydrochloride, per ottenere la massima dilatazione passiva.

Molto similmente per le arteriole di topo e della placenta umana, successivamente all'equilibrio di 20 minuti, è stata dapprima testata la vitalità vascolare, in seguito alla contrazione sviluppata in presenza di PSS ad alto contenuto di potassio (KPSS, 120 mM KCl con sostituzione equimolare di NaCl) e, i vasi non responsivi, sono stati esclusi dallo studio. Dopo aver testato KPSS per 4 minuti, i vasi di topo sono stati lavati e contratti con fenilefrina (10^{-5} M) e il rilassamento endotelio dipendente è stato verificato con acetilcolina (10^{-5} M). Dopo il lavaggio, è stata ripetuta la precontrazione con fenilefrina ed è stato testato il rilassamento a concentrazioni incrementali di G-1 (10^{-12} - 10^{-5} M). I vasi placentari umani, invece, sono stati

precontratti con endotelina-1 o KPSS 45 mM, prima di testare la curva dell'agonista di GPER.

2.5 Analisi immunoistochimica

Le arterie della piastra corionica della placenta umana e uterine di topo sono state montate al miografo per essere pressurizzate in modo comparabile alla pressione intraluminale *in vivo* e fissate in formalina tamponata neutra 10%, a 4 °C overnight. In seguito, il tessuto è stato disidratato secondo la serie ascendente degli alcoli (IMS 70% - 90% - 95% - 100%) e la diafanizzazione è stata effettuata in xilene. Successivamente alla fase di infiltrazione in paraffina fusa a 60 °C, i tessuti sono stati inclusi nel medesimo mezzo e i blocchetti così formati, una volta solidificati, sono stati tagliati al microtomo in sezioni trasversali dello spessore di 5µm.

Queste ultime sono state distese in acqua alla temperatura di 40-45 °C circa e poi fatte aderire su appositi vetrini portaoggetto.

Una volta asciutte, le sezioni adese sono state dapprima riscaldate a 60 °C, deparaffinizzate e reidratate secondo la scala discendente degli alcoli (etanolo assoluto – 70%) e lavate in acqua distillata.

Al fine di rimuovere le aspecificità e smascherare il sito di legame anticorpale, le sezioni sono state riscaldate in sodio citrato 0,01 M a pH 6.0 (antigen retrieval).

L'immunocolorazione è stata eseguita come di seguito:

- 1) incubazione con H₂O₂ 3% per 10 minuti (quench endogenous peroxidase);
- 2) lavaggi in TBS;
- 3) non-immune block per 30 minuti (TBS/Tween 0.1% + goat serum 10% e in aggiunta human serum 2% solo per il tessuto placentare);
- 4) anticorpo primario, rabbit polyclonal, GPR30 (N-15), diluito in non-immune block in presenza e assenza del blocking peptide per il controllo negativo o solo NIB per il controllo negativo in assenza di anticorpo, a 4°C overnight;
- 5) lavaggi in TBS e TBS/Tween;
- 6) anticorpo secondario goat anti rabbit biotinilato
- 7) lavaggi in TBS e TBS/Tween;
- 8) incubazione con avidina perossidasi;
- 9) lavaggio in TBS e TBS/Tween;

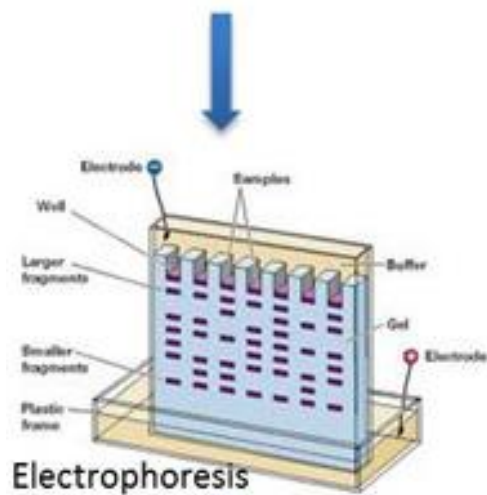
- 10) sviluppo della colorazione con sistema cromogeno DAB;
- 11) deidratazione delle sezioni secondo la serie crescente degli alcoli;
- 12) montaggio in DPX.

L'analisi e l'acquisizione delle immagini delle sezioni colorate è stata effettuata mediante microscopia (Leitz Dialux 22 connesso a QI Cam Fast 1394) e sistema d'immagine Image Pro®Plus (Media Cybernetics UK, Marlow, UK).

2.6 Western blotting

Le arterie uterine di ratto congelate a -80 °C sono state omogenizzate in una soluzione Hepes 50 mM, pH 7.4, contenente Triton X-100 1% (v/v), EDTA 4 mM, fluoruro di sodio 1 mM, sodio ortovanadato 0.1 mM, PMSF 2 mM, leupeptina 10 mg/ml e aprotinina 10 mg/ml. Per aumentare la quantità di tessuto e l'accuratezza delle misure, sono state omogenizzate arterie uterine provenienti da due ratti. Le arterie uterine di topo e della placenta umana, invece, sono state similmente omogenizzate in una soluzione HEPES 12mM, pH 7.6, contenente mannitolo 300mM, addizionata ad un cocktail inibitore delle proteasi. Gli omogenati così ottenuti sono stati centrifugati a 13000 rpm per 10 minuti e le concentrazioni di proteine nel surnatante sono state determinate secondo il metodo Bradford. Dei lisati tissutali, 40 µg di proteine sono stati sottoposti ad elettroforesi (fig.17) in gel di poliacrilammide riducente SDS/10% (w/v) e trasferiti su membrana di nitrocellulosa (arterie di ratto) o PDVF attivata in metanolo 100% (arterie di topo e placentali).

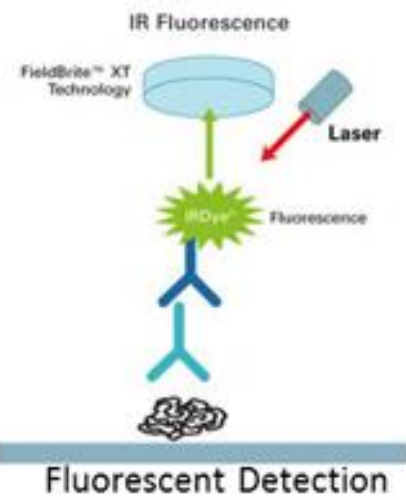
Sample Preparation



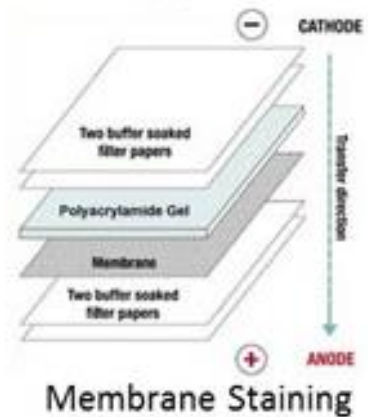
Electrophoresis



Transfer



Fluorescent Detection



Membrane Staining

Figura 17: Schematizzazione dell'elettroforesi delle proteine.

Dopo il trasferimento, le membrane in nitrocellulosa sono state colorate con Red Poinceau per confermare la parità di caricamento e di trasferimento. Le membrane sono state bloccate e incubate con anticorpo primario policlonale IgG GPER (N-15), α -tubulina (ab125267) o β -tubulina (H-235-2) e, successivamente con anticorpi secondari coniugati appropriati come IRDye donkey anti-rabbit o HRP.

La specificità anticorpale di GPER è stata appurata mediante l'uso del blocking peptide (sc-48525 P), neutralizzando completamente l'anticorpo. I livelli di proteina trasferite su membrana di nitrocellulosa sono stati rilevati tramite un Sistema di Chemiluminescenza Avanzata (GE Healthcare, Milano, Italia), mentre i livelli di

proteina trasferiti su membrane PDVF sono stati rilevati tramite sistema il d'immagine LICOR Odyssey.

2.7 Soluzioni e farmaci testati

La soluzione fisiologica HEPES - PSS contiene (in mmol/L): cloruro di sodio 141.8, cloruro di potassio 4.7, solfato di magnesio 1.7, cloruro di calcio 2.8, potassio fosfato 1.2, HEPES 10.0, EDTA 0.5 e glucosio 5.0. La soluzione fisiologica PSS contiene, invece (in mmol/L): NaCl 117, NaHCO₃ 25, KCl 4.69, MgSO₄ 2.4, CaCl₂ 1.6, KH₂PO₄ 1.18, glucosio 6.05, EDTA 0.034.

Entrambe le soluzioni sono state preparate in acqua deionizzata e portate a pH con idrossido di sodio; in aggiunta PSS è stato sottoposto a 95% aria / 5% CO₂.

Tutti i farmaci testati provenivano da soluzioni madri preparati giornalmente, tranne G - 1 e G - 15, preparati e congelati in piccole aliquote. G - 1 e G - 15 (fig.18) sono stati acquistati da Tocris (R&D Systems, Milano, Italia, Bristol, UK), tutti gli altri prodotti chimici sono stati acquistati da Sigma -Aldrich, Fisher Scientific, Cayman Chemical Co.

Gli anticorpi utilizzati per le analisi di immunoistochimica e western blotting sono stati acquistati da Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA; Abcam; Dako Ltd, Ely, UK; Sigma-Aldrich.

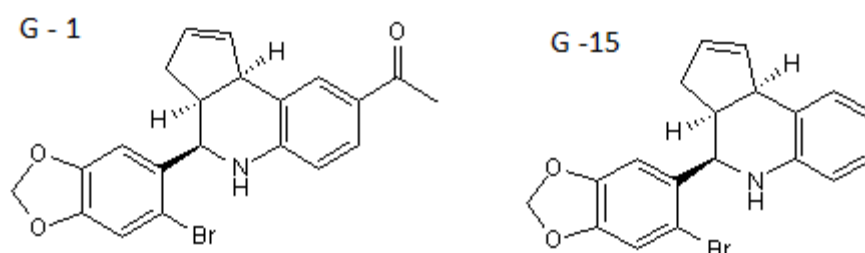


Figura 18: Formula di struttura di G-1 e G-15.

2.8 Analisi dei dati

I dati sono stati analizzati utilizzando il programma di grafica scientifica GraphPad Prism, pubblicato da GraphPad Software, Inc., California.

Nel ratto, il rilassamento a G-1 è stato espresso come percentuale di diametro massimo, determinato al termine di ogni esperimento mediante l'aggiunta di papaverina e diltiazem. Nel topo e nella placenta umana, invece, rilassamento è stato espresso come riduzione della percentuale di contrazione ottenuta rispettivamente con fenilefrina, endotelina-1 o KPSS. I dati sono espressi come media \pm SEM, dove n indica il numero dei vasi, nonché degli animali utilizzati. Le differenze nelle risposte tra i gruppi sono state determinate mediante ANOVA a due vie e t-test di Student non accoppiato.

Le differenze sono state considerate significative per $P \leq 0.05$.

3. RISULTATI

L'azione di G-1 è stata dapprima testata su arteriole mesenteriche isolate da ratti Sprague Dawley. Come mostra un tipico esempio di registrazione dell'esperimento (fig. 19), sia in animali non gravidi (NP) che gravidi (P), G-1 ha un effetto vasorilassante indipendente dal veicolo utilizzato per solubilizzare l'agonista recettoriale.

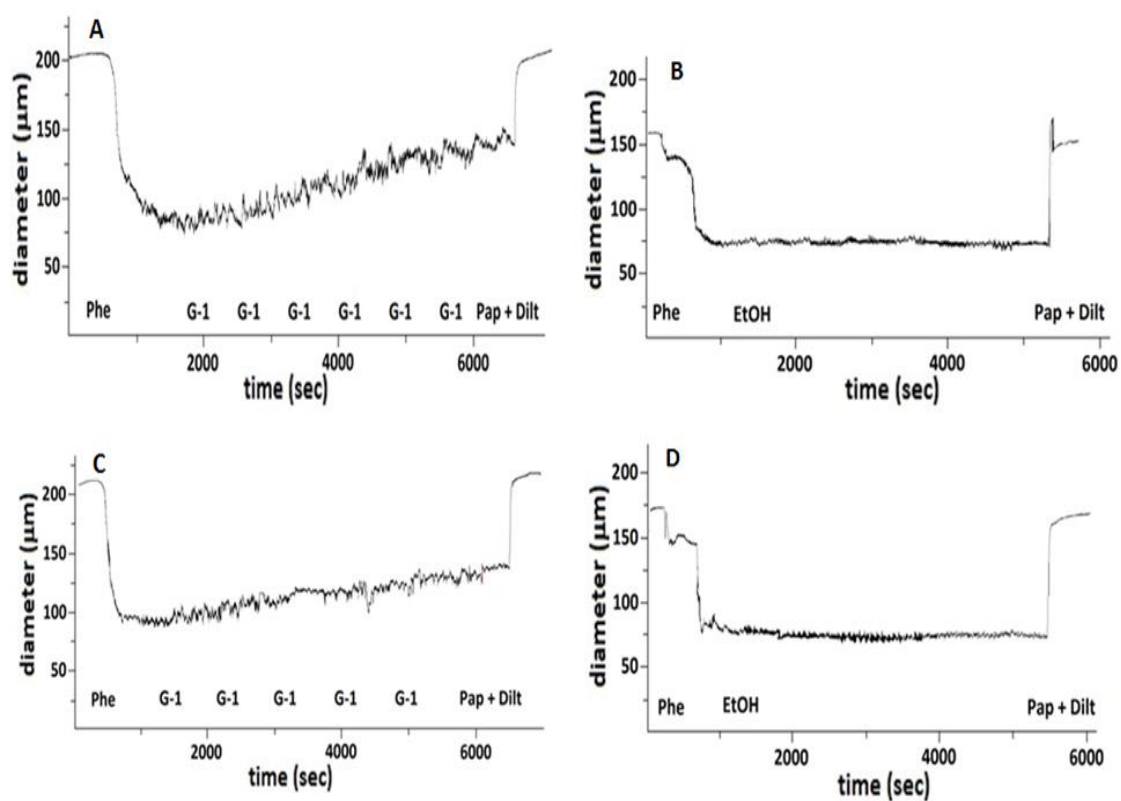


Figura 19: Tipico esempio di registrazione del protocollo sperimentale condotto su arteriole mesenteriche di ratte non gravide (NP) e ratte gravide (P). A=effetto di G-1 in NP; B=effetto di EtOH in NP; C=effetto di G-1 in P; D=effetto di EtOH in P.

Questo protocollo sperimentale è stato ripetuto diverse volte al fine di costruire la curva dose-risposta per G-1 (fig. 20), testando il farmaco nel range di concentrazioni compreso tra 10^{-12} - 10^{-6} M. In tal modo è stato dimostrato come l'effetto di vasodilatazione sia simile in P e in NP, raggiungendo valori di massima dilatazione pari a $45,5 \pm 6,1\%$ in P vs $53,6 \pm 2,3\%$ in NP.

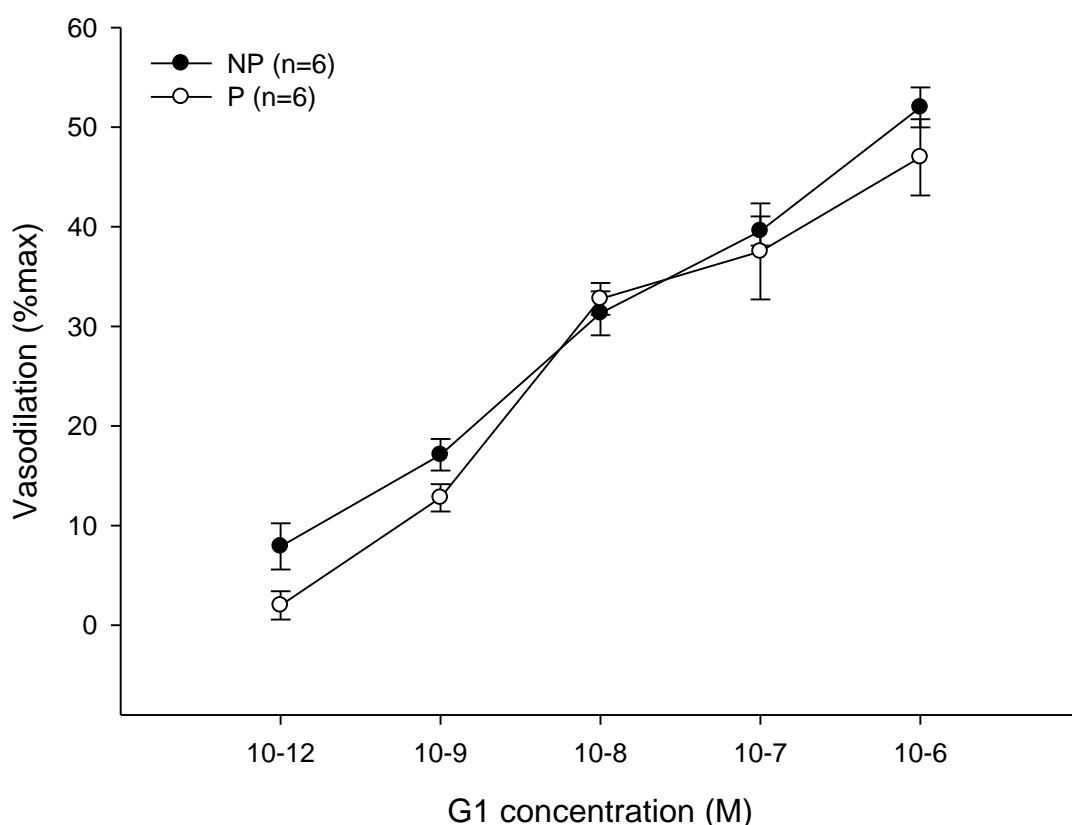


Figura 20: Curva dose risposta del G-1: il grafico mostra l'effetto vasodilatante dell'agonista di GPER nelle arteriole mesenteriche isolate da ratti in P e NP. La vasodilatazione è espressa come percentuale della massima risposta (max) ottenuta in presenza di papaverina e diltiazem. I dati sono riportati come media \pm SEM, n rappresenta il numero degli esperimenti.

Similmente, lo stesso protocollo sperimentale è stato utilizzato per lo studio dell'effetto di G-1 sulle arteriole uterine isolate da ratti NP e P. Come per le arteriole mesenteriche, un esempio di registrazione dell'esperimento (fig. 21), di seguito riportato, mostra che l'effetto vasodilatante di G-1 è dovuto all'azione dell'agonista recettoriale e non al veicolo.

I dati collezionati da una serie di esperimenti suggeriscono che l'effetto dose-dipendente di G-1 sulle arteriole uterine risulta essere maggiore in P (fig. 22). Effettivamente, la gravidanza sembrerebbe aumentare significativamente la vasodilatazione indotta da G-1 a ciascuna concentrazione testata, mostrando un effetto massimo alla concentrazione più alta, 10^{-6} M, pari a $97,8 \pm 2,5\%$ in P vs $66,5 \pm 3,7\%$ in NP, $p < 0.001$.

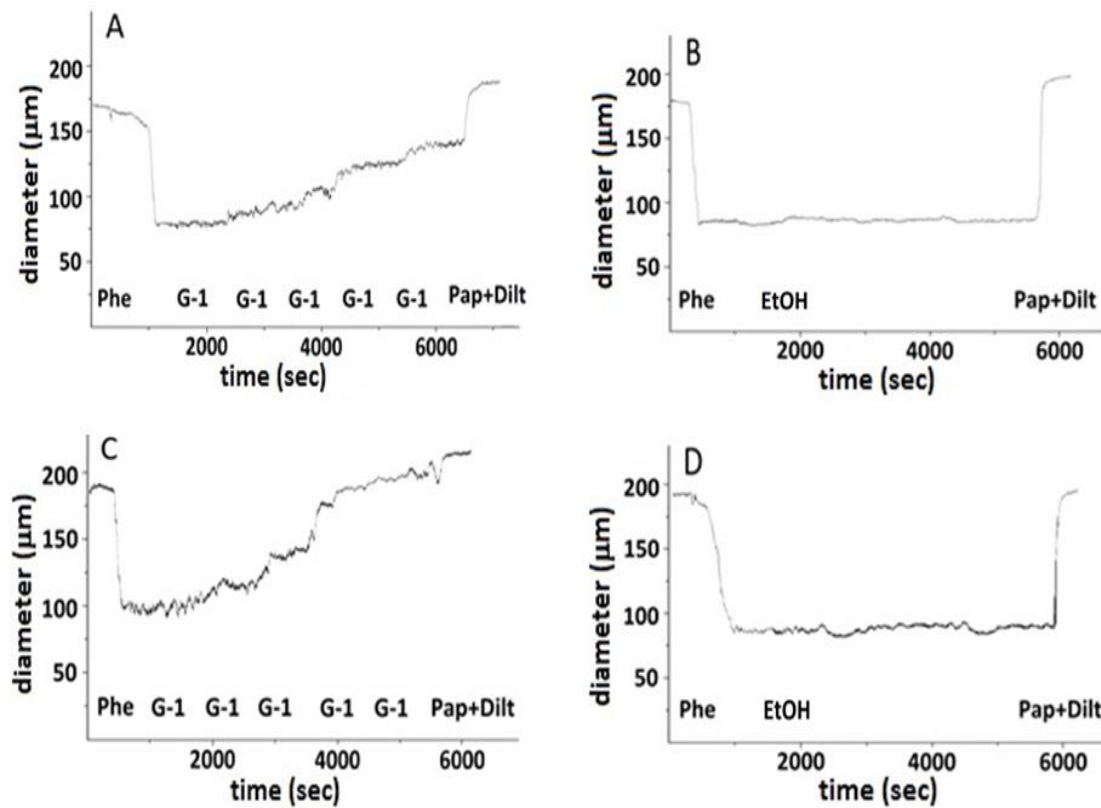


Figura 21: Tipico esempio di registrazione del protocollo sperimentale condotto su arteriole uterine isolate da ratti NP e P. A=effetto di G-1 in NP; B=effetto di EtOH in NP; C=effetto di G-1 in P; D=effetto di EtOH in P.

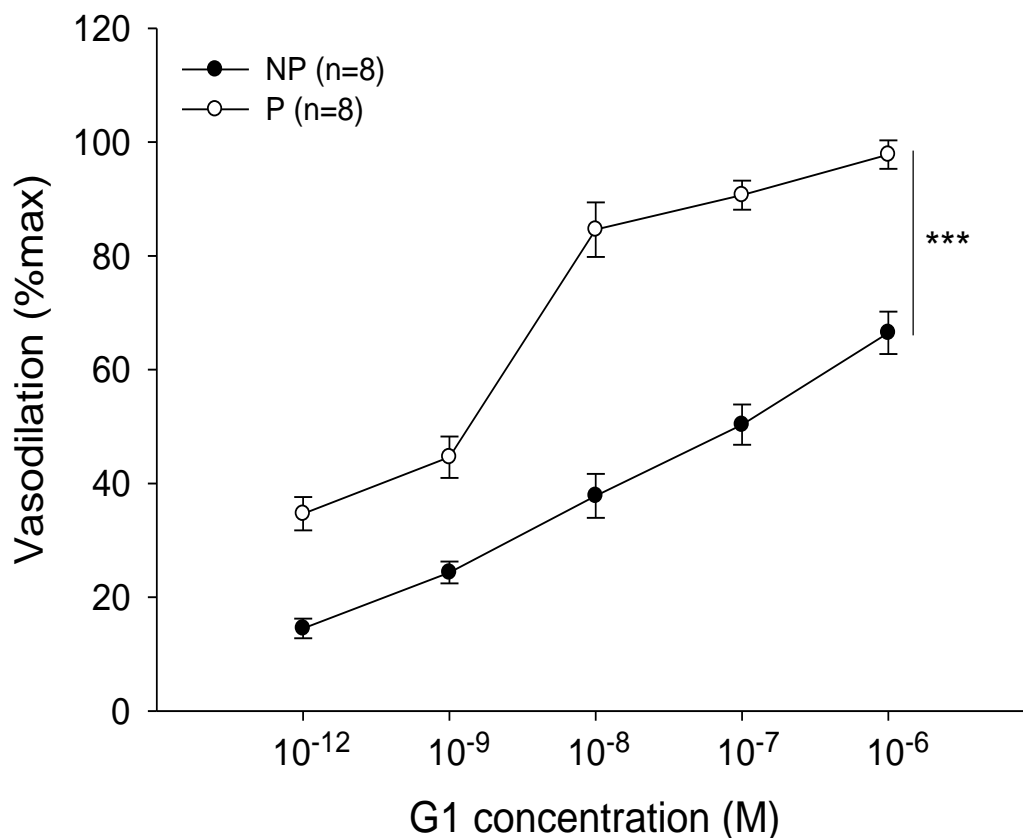


Figura 22: Curva dose risposta di G-1: il grafico mostra l'effetto vasodilatante dell'agonista di GPER nelle arteriole uterine isolate da ratti in P e NP. La vasodilatazione è espressa come percentuale della massima risposta (max) ottenuta in presenza di papaverina e diltiazem. I dati sono riportati come media \pm SEM, n rappresenta il numero degli esperimenti. ***p<0.001.

Una possibile spiegazione di tale effetto può essere suggerita dall'aumento significativo dell'espressione di GPER, con una percentuale della variazione proteica di oltre il doppio in gravidanza rispetto alla non gravidanza, per valori di p< 0.05 (fig. 23).

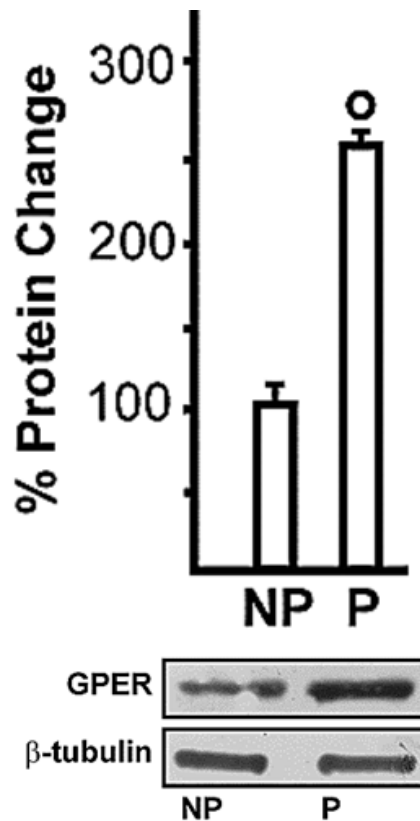


Figura 23: Espressione proteica di GPER in omogenati di arteriole uterine in NP e P. Il pannello in basso mostra l'analisi densitometrica delle bande proteiche normalizzate rispetto alla β -tubulina (peso molecolare di GPER:38 kDa; peso molecolare di β -tubulina:50 kDa). La percentuale di variazione è stata valutata come media \pm SEM di tre esperimenti per ogni gruppo. $^{\circ}p < 0.05$ per l'espressione in P vs NP.

Il confronto tra le arteriole uterine e mesenteriche isolate da ratti in gravidanza (fig. 24) evidenzia come la vasodilatazione dose dipendente, indotta da G-1, abbia un effetto significativamente maggiore nelle arteriole del sistema riproduttivo, per valori pari a $97,8 \pm 2,5\%$ rispetto alle arteriole mesenteriche, pari a $45,5 \pm 6,1\%$, $p < 0.001$, alla massima concentrazione testata. La gravidanza aumenta significativamente l'effetto di GPER nella sola vascolatura uterina suggerendone, probabilmente, un meccanismo di regolazione mediato dalla gravidanza stessa e una maggiore sensibilità rispetto alla vascolatura sistemica.

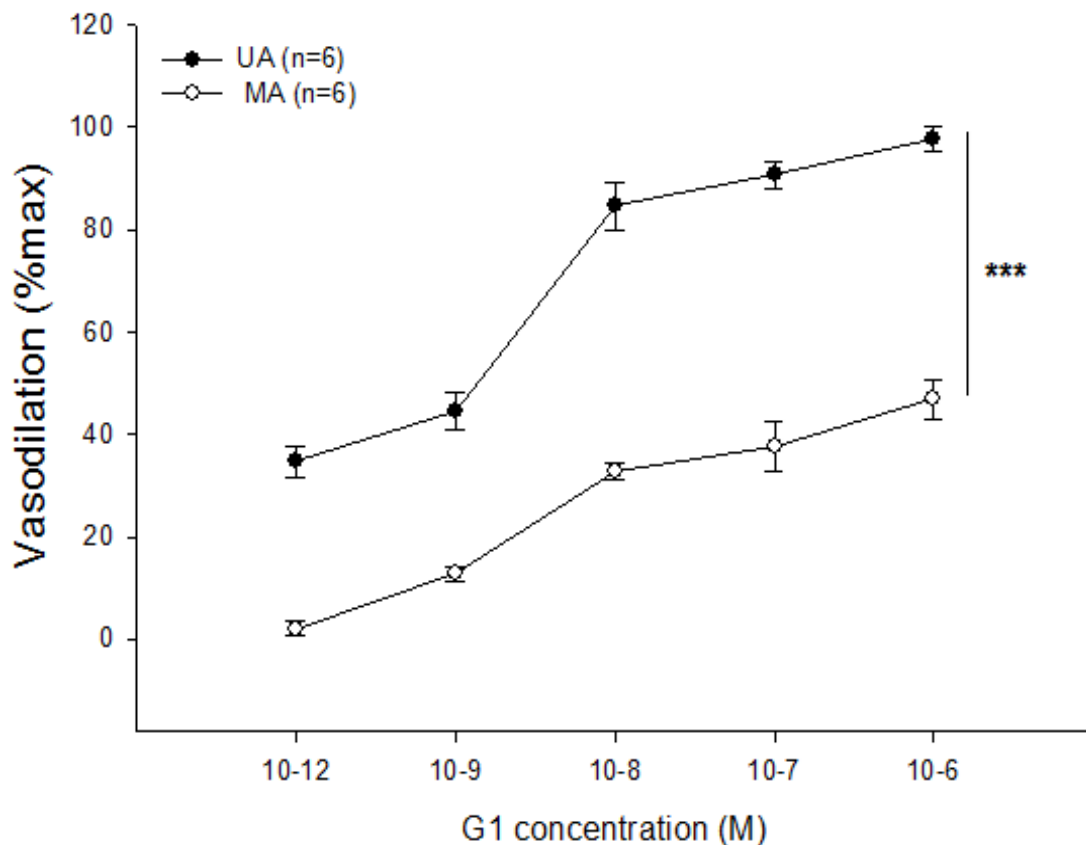


Figura 24: Curva dose risposta del G-1: il grafico mette a confronto l'effetto vasodilatatorio di G-1 su arteriole mesenteriche (MA) e uterine (UA) isolate da ratte gravide. La vasodilatazione è espressa come percentuale della massima risposta (max) ottenuta in presenza di papaverina e diltiazem. I dati sono riportati come media \pm SEM, n rappresenta il numero degli esperimenti. *** $p < 0.001$.

La specificità dell'agonista recettoriale è stata valutata sulle arteriole uterine di ratti in gravidanza in presenza di G-15. Gli istogrammi in figura 25, costruiti testando G-1 alla concentrazione 10^{-7} M e l'antagonista recettoriale G-15, alla concentrazione 10^{-5} M, mostrano una significativa riduzione dell'effetto di vasodilatazione in presenza dell'antagonista specifico di GPER, passando da $90,7 \pm 2,6\%$ (G1) a $18,2 \pm 2,4\%$ (G1 + G15), $p < 0.001$ della massima dilatazione osservabile.

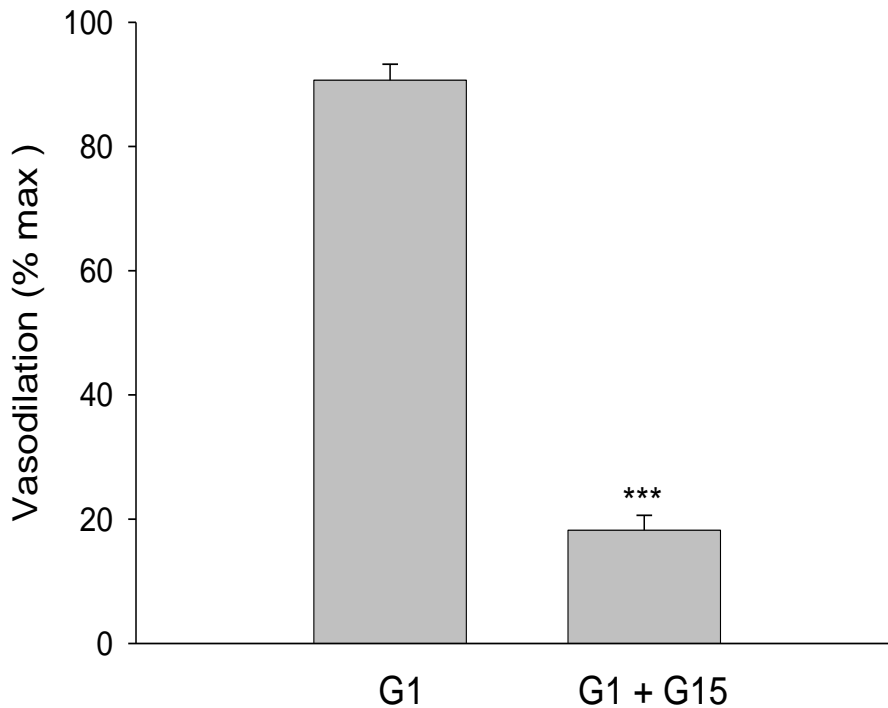


Figura 25: Effetto inibitorio dell'antagonista specifico di GPER, G-15, sulla vasodilatazione indotta da G-1. Gli istogrammi mostrano la vasodilatazione delle arterie uterine di ratti in gravidanza in risposta a G-1, testato alla concentrazione di 10^{-7} M in assenza (G1, n = 8) e in presenza dell'antagonista G15 (G1 + G15, n = 5). La vasodilatazione è espressa come percentuale della massima risposta (max) ottenuta in presenza di papaverina e diltiazem. I dati sono riportati come media \pm SEM. *** p < 0.001.

Il meccanismo molecolare coinvolto nell'azione vasorilassante di GPER in gravidanza è stato individuato, nelle arterie uterine, testando l'agonista G-1 in presenza degli inibitori della NOS e su vasi privati dell'endotelio (fig. 26). La vasodilatazione G-1 dipendente, alla concentrazione di 10^{-7} M, è risultata completamente abolita in presenza di L-NNA + L-NAME (200 μ M), passando da valori pari a $90,7 \pm 2,6\%$ a $2,5 \pm 2,5\%$, $p < 0.001$, in presenza degli inibitori. Inoltre, anche la rimozione meccanica dell'endotelio ha ridotto quasi totalmente l'effetto di G-1, riportando un valore di dilatazione pari al $6,6 \pm 2,2\%$, $p < 0.001$.

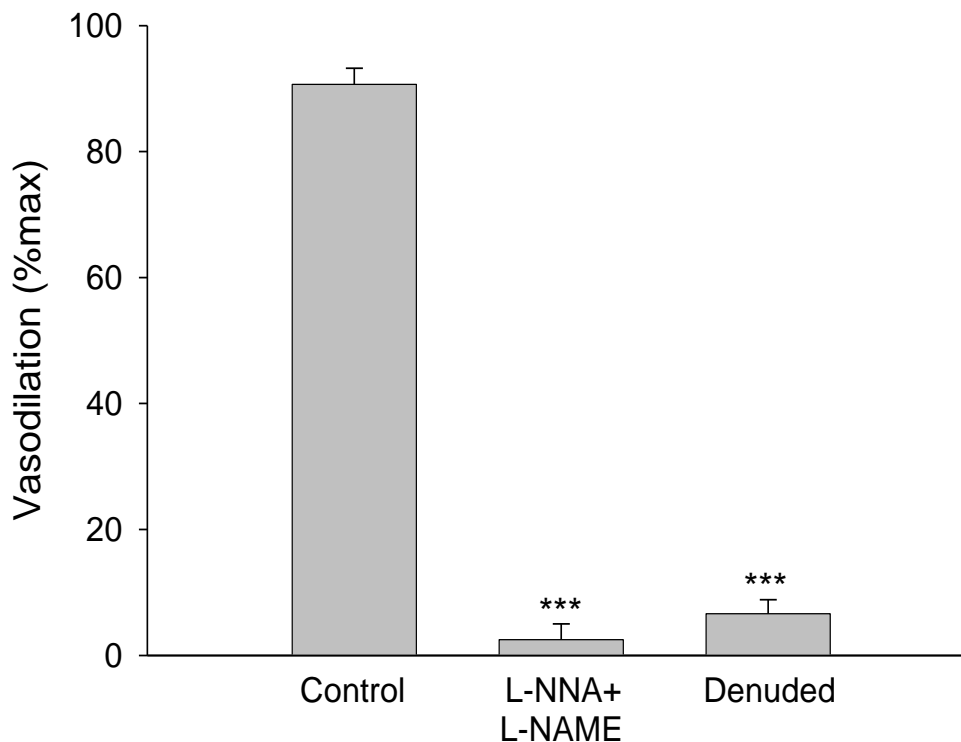


Figura 26: Effetto degli inibitori della NOS e della denudazione sulla vasodilatazione indotta da G-1 nelle arterie uterine. Gli istogrammi mostrano la vasodilatazione delle arteriole uterine di ratti in gravidanza in risposta a G-1, testato alla concentrazione di 10^{-7} M in assenza (control, n = 8) e in presenza degli inibitori della sintesi di ossido nitrico (L-NNA+L-NAME, 200 μ M, (n = 5) e su arteriole private dell'endotelio (denuded, n = 5). La vasodilatazione è espressa come percentuale della massima risposta (max) ottenuta in presenza di papaverina e diltiazem. I dati sono riportati come media \pm SEM. *** p < 0.001.

Esperimenti successivi hanno permesso di dimostrare come nel meccanismo d'azione di GPER sia implicata l'attivazione di cGMP. Questo è stato supportato dalla significativa riduzione della vasodilatazione in presenza dell'inibitore della guanilato ciclastasi solubile, ODQ, 10^{-5} M, (fig. 27) rispetto al controllo: in tal caso, infatti, l'effetto di G-1 osservato è pari a $23,1 \pm 2,1\%$, $p < 0.001$. Al contrario, risulta essere completamente inalterato dall'inibizione dei BK_{Ca} channels mediante paxillina, 10^{-5} M, mantenendo un effetto di dilatazione pari a $92,5 \pm 4,3\%$.

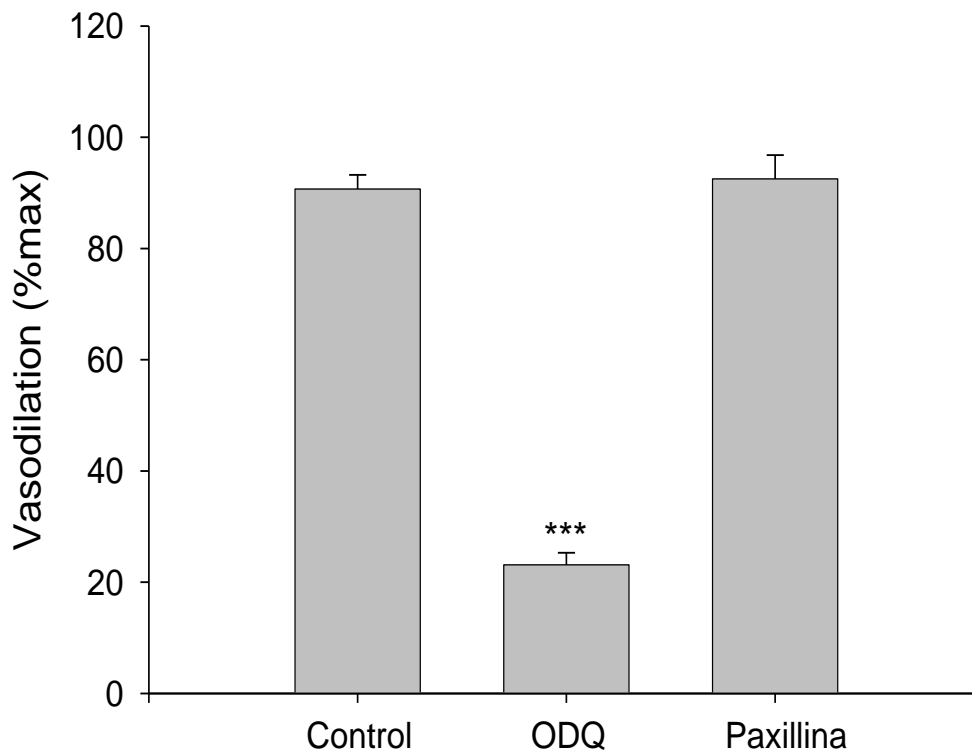


Figura 27: Effetto degli inibitori della guanilato ciclastasi e dei BK_{Ca} channels sulla vasodilatazione indotta da G-1 nelle arterie uterine. Gli istogrammi mostrano la vasodilatazione delle arteriole uterine di ratte in gravidanza in risposta a G-1, testato alla concentrazione di 10⁻⁷M in assenza (control, n = 8) e in presenza, rispettivamente, degli inibitori della guanilato ciclastasi (ODQ, n = 5) e dei BK_{Ca} channels (paxillina, n = 5), testati alla concentrazione di 10⁻⁵ M. La vasodilatazione è espressa come percentuale della massima risposta (max) ottenuta in presenza di papaverina e diltiazem. I dati sono riportati come media ± SEM. *** p < 0.001.

Al fine di confermare l'importanza dell'NO nel meccanismo molecolare d'azione di GPER, la curva dose risposta di G-1 è stata testata sull'arteria uterina principale isolata da topi in gravidanza, wild type e knock out per il gene eNOS (fig. 28). G-1 riduce la precostrizione indotta dalla fenilefrina in entrambi i genotipi animali, ma questo effetto risulta essere significativamente minore negli animali eNOS^{-/-} (p<0.01). Alla concentrazione più elevata, 10⁻⁵M, la costrizione è stata ridotta al 79,7 ± 1,5 % negli eNOS^{-/-} vs il 73,8 ± 0,8 % nel wild type, p<0.01.

Studi di immunohistochimica hanno in seguito dimostrato la presenza di GPER in questa tipologia di arterie, sia nella tunica intima che nella tunica media (fig. 29), come risulta dal confronto dello staining positivo (A, in wild type; D, in eNOS^{-/-})

rispetto al controllo negativo in presenza (B, in wild type; E, in eNOS^{-/-}) e in assenza del blocking peptide (C, in wild type; F, in eNOS^{-/-}).

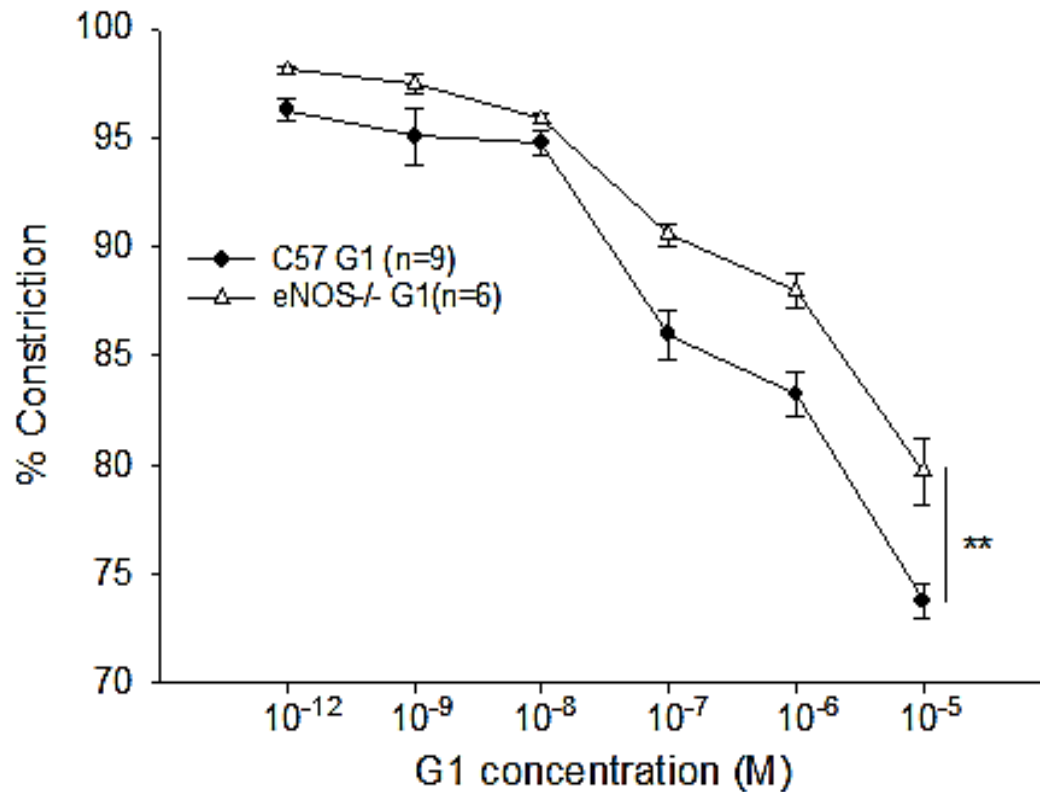


Figura 28: Curva dose risposta del G-1: il grafico mostra l'effetto vasodilatante dell'agonista di GPER nell'arteria uterina principale isolata da topi wild type (C57 G1) e knock out per il gene eNOS (eNOS^{-/-} G1) in gravidanza, precostrette con fenilefrina. La vasodilatazione è espressa come percentuale di riduzione della massima contrazione (constriction) ottenuta in presenza di fenilefrina. I dati sono riportati come media \pm SEM, n rappresenta il numero degli esperimenti. **p<0.01.

La specificità anticorpale è stata appurata anche mediante analisi di western blot. Come mostrato dagli istogrammi in figura 30, nelle arterie uterine di topo wild type in gravidanza, GPER è espresso e lo staining è completamente assente quando l'anticorpo è neutralizzato dal peptide bloccante, p <0,01.

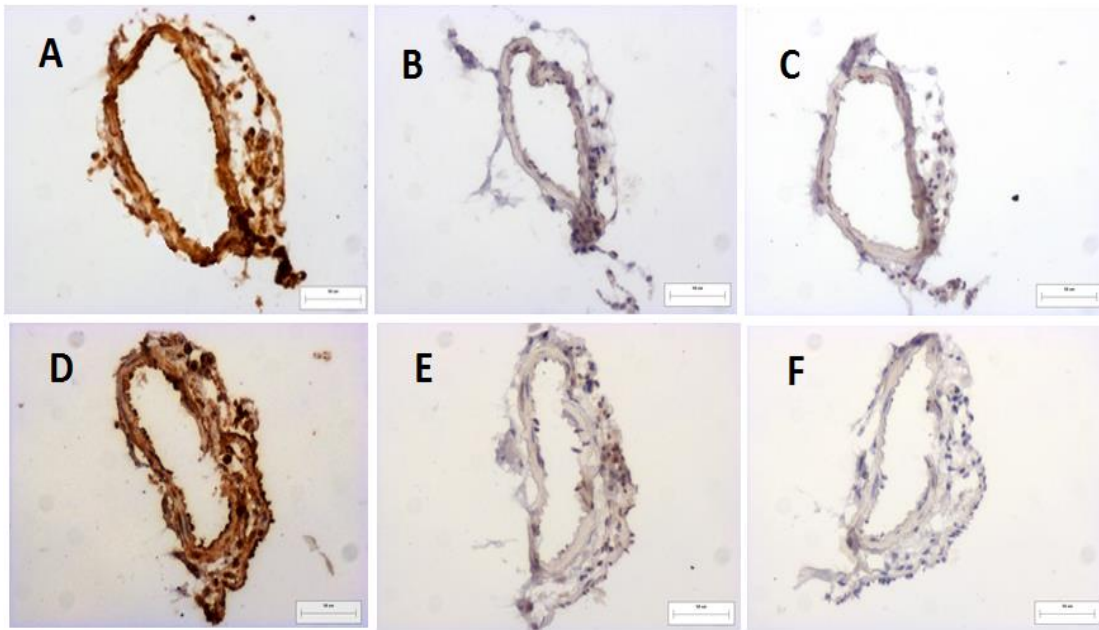


Figura 29: Sezioni trasversali rappresentative di arterie uterine isolate da topi wild type, C57 (A, B, C; 20x) e eNOS^{-/-} (D, E, F; 20x). La colorazione positiva (marrone, pannelli A e D) è presente sia nella tunica media che nell'intima. La specificità dell'espressione di GPER è confermata dall'assenza di colorazione con il peptide bloccante in presenza dell'anticorpo primario (pannelli B ed E). I pannelli C ed F mostrano il controllo negativo (assenza di anticorpo primario). Scale bar 50 micron.

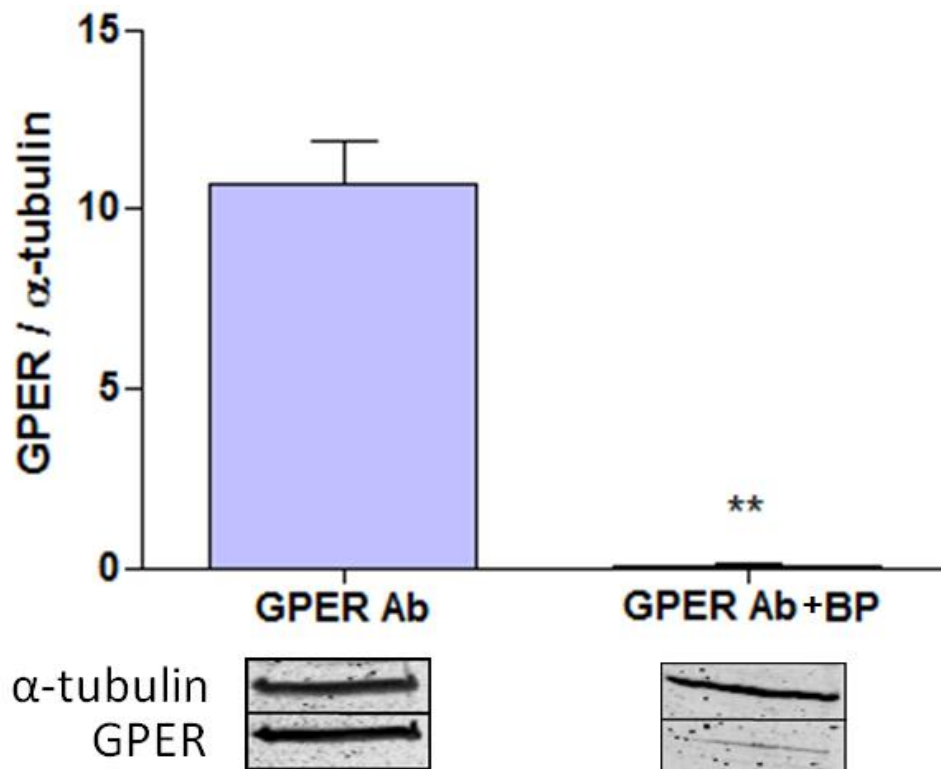


Figura 30: Western blot rappresentativo della specificità anticorpale di GPER in omogenati di arterie uterine di topo wild type in gravidanza. Il rapporto GPER/ α -tubulina (peso molecolare di GPER:38 kDa; peso molecolare di α -tubulina:50 kDa) è stato valutato come media \pm SEM di 3 esperimenti. **p <0,01 per la neutralizzazione dell'anticorpo primario in presenza del peptide bloccante rispetto al solo anticorpo, che conferma l'espressione di GPER.

Ulteriori studi di immunohistochemica condotti su sezioni trasversali di arterie isolate dalla piastra corionica hanno, inoltre, confermato la presenza di GPER nella vascolatura della placenta umana. La figura 31 mostra che GPER è localizzato sia nella tunica intima che nella tunica media, come risulta dal confronto dello staining positivo (A) rispetto al controllo negativo in presenza (B) e in assenza del blocking peptide (C).

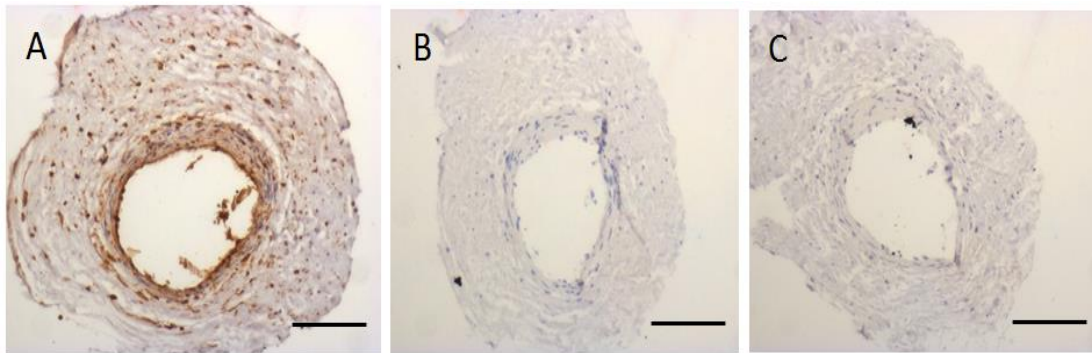


Figura 31: Sezioni trasversali rappresentative di arterie della piastra corionica isolate dalla placenta umana (A, B, C; 10x). La colorazione positiva (marrone, pannello A) è presente sia nella tunica media che nell'intima. La specificità dell'espressione di GPER è confermata dall'assenza di colorazione con il peptide bloccante in presenza dell'anticorpo primario (pannello B). Il pannello C mostra il controllo negativo (assenza di anticorpo primario). Scale bar 100 micron.

Anche in questo caso, la specificità anticorpale è stata soddisfatta mediante analisi di western blot: gli istogrammi in figura 32, mostrano che GPER è espresso e lo staining è completamente assente quando l'anticorpo è neutralizzato dal peptide bloccante, $p < 0,01$.

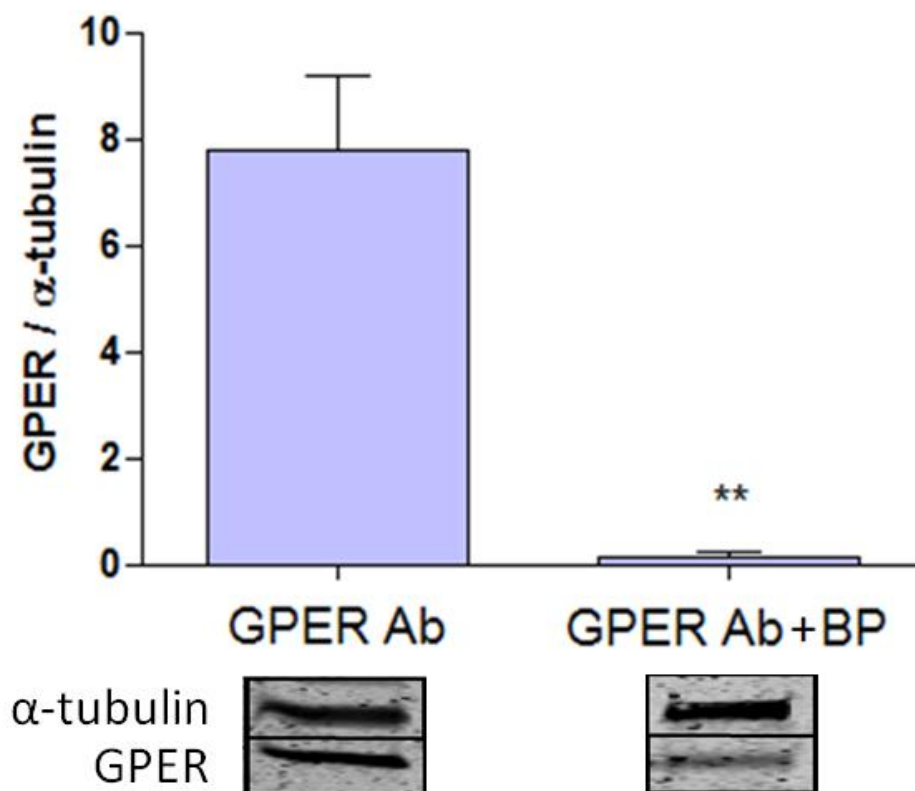


Figura 32: Western blot rappresentativo della specificità anticorpale di GPER in omogenati di arterie della piastra corionica isolate dalla placenta umana. Il rapporto GPER/α-tubulina (peso molecolare di GPER:38 kDa; peso molecolare di α-tubulina:50 kDa) è stato valutato come media ± SEM di 4 esperimenti. **p <0,01 per la neutralizzazione dell'anticorpo primario in presenza del peptide bloccante rispetto al solo anticorpo, che conferma l'espressione di GPER.

Dimostrata la presenza di GPER nelle arterie della piastra corionica umana, al fine di valutare l'azione di G-1 nella vascolatura placentale, è stata testata la curva dose risposta dell'agonista recettoriale applicando un protocollo simile a quello utilizzato nello studio funzionale condotto sul topo. Il grafico in figura 33 mostra che G-1, rispetto al controllo con il solo vasocostrittore (ET1) riduce la percentuale di precontrazione indotta da endotelina-1 EC50 (ET1+G1), tuttavia, in questa tipologia vascolare, parte dell'effetto vasorilassante è dovuto al veicolo utilizzato (ET1+DMSO). Alla concentrazione più alta testata, 10^{-5} M, la contrazione è ridotta dal $93,3 \pm 4,3$ %, in presenza del solo vasocostrittore, ET1 EC50; al $73,1 \pm 2,9$ % dal DMSO e al $59,3 \pm 7,6$ % da G-1. La differenza tra l'effetto di G-1 e del veicolo non è risultata statisticamente significativa. Ripetendo il medesimo protocollo sperimentale, precontraendo le arterie placentali ($102,5 \pm 1,2$ %) con una soluzione a più alta concentrazione di potassio, KPSS 45mM (fig. 34), G-1 riduce nuovamente la contrazione (KPSS+G1, $92,7 \pm 1,2$ %), con un effetto, in questo caso, significativo

alla concentrazione più alta della curva dose risposta, 10^{-5} M ($p < 0.05$) e indipendente dal veicolo (KPSS+DMSO, $99,8 \pm 1,5\%$).

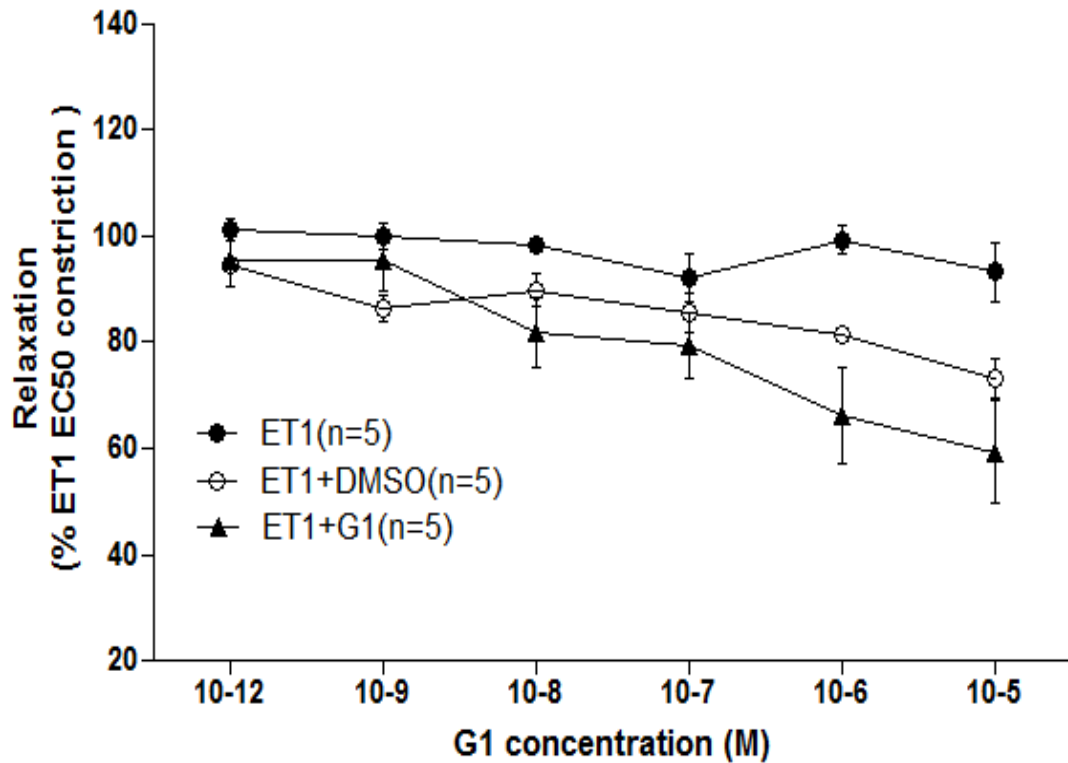


Figura 33: Curva dose risposta del G-1. Il grafico mostra l'effetto vasodilatante dell'agonista di GPER nelle arterie della piastra corionica isolate dalla placenta umana, precostrette con endotelina-1 EC50. ET1 rappresenta l'effetto, nel tempo, del solo vasocotrittore; ET1+DMSO e ET1+G1 rappresentano, rispettivamente l'effetto del veicolo e dell'agonista di GPER sulla precontrazione. La vasodilatazione è espressa come percentuale di riduzione della massima contrazione (% ET1 EC50 constriction) ottenuta in presenza di endotelina-1 EC50. I dati sono riportati come media \pm SEM, n rappresenta il numero degli esperimenti.

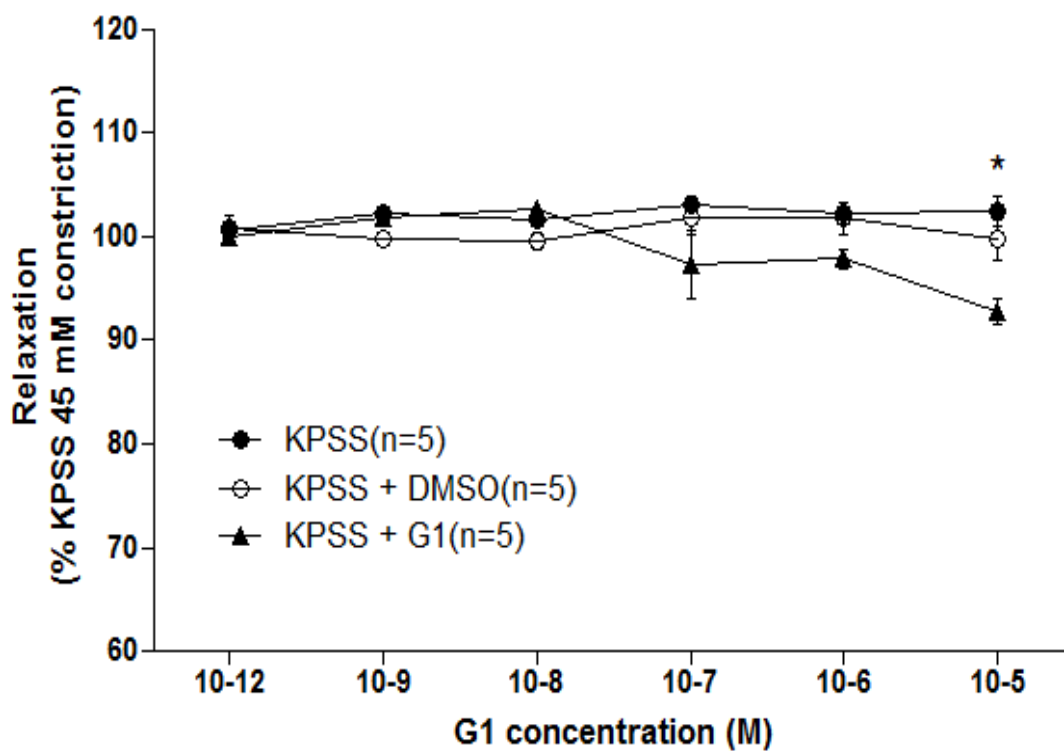


Figura 34: Curva dose risposta del G-1. Il grafico mostra l'effetto vasodilatante dell'agonista di GPER nelle arterie della piastra corionica isolate dalla placenta umana, precostrette con KPSS 45mM. KPSS rappresenta l'effetto, nel tempo, del solo vasocostrittore; KPSS+DMSO e KPSS+G1 rappresentano, rispettivamente l'effetto del veicolo e dell'agonista di GPER sulla precontrazione. La vasodilatazione è espressa come percentuale di riduzione della massima contrazione (% KPSS 45mM constriction) ottenuta in presenza di KPSS 45mM. I dati sono riportati come media \pm SEM, n rappresenta il numero degli esperimenti. * $p < 0.05$ per KPSS+G1 vs KPSS+DMSO.

4. DISCUSSIONE

Tale studio ha permesso di mostrare il ruolo di GPER nella vascolatura mesenterica e, per la prima volta, nella vascolatura uterina di ratto in gravidanza. L'attivazione recettoriale, mediata dallo specifico agonista, G-1, induce un effetto dose dipendente vasorilassante in entrambi i letti vascolari, sia in gravidanza che nella non gravidanza sebbene di minore entità nelle arteriole mesenteriche. Mentre in queste ultime l'effetto di G-1 è simile nei due diversi stadi fisiologici, nelle arteriole radiali uterine la gravidanza aumenta significativamente l'effetto di GPER. Questa modulazione funzionale potrebbe trovare spiegazione nella maggiore espressione recettoriale rispetto alla non gravidanza suggerendo, inoltre, l'importanza d'azione di GPER nella vascolatura riproduttiva rispetto a quella sistemica.

Un lavoro recente condotto su aorta, carotidi, arterie mesenteriche e renali di ratto, ha rivelato un aumento dell'espressione di ER α e ER β nell'aorta e nell'arteria mesenterica, e di GPER nell'aorta, in gravidanza rispetto alla non gravidanza (Mata et al., 2015). In parallelo, nel medesimo lavoro lo studio funzionale ha confermato l'aumento dell'effetto di vasodilatazione indotto dalla gravidanza, mediato da ER α nell'aorta e nell'arteria mesenterica, e da GPER nell'aorta (Mata et al., 2015).

La gravidanza, è un particolare stadio fisiologico caratterizzato da un rimodellamento ipertrofico verso l'esterno della vascolatura uterina, associato ad una significativa vasodilatazione finalizzata all'aumento del flusso sanguigno uteroplacentale (Mandalà and Osol, 2009). In tale processo, sebbene i fattori locali risultino essere predominanti rispetto a quelli sistemici (Fuller et al., 2009), gli estrogeni giocano un ruolo chiave nell'adattamento della vascolatura materna in gravidanza (Magness and Rosenfeld, 1989; Zhang et al., 2001; Albrecht et al., 2000), essendo funzionalmente implicati nella regolazione del flusso sanguigno uterino attraverso ER α e ER β (Pastore et al., 2012). La recente identificazione del terzo recettore estrogenico, GPER e la sua localizzazione nelle arterie e nelle vene umane (Haas et al., 2007) presenta la possibilità che questo recettore possa mediare gli effetti vasorilassanti acuti dell'estradiolo (Lindsey et al., 2011).

L'antagonista recettoriale specifico di GPER, attenua il rilassamento nelle arterie mesenteriche di ratto e coronariche di maiale endotelio-denudate in risposta a G-1 (Lindsey et al., 2011b; Yu et al., 2011) mentre, nelle arteriole cerebrali di ratto intatte, riduce parzialmente la vasodilatazione G-1 dipendente (Murata et al., 2013).

Nel presente studio, l'azione mediata da G-1, nelle arteriole uterine in gravidanza è ridotta significativamente in presenza dell'antagonista recettoriale G-15, suggerendo che la risposta vasodilatatoria acuta è dovuta a GPER.

La rilevanza di tale inibizione sull'attività funzionale di GPER è supportata dall'evidenza che sia la deficienza cronica, usando topi privi del gene GPER, che l'inibizione acuta, utilizzando l'antagonista G-15, aumenta la vasocostrizione endoteliale nell'aorta di topo (Meyer et al., 2012).

La vasodilatazione mediata da GPER è stata dimostrata in vari tipi di arterie, tuttavia resta da chiarire il meccanismo molecolare coinvolto.

E' ben noto che i recettori estrogenici classici, ER α e ER β , contribuiscono agli eventi di segnalazione vascolare (Deroo et al., 2006), favorendo il rilassamento endotelio dipendente o la dilatazione inducendo la produzione e l'attività di NO (Knot et al., 1999), prostacicline (Case and Davison, 1999) e fattore iperpolarizzante (Orshal et Khalil, 2004), e inibiscono il meccanismo di contrazione della muscolatura liscia vascolare (Orshal et Khalil, 2004). Al contrario, si sa molto poco circa il ruolo di GPER, nella regolazione del tono vascolare. E' stato dimostrato che, nel ratto, l'agonista G-1 induce una vasodilatazione parzialmente dipendente dall' NO endoteliale nelle arteriole cerebrali (Murata et al., 2013) e completamente endotelio dipendente, nell'aorta (Lindsey et al., 2009). Nelle arterie mesenteriche di ratti femmina mRen2 Lewis, l'effetto di G-1 è parzialmente attenuato sia dalla denudazione endoteliale che dal pretrattamento con l'inibitore NOS, L-NAME (Lindsey et al., 2011b) mentre è completamente endotelio indipendente nelle coronarie di maiale (Yu et al., 2011). Un lavoro condotto su arterie carotidi di ratto di entrambi i sessi ha dimostrato che GPER ha un meccanismo d'azione endotelio dipendente e mediato dall'NO (Broughton et al., 2010). Anche nelle arterie di resistenza del grasso sottocutaneo, nella donna in menopausa, in gravidanza e nell'uomo, GPER attiva un meccanismo di segnalazione eNOS mediato (Arefin et al., 2014). Similmente, questo studio ha rivelato che, in gravidanza, la vasodilatazione delle arteriole uterine mediata da G-1 è endotelio dipendente e il suo effetto è mediato dall'NO, come dimostrato dall'abolizione del vasorilassamento nelle arterie denudate e farmacologicamente in presenza degli inibitori della sintesi di ossido nitrico.

Nel meccanismo molecolare d'azione di GPER, poichè l'effetto vasorilassante di G-1 è significativamente ridotto in presenza dell'inibitore della guanilato ciclasi, ma è inalterato dall'inibitore dei canali del potassio a larga conduttanza, l'NO agisce

attraverso il cGMP ma non mediante l'attivazione dei canali BK_{Ca}. L'implicazione del pathway NO-cGMP nell'attivazione di GPER è stata riportata anche nelle arterie mesenteriche (Lindsey et al., 2014); mentre, il meccanismo endotelio indipendente nelle coronarie di maiale, rilassa la muscolatura liscia aumentando l'efflusso di potassio attraverso i canali BK_{Ca} (Yu et al., 2011).

L'importanza dell'NO nel meccanismo d'azione di GPER in gravidanza è stata supportata dagli esperimenti condotti sull'arteria uterina di topi eNOS^{-/-} in quanto, la riduzione della precostrizione per effetto G-1, è risultata significativamente minore rispetto al genotipo wild type. L'effetto molto meno marcato, nel topo, rispetto al ratto, potrebbe trovare giustificazione nella diversa tipologia animale, nonostante l'elevata similitudine, nella concentrazione del vasocostrittore utilizzato o nel differente sistema sperimentale. Ad ogni modo, in questo lavoro l'immunostaining ha confermato l'espressione di GPER sia nella tunica intima che nella tunica media dell'arteria uterina di topo.

Alcuni studi hanno dimostrato che nel ratto GPER è localizzato sia nelle cellule endoteliali che nelle cellule muscolari lisce dell'aorta e della carotide, nonostante l'attivazione recettoriale sia completamente endotelio dipendente in questi vasi (Lindsey et al., 2009; Broughton et al., 2010).

Isensee e collaboratori hanno dimostrato l'espressione di GPER nelle cellule endoteliali delle piccole arterie sistemiche di topo (Isensee et al., 2009); tuttavia, nei vasi cerebrali è espresso solo nelle cellule della muscolatura liscia (Murata et al., 2013).

Studi condotti su arteria mammaria interna e vena safena umane, hanno dimostrato l'espressione genica di GPER (Haas et al., 2007) nelle cellule muscolari lisce.

Nelle arterie di resistenza del grasso sottocutaneo umano, GPER è stato localizzato sia nella tunica intima che nella tunica media (Arefin et al., 2014).

Questo studio, ha consentito di dimostrare che GPER è espresso anche nella tunica intima e media delle arterie isolate dalla piastra corionica della placenta umana sebbene, un lavoro condotto da Corcoran e collaboratori, abbia riportato che la precostrizione delle arterie placentali e miometriali con U46619, agonista del recettore del trombossano, non viene ridotta dall'esposizione a G-1 (Corcoran et al., 2014). Nel presente lavoro, al contrario, è stato dimostrato come nelle arterie della piastra corionica umana, G-1 induca un effetto vasorilassante, seppure lieve, e differente in base al tipo di vasocostrittore testato. Infatti, alla concentrazione più alta (10⁻⁵ M), G-1 ha debolmente ridotto la precontrazione indotta dalla dose EC50 di

endotelina-1, ma tale effetto è risultato statisticamente significativo nelle arterie precontratte con la soluzione fisiologica ad alta concentrazione di potassio, KPSS 45 mM. Questo effetto ha dimostrato la variazione dell'attivazione recettoriale di G-1 in relazione al vasocostrittore utilizzato, come riportato in un lavoro sulle arterie coronarie di maiale dove G-1 e ICI 182,780, entrambi agonisti di GPER con paragonabile azione vasorilassante, attenuano la contrazione dell'endotelina-1 ma non della serotonina (Meyer et al., 2010).

In conclusione, questo studio suggerisce per la prima volta l'espressione e l'attività funzionale di GPER nella vascolatura uterina animale e nelle arterie della piastra corionica della placenta umana, contribuendo alla regolazione del tono vascolare, della perfusione placentare e del corretto sviluppo fetale.

Pertanto, GPER potrebbe rappresentare un possibile bersaglio terapeutico nelle patologie gestazionali caratterizzate da restrizione della crescita fetale associata ad alterazioni della resistenza vascolare.

Bibliografia

Abdelhamid R, Luo J, Vandevrede L, Kundu I, Michalsen B, Litosh VA, et al. *Benzothiophene selective estrogen receptor modulators provide neuroprotection by a novel GPR30-dependent mechanism. ACS Chem Neurosci* 2011;2(5):256–68.

Abraham GE, Odell WD, Swerdloff RS, et al.: *Simultaneous radioimmunoassay of plasma FSH, LH, progesterone, 17-hydroxyprogesterone, and estradiol-17 beta during the menstrual cycle. J Clin Endocrinol Metab* 34:312-8, 1972.

Acconcia F, Ascenzi P, Bocedi A, Spisni E, Tomasi V, Trentalance A, Visca P, Marino M, 2005. *Palmitoylation-dependent estrogen receptor alpha membrane localization: regulation by 17beta-estradiol. Mol. Biol. Cell* 16, 231–237.

Adamson SL, Lu Y, Whiteley KJ, Holmyard D, Hemberger M, Pfarrer C, Cross JC. *Interactions between trophoblast cells and the maternal and fetal circulation in the mouse placenta. Dev Biol* 250: 358–373, 2002.

Aghababaei M, Beristain AG, *The Elsevier Trophoblast Research Award Lecture: Importance of metzincin proteases in trophoblast biology and placental development: A focus on ADAM12. Placenta.* 2014 Dec 27. pii: S0143-4004(14)00916-3.

Ahola TM, Purmonen S, Pennanen P, Zhuang YH, Tuohimaa P, Ylikomi T, 2002. *Progesterin upregulates G-protein-coupled receptor 30 in breast cancer cells. Eur. J. Biochem.* 269, 2485e2490.

Akama KT, Thompson LI, Milner TA, McEwen BS, 2013. *Post-synaptic density-95 (PSD-95) binding capacity of G-protein-coupled receptor 30 (GPR30), an estrogen receptor that can be identified in hippocampal dendritic spines. J. Biol.Chem.* 288, 6438e6450.

Akarasereenont P, Techatraisak K, Thaworn A & Chotewuttakorn S (2000). *The induction of cyclooxygenase-2 by 17beta-estradiol in endothelial cells is mediated through protein kinase C. Inflammation Research,* 49: 460-465.

Albanito L, Madeo A, Lappano R, Vivacqua A, Rago V, Carpino A, Oprea TI, Prossnitz ER, Musti AM, and Andò S, et al. (2007) *G protein-coupled receptor 30 (GPR30) mediates gene expression changes and growth response to 17betaestradiol and selective GPR30 ligand G-1 in ovarian cancer cells. Cancer Res* 67: 1859–1866.

Albanito L, Sisci D, Aquila S, Brunelli E, Vivacqua A, Madeo A, Lappano R, Pandey DP, Picard D, and Mauro L, et al. (2008) *Epidermal growth factor induces G protein-coupled receptor 30 expression in estrogen receptor-negative breast cancer cells. Endocrinology* 149:3799–3808.

Albrecht ED, Aberdeen GW, Pepe GJ, 2000. *The role of estrogen in the maintenance of primate pregnancy. Am. J. Obstet. Gynecol.* 182, 432–438.

Albrecht ED, Bonagura TW, Burleigh DW, Enders AC, Aberdeen GW, Pepe GJ. *Suppression of extravillous trophoblast invasion of uterine spiral arteries by estrogen during early baboon pregnancy. Placenta* 2006;27:483–90.

Alexander SP, Benson HE, Faccenda E, Pawson AJ, Sharman JL, McGrath JC, Catterall WA, Spedding M, Peters JA, and Harmar AJ, et al.; *CGTP Collaborators (2013) The Concise Guide to PHARMACOLOGY 2013/14: overview. Br J Pharmacol* 170:1449–1458.

Annibale DJ, Rosenfeld CR, Stull JT, Kamm KE. *Protein content and myosin light chain phosphorylation in uterine arteries during pregnancy. Am J Physiol Cell Physiol* 259:C484–C489, 1990.

Anstead GM, Carlson KE, and Katzenellenbogen JA (1997) *The estradiol pharmacophore: ligand structure-estrogen receptor binding affinity relationships and a model for the receptor binding site. Steroids* 62:268–303.

Arefin A, Simoncini T, Wieland R, Hammarqvist F, Spina S, Goglia L, Kublickiene K *Vasodilatory effects of the selective GPER agonist G-1 is maximal in arteries of postmenopausal women. Maturitas.* 2014 Jun;78(2):123-30.

Ariazi EA, Ariazi JL, Cordera F, Jordan VC. *Estrogen receptors as therapeutic targets in breast cancer. Curr Top Med Chem* 2006;6:181–202.

Aronica SM, Kraus WL, Katzenellenbogen BS, 1994. *Estrogen action via the cAMP signaling pathway: stimulation of adenylate cyclase and cAMP-regulated gene transcription. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 91, 8517–8521.

Ashton SV, Whitley GS, Dash PR, Wareing M, Crocker IP, Baker PN, Cartwright JE, 2005. *Uterine spiral artery remodeling involves endothelial apoptosis induced by extravillous trophoblasts through Fas/FasL interactions. Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 25, 102–108.

Assali NS, Douglass RA Jr, Baird WW, Nicholson DB, Suyemoto R. *Measurement of uterine blood flow and uterine metabolism. IV. Results in normal pregnancy. Am J Obstet Gynecol* 66: 248–253, 1953.

Assali NS, Rauramo L, Peltonen T. *Measurement of uterine blood flow and uterine metabolism. VIII. Uterine and fetal blood flow and oxygen consumption in early human pregnancy. Am J Obstet Gynecol* 79: 86–98, 1960.

Atamer, Y., Erden, A.C., Demir, B., Kocyigit, Y., Atamer, A., 2004. *The relationship between plasma levels of leptin and androgen in healthy and preeclamptic pregnant women. Acta Obstet. Gynecol. Scand.* 83, 425–430.

Autiero M, Luttun A, Tjwa M, Carmeliet P. *PlGF and its receptor VEGFR-1: novel targets for stimulation of ischemic tissue revascularization and inhibition of angiogenic and inflammatory disorders. J Thrombosis Haemostasis* 2003;1:1356–1370.

Babischkin JS, Bonagura TW, Udoff LC, Vergara CO, Johnson HW, Atlas RO et al. *Estrogen stimulates the human endometrium to express a factor(s) that promotes vascular smooth muscle cell migration as an early step in microvessel remodeling. Endocrine* 2009;35:81–8.

Bahado-Singh, R.O., Oz, A.U., Kingston, J.M., Shahabi, S., Hsu, C.D., Cole, L., 2002. *The role of hyperglycosylated hCG in trophoblast invasion and the prediction of subsequent pre-eclampsia. Prenat. Diagn.* 22, 478–481.

Balhuizen A, Kumar R, Amisten S, Lundquist I, Salehi A, 2010. *Activation of G protein-coupled receptor 30 modulates hormone secretion and counteracts cytokine-induced apoptosis in pancreatic islets of female mice. Mol. Cell Endocrinol.* 320, 16e24.

Banerjee S, Chambliss KL, Mineo C, and Shaul PW (2014) *Recent insights into nonnuclear actions of estrogen receptor alpha. Steroids* 81:64–69.

Barber DA, Michener SR, Ziesmer SC & Miller VM (1996). *Chronic increases in blood flow upregulate endothelin-B receptors in arterial smooth muscle. American Journal of Physiology*, 270: H65-H71.

Bartella V, De Marco P, Malaguarnera R, Belfiore A and Maggiolini M, 2012. *New advances on the functional cross-talk between insulin-like growth factor-I and estrogen signaling in cancer. Cell. Signal.* 24, 1515-1521.

Barton M, 2012. *Position paper: The membrane estrogen receptor GPER--Clues and questions. Steroids* 77, 935-942.

Barton M, Meyer MR and Prossnitz ER, 2013. *Alike but not the same: anatomic heterogeneity of estrogen receptor-mediated vasodilation. J. Cardiovasc. Pharmacol.* 62, 22-25.

Barkley MS, Geschwind II, Bradford GE. *The gestational pattern of estradiol, testosterone and progesterone secretion in selected strains of mice. Biol Reprod.* 1979 May;20(4):733-8.

Barret-Connor E & Bush TL (1991). *Estrogen and coronary heart disease in women. Journal of the American Medical Association*, 265: 1861-1867.

Barton M and Prossnitz ER (2015) *Emerging roles of GPER in diabetes and atherosclerosis. Trends Endocrinol Metab* 26:185–192.

Beck R, Rawet M, Wieland FT, Cassel, D., 2009. *The COPI system: molecular mechanisms and function. FEBS Lett.* 583, 2701e2709.

Behl C and Holsboer F (1999) *The female sex hormone oestrogen as a neuroprotectant. Trends Pharmacol. Sci.* 20, 441–444.

Ben Driss A, Benessiano J, Poitevin P, Levy BI, Michel JB. *Arterial expansive remodeling induced by high flow rates. Am J Physiol Heart Circ Physiol* 272: H851–H858, 1997.

- Birkhauser, M. (1996) *Treatment of pain in estrogen deficiency*. *Arch.Gynecol. Obstet.* 259 (Suppl. 1), S74–S79.
- Bjellin L, Sjoquist PO, Carter AM. *Uterine, maternal placental and ovarian blood flow throughout pregnancy in the guinea pig*. *Zeitschrift fur Geburtshilfe und Perinatologie* 179:179–187, 1975.
- Bjornstrom, L., Sjoberg, M., 2005. *Mechanisms of estrogen receptor signaling: convergence of genomic and nongenomic actions on target genes*. *Mol. Endocrinol.*19, 833–842.
- Blechner JN, Stenger VG, Prystowsky H. *Uterine blood flow in women at term*. *Am J Obstet Gynecol* 120: 633–640, 1974.
- Bolego C, Cignarella A, Sanvito P, Pelosi V, Pellegatta F, Puglisi L, and Pinna C (2005) *The acute estrogenic dilation of rat aorta is mediated solely by selective estrogen receptor- α agonists and is abolished by estrogen deprivation*. *J Pharmacol Exp Ther* 313:1203–1208.
- Bologa CG, Revankar CM, Young SM, Edwards BS, Arterburn JB, Kiselyov AS, Parker MA, Tkachenko SE, Savchuck NP, and Sklar LA, et al. (2006) *Virtual and biomolecular screening converge on a selective agonist for GPR30*. *Nat Chem Biol* 2:207–212.
- Boonyaratanakornkit V, Edwards DP, 2007. *Receptormechanismsmediating nongenomic actions of sex steroids*. *Semin. Reprod. Med.* 25, 139–153.
- Bradshaw KD, Carr BR: *Placental sulfatase deficiency: maternal and fetal expression of steroid sulfatase deficiency and X-linked ichthyosis*. *Obstet Gynecol Surv* 41:401-13, 1986.
- Brailoiu GC, Arterburn JB, Oprea TI, Chitravanshi VC and Brailoiu E, 2012. *Bradycardic effects mediated by activation of G protein-coupled estrogen receptor (GPER) in rat nucleus ambiguus*. *Exp. Physiol.* 98, 679-691.
- Broselid S, Berg KA, Chavera TA, Kahn R, Clarke WP, Olde B, Leeb-Lundberg LM, 2014. *G protein-coupled receptor 30 (GPR30) forms a plasma membrane complex with membrane-associated guanylate kinases (MAGUKs) and protein kinase A-anchoring protein 5 (AKAP5) that constitutively inhibits cAMP production*. *J. Biol. Chem.* 289, 22117e22127.
- Brosens IA, Robertson WB, Dixon HG. *The role of the spiral arteries in the pathogenesis of preeclampsia*. *Obstet Gynecol Annu* 1972; 1:177-91.
- Brosens JJ, Pijnenborg R, Brosens IA. *The myometrial junctional zone spiral arteries in normal and abnormal pregnancies*. *Am J Obstet Gynecol* 2002;187:1416-23.
- Brosnihan KB, Senanayake PS, Li P & Ferrario CM (1999). *Bi-directional actions of estrogen on the renin-angiotensin system*. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*, 32: 373-381.

Broughton BR, Miller AA, Sobey CG. *Endothelium-dependent relaxation by G protein-coupled receptor 30 agonists in rat carotid arteries. Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2010;298(3):H1055–61.

Broughton BR, Brait VH, Ah Kim H, Lee S, Chu HX, Gardiner-Mann CV, Guida E, Evans MA, Miller AA, Arumugam TV, Drummond GR and Sobey CG, 2014. *Sex-Dependent Effects of G Protein-Coupled Estrogen Receptor Activity on Outcome After Ischemic Stroke. Stroke, epub.*

Brownbill P, Mills TA, Soydemir DF, Sibley CP: *Vasoactivity to and endogenous release of vascular endothelial growth factor in the in vitro perfused human Placental lobule from Pregnancies complicated by preeclampsia. Placenta* 2008; 29: 950–955.

Burris TP, Solt LA, Wang Y, Crumbley C, Banerjee S, Griffett K, Lundasen T, Hughes T, and Kojetin DJ (2013) *Nuclear receptors and their selective pharmacologic modulators. Pharmacol Rev* 65:710–778.

Burton, G.J., Woods, A.W., Jauniaux, E., Kingdom, J.C., 2009. *Rheological and physiological consequences of conversion of the maternal spiral arteries for uteroplacental blood flow during human pregnancy. Placenta* 30, 473–482.

Buus CL, Pourageaud F, Fazzi GE, Janssen G, Mulvany MJ, De Mey JG. *Smooth muscle cell changes during flow-related remodeling of rat mesenteric resistance arteries. Circ Res* 89:180–186, 2001.

Caluwaerts S, Vercruyse L, Luyten C, Pijnenborg R. *Endovascular trophoblast invasion and associated structural changes in uterine spiral arteries of the pregnant rat. Placenta* 26: 574–584, 2005.

Carroll JS, Brown M, *Estrogen receptor target gene: an evolving concept, Mol. Endocrinol.* 20 (8) (2006) 1707-1714.

Case J, Davison CA. *Estrogen alters relative contributions of nitric oxide and cyclooxygenase products to endothelium-dependent vasodilation. J Pharmacol Exp Ther.* 1999; 291:524–530.

Caulin-Glaser T, Garcia-Cardena G, Sarrel P, Sessa WC & Bender JR (1997). *17β-Estradiol regulation of human endothelial cell basal nitric oxide release, independent of cytosolic Ca²⁺ mobilization. Circulation Research*, 81: 885-892.

Ceiler DL, De Mey JG. *Chronic NG-nitro-L-arginine methylester treatment does not prevent flow-induced remodeling in mesenteric feed arteries and arcading arterioles. Arterioscler Thromb Vasc Biol* 20: 2057–2063, 2000.

Celia G, Osol G. *Venoarterial communication as a mechanism for localized signaling in the rat uterine circulation. Am J Obstet Gynecol* 2002;187:1653–9.

Celia G, Osol G. *Uterine venous permeability in the rat is altered in response to pregnancy, vascular endothelial growth factor, and venous constriction. Endothelium* 2005;12:81–8.

Chakrabarti S and Davidge ST, 2012. *G-protein coupled receptor 30 (GPR30): a novel regulator of endothelial inflammation. PLoS One* 7, e52357.

Chakrabarti S, Morton JS and Davidge ST, 2013. *Mechanisms of Estrogen Effects on the Endothelium: An Overview. Can. J. Cardiol.*

Chambliss KL, Yuhanna IS, Mineo C, Liu P, German Z, Sherman TS, Mendelsohn ME, Anderson RG, and Shaul PW (2000) *Estrogen receptor α and endothelial nitric oxide synthase are organized into a functional signaling module in caveolae. Circ Res* 87:E44–E52.

Chambliss KL, Yuhanna IS, Anderson RG, Mendelsohn ME, Shaul PW, 2002. *ER β has nongenomic action in caveolae. Mol. Endocrinol.* 16, 938–946.

Chambliss KL and Shaul PW (2002) *Rapid activation of endothelial NO synthase by estrogen: evidence for a steroid receptor fast-action complex (SRFC) in caveolae. Steroids* 67, 413–419.

Chambliss KL, Wu Q, Oltmann S, Konaniah ES, Umetani M, Korach KS, Thomas GD, Mineo C, Yuhanna IS, and Kim SH, et al. (2010) *Non-nuclear estrogen receptor α signaling promotes cardiovascular protection but not uterine or breast cancer growth in mice. J Clin Invest* 120:2319–2330.

Chang, K., Lubo, Z., 2008. *Review article: steroid hormones and uterine vascular adaptation to pregnancy. Reprod. Sci.* 15, 336–348.

Charlier TD et al. (2011) *Human and quail aromatase activity is rapidly and reversibly inhibited by phosphorylating conditions. Endocrinology* 152, 4199–4210.

Charn TH, Liu ET, Chang EC, Lee YK, Katzenellenbogen JA, and Katzenellenbogen BS (2010) *Genome-wide dynamics of chromatin binding of estrogen receptors α and β : mutual restriction and competitive site selection. Mol Endocrinol* 24:47–59.

Chaudhri RA, Schwartz N, Elbaradie K, Schwartz Z, and Boyan BD (2014) *Role of ER α 36 in membrane-associated signaling by estrogen. Steroids* 81:74–80.

Chen D et al. (1999) *Phosphorylation of human estrogen receptor α by protein kinase A regulates dimerization. Mol. Cell. Biol.* 19,1002–1015.

Chen DB, Bird IM, Zheng J, Magness RR. *Membrane estrogen receptor-dependent extracellular signal-regulated kinase pathway mediates acute activation of endothelial nitric oxide synthase by estrogen in uterine artery endothelial cells. Endocrinology* 2004;145:113–25.

Chen JZ, Sheehan PM, Brennecke SP, Keogh RJ. *Vessel remodelling, pregnancy hormones and extravillous trophoblast function. Mol Cell Endocrinol.* 2012 Feb 26;349(2):138-44.

Cheng SB, Quinn JA, Graeber CT, Filardo EJ, 2011a. *Down-modulation of the G-protein-coupled estrogen receptor, GPER, from the cell surface occurs via a trans-golgi-proteasome pathway. J. Biol. Chem.* 286, 22441e22455.

Cheng SB, Graeber CT, Quinn JA, Filardo EJ, 2011b. *Retrograde transport of the transmembrane estrogen receptor, G-protein-coupled-receptor-30 GPR30/ GPER from the plasma membrane towards the nucleus. Steroids* 76, 892e896.

Cheng SB, Dong J, Pang Y, Larocca J, Hixon M, Thomas P and Filardo EJ, 2013. *Anatomical location and redistribution of G protein-coupled estrogen receptor-1 during the estrus cycle in mouse kidney and specific binding to estrogens but not aldosterone. Mol. Cell. Endocrinol.* 382, 950-959.

Cheng SB, Dong J, Pang Y, LaRocca J, Hixon M, Thomas P, Filardo EJ, 2014. *Anatomical location and redistribution of G protein-coupled estrogen receptor-1 during the estrus cycle in mouse kidney and specific binding to estrogens but not aldosterone. Mol. Cell Endocrinol.* 382, 950e959.

Cheskis BJ, Greger JG, Nagpal S, Freedman LP, 2007. *Signaling by estrogens. J. Cell Physiol.* 213, 610–617.

Chimento A et al. (2010) *17beta-estradiol activates rapid signaling pathways involved in rat pachytene spermatocytes apoptosis through GPR30 and ER alpha. Mol. Cell. Endocrinol.* 320, 136–144.

Chimento A, Casaburi I, Rosano C, Avena P, De Luca A, Campana C, Martire E, Santolla MF, Maggiolini M, Pezzi V, Sirianni R. *Oleuropein and hydroxytyrosol activate GPER/ GPR30-dependent pathways leading to apoptosis of ER-negative SKBR3 breast cancer cells. Mol Nutr Food Res.* 2014 Mar;58(3):478-89.

Choi JH et al. (2011) *Estrogen receptor alpha pathway is involved in leptin-induced ovarian cancer cell growth. Carcinogenesis* 32,589–596.

Chung E, Yeung F, Leinwand LA *Akt and MAPK signaling mediate pregnancy-induced cardiac adaptation. J Appl Physiol* (1985). 2012 May;112(9):1564-75.

Cipolla M, Osol G. *Hypertrophic and hyperplastic effects of pregnancy on the rat uterine arterial wall. Am J Obstet Gynecol* 1994;171:805-11.

Cid MC, Kleinman HK, Grant DS, Schnaper HW, Fauci AS & Hoffman GS (1994). *Estradiol enhances leukocyte binding to tumor necrosis factor (TNF)-stimulated endothelial cells via an increase in TNF-induced adhesion molecules E-selectin, intercellular adhesion molecule type 1 and vascular cell adhesion molecule type 1. Journal of Clinical Investigation*, 93: 17-25.

Cipolla MJ, Binder ND, Osol G. *Myoendometrial versus placental uterine arteries: structural, mechanical, and functional differences in late-pregnant rabbits. Am J Obstet Gynecol* 177: 215–221, 1997.

Cohen, M., Meisser, A., Bischof, P., 2006. *Metalloproteinases and human placental invasiveness. Placenta* 27, 783–793.

Corcoran JJ, Nicholson C, Sweeney M, Charnock JC, Robson SC, Westwood M and Taggart MJ, 2013. *Human uterine and placental arteries exhibit tissue-specific acute responses to 17beta-oestradiol and oestrogen-receptor specific agonists. Mol. Hum. Reprod.*

Couse JF and Korach KS (1999) *Estrogen receptor null mice: what have we learned and where will they lead us? Endocr. Rev.* 20, 358–417.

Craven CM, Morgan T, Ward K. *Decidual spiral artery remodeling begins before cellular interaction with cytotrophoblasts. Placenta* 19: 241–252, 1998.

Cui J, Shen Y, Li R. *Estrogen synthesis and signaling pathways during aging: from periphery to brain. Trends Mol Med.* 2013 Mar;19(3):197-209.

Dahlman-Wright K, Cavailles V, Fuqua SA, Jordan VC, Katzenellenbogen JA, Korach KS, Maggi A, Muramatsu M, Parker MG, and Gustafsson JA (2006) *International Union of Pharmacology. LXIV. Estrogen receptors. Pharmacol Rev* 58:773–781.

Dantas AP, Scivoletto R, Fortes ZB, Nigro D & Carvalho MH (1999). *Influence of female sex hormones on endothelium-derived vasoconstrictor prostanoid generation in microvessels of spontaneously hypertensive rats. Hypertension*, 34 (Part 2): 914-919.

Davidge ST, McLaughlin MK. *Endogenous modulation of the blunted adrenergic response in resistance-sized mesenteric arteries from the pregnant rat. Am J Obstet Gynecol* 1992; 167:1691–1698.

Dechend R, Muller DN, Wallukat G, Homuth V, Krause M, Dudenhausen J, Luft FC. *ATI receptor agonistic antibodies, hypertension, and preeclampsia. Seminars Nephrol* 24: 571–579, 2004.

De Francesco EM, Lappano R, Santolla MF, Marsico S, Caruso A, and Maggiolini M (2013) *HIF-1 α /GPER signaling mediates the expression of VEGF induced by hypoxia in breast cancer associated fibroblasts (CAFs). Breast Cancer Res* 15:R64.

De Francesco EM, Pellegrino M, Santolla MF, Lappano R, Ricchio E, Abonante S, and Maggiolini M (2014) *GPER mediates activation of HIF1 α /VEGF signaling by estrogens. Cancer Res* 74:4053–4064.

Deliu E, Brailoiu GC, Arterburn JB, Oprea TI, Benamar K, Dun NJ, and Brailoiu E (2012) *Mechanisms of G protein-coupled estrogen receptor-mediated spinal nociception. J Pain* 13:742–754.

De Hertogh R, Thomas K, Bietlot Y, Vanderheyden I, Ferin J. *Plasma levels of unconjugated estrone, estradiol and estriol and of HCS throughout pregnancy in normal women. J Clin Endocrinol Metab.* 1975 Jan;40(1):93-101.

Dennis MK, Burai R, Ramesh C, et al. *In vivo effects of a GPR30 antagonist. Nat Chem Biol* 2009;5(6):421–7.

Dennis MK, Field AS, Burai R, Ramesh C, Petrie WK, Bologna CG, Oprea TI, Yamaguchi Y, Hayashi S, Sklar LA, Hathaway HJ, Arterburn JB and Prossnitz ER, 2011. *Identification of a GPER/GPR30 antagonist with improved estrogen receptor counterselectivity. J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* 127, 358-366.

Deroo BJ, Korach KS. *Estrogen receptors and human disease. J Clin Invest.* 2006; 116:561–570.

Ding Q, Gros R, Limbird LE, Chorazyczewski J, Feldman RD, 2009. *Estradiol mediated ERK phosphorylation and apoptosis in vascular smooth muscle cells requires GPR 30. Am. J. Physiol. Cell Physiol.* 297, C1178eC1187.

Dong WH, Chen JC, He YL, Xu JJ, and Mei YA (2013) *Resveratrol inhibits K(v)2.2 currents through the estrogen receptor GPR30-mediated PKC pathway. Am J Physiol Cell Physiol* 305:C547–C557.

Douglas G, Cruz MN, Poston L, Gustafsson JA, and Kublickiene K (2008) *Functional characterization and sex differences in small mesenteric arteries of the estrogen receptor- β knockout mouse. Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 294:R112–R120.

Dowell RT, Kauer CD. *Maternal hemodynamics and uteroplacental blood flow throughout gestation in conscious rats. Methods Find Exp Clin Pharmacol* 1997;19:613–25.

Dripps DJ, Brandhuber BJ, Thompson RC and Eisenberg SP, 1991. *Interleukin-1 (IL-1) receptor antagonist binds to the 80-kDa IL-1 receptor but does not initiate IL-1 signal transduction. J. Biol. Chem.* 266, 10331-10336.

Dubey RK, Gillespie DG, Imthurn B, Rosselli M, Jackson EK and Keller PJ (1999) *Phytoestrogens inhibit growth and MAP kinase activity in human aortic smooth muscle cells. Hypertension* 33, 177–182

Dubey RK, Jackson EK, Keller PJ, Imthurn B & Rosselli M (2001). *Estradiol metabolites inhibit endothelin synthesis by an estrogen receptor-independent mechanism. Hypertension*, 37 (Part 2): 640-644.

Dufau ML, 1998. *The luteinizing hormone receptor. Annu. Rev. Physiol.* 60, 461-496.

Durusu Tanriover M, Bora Tatar G, Uluturk TD, Dayangac Erden D, Tanriover A, Kilicarslan A, Oz SG, Erdem Yurter H, Sozen T and Sain Guven G, 2010. *Evaluation of the effects of vitamin D receptor and estrogen receptor 1 gene polymorphisms on bone mineral density in postmenopausal women. Clin. Rheumatol.* 29, 1285-1293.

Eastabrook G, Hu Y, von Dadelszen P. *The role of decidual natural killer cells in normal placentation and in the pathogenesis of preeclampsia. J Obstet Gynaecol Can* 30: 467–476, 2008.

Edwards DP, *Regulation of signal transduction pathways by estrogen and progesterone, Annu. Rev. Physiol.* 67 (2005) 335-376.

Erami C, Zhang H, Tanoue A, Tsujimoto G, Thomas SA, Faber JE. *Adrenergic catecholamine trophic activity contributes to flow-mediated arterial remodeling. Am J Physiol Heart Circ Physiol* 289: H744–H753, 2005.

Ergul A, Shoemaker K, Puett D & Tackett RL (1998). *Gender differences in the expression of endothelin receptors in human saphenous vein in vitro. Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 285: 511-517.

Espinoza J, Romero R, Mee Kim Y, Kusanovic JP, Hassan S, Erez O, Gotsch F, Than NG, Papp Z, Jai Kim C. *Normal and abnormal transformation of the spiral arteries during pregnancy. J Perinat Med* 34: 447–458, 2006.

Farrer-Brown G, Beilby JO, Tarbit MH. *The blood supply of the uterus. 1. Arterial vasculature. J Obst Gynaecol Br Commonwealth* 77: 673–681, 1970.

Farrer-Brown G, Beilby JO, Tarbit MH. *The blood supply of the uterus. 2. Venous pattern. J Obst Gynaecol Br Commonwealth* 77: 682–689, 1970.

Faul C, Asanuma K, Yanagida-Asanuma E, Kim K, Mundel P, 2007. *Actin up: regulation of podocyte structure and function by components of the actin cytoskeleton. Trends Cell Biol.* 17, 428–437.

Feldman RD, Gros R, Ding Q, Hussain Y, Ban MR, McIntyre AD, Hegele RA. *A common hypofunctional genetic variant of GPER is associated with increased blood pressure in women. Br J Clin Pharmacol.* 2014 Dec;78(6):1441-52

Feng Y and Gregor P, 1997. *Cloning of a novel member of the G protein-coupled receptor family related to peptide receptors. Biochem. Biophys. Res. Commun.* 231, 651-654.

Filardo EJ, Quinn JA, Bland KI, and Frackelton AR Jr (2000) *Estrogen-induced activation of Erk-1 and Erk-2 requires the G protein-coupled receptor homolog, GPR30, and occurs via trans-activation of the epidermal growth factor receptor through release of HB-EGF. Mol Endocrinol* 14:1649–1660.

Filardo EJ, Quinn JA, Frackelton Jr, AR, Bland KI, 2002. *Estrogen action via the G protein-coupled receptor, GPR30: stimulation of adenylyl cyclase and cAMP-mediated attenuation of the epidermal growth factor receptor-to-MAPK signaling axis. Mol. Endocrinol.* 16, 70–84.

Filardo EJ, Graeber CT, Quinn JA, Resnick MB, Giri D, DeLellis RA, Steinhoff MM, Sabo E, 2006. *Distribution of GPR30, a seven membrane-spanning estrogen receptor, in primary breast cancer and its association with clinicopathologic determinants of tumor progression. Clin. Cancer Res.* 12, 6359–6366.

Filardo E, Quinn J, Pang Y, Graeber C, Shaw S, Dong J, Thomas P. *Activation of the novel estrogen receptor G protein-coupled receptor 30 (GPR30) at the plasma membrane. Endocrinology* 2007;148 (7):3236–3245.

Filardo EJ and Thomas P (2012) *Minireview: G protein-coupled estrogen receptor-1, GPER-1: its mechanism of action and role in female reproductive cancer, renal and vascular physiology. Endocrinology* 153:2953–2962.

Finkelstein JS, Lee H, Burnett-Bowie SA, Pallais JC, Yu EW, Borges LF, Jones BF, Barry CV, Wulczyn KE, Thomas BJ, Leder BZ, *Gonadal steroids and body composition, strength, and sexual function in men, N. Engl. J. Med.* 369 (11) (2013) 1011-1022.

Forbes TR, Glassen G. *Steroid compounds and the dilatation of ovarian and uterine veins in the mouse. Am J Obstet Gynecol* 1972;113:678–80.

Ford SP, Reynolds LP, Ferrell CL. *Blood flow, steroid secretion and nutrient uptake of the gravid uterus during the periparturient period in sows. J Anim Sci* 59: 1085–1091, 1984.

Ford J, Hajibeigi A, Long M, Hahner L, Gore C, Hsieh JT, Clegg D, Zerwekh J and Oz OK, 2011. *GPR30 deficiency causes increased bone mass, mineralization, and growth plate proliferative activity in male mice. J. Bone Miner. Res.* 26, 298-307.

Frasor J, Stossi F, Danes JM, Komm B, Lyttle CR, and Katzenellenbogen BS (2004) *Selective estrogen receptor modulators: discrimination of agonistic versus antagonistic activities by gene expression profiling in breast cancer cells. Cancer Res* 64:1522–1533.

Fredette NC, Meyer M, Prossnitz ER, 2014. *The G-protein coupled receptor (GPER/GPR30) activates endothelial nitric oxide synthase. FASEB J.* 28 (Suppl. 1),1075.5.

Fuller R, Barron C, Mandala M, Gokina N, Osol G. *Predominance of local over systemic factors in uterine arterial remodeling during pregnancy. Reprod Sci.* 2009 May;16(5):489-500.

Funakoshi T, Yanai A, Shinoda K, Kawano MM, Mizukami Y, 2006. *G protein coupled receptor 30 is an estrogen receptor in the plasma membrane. Biochem. Biophys. Res. Comm.* 346, 904e910.

Gant NF, Whalley PJ, Everett RB, Worley RJ, MacDonald PC. *Control of vascular reactivity in pregnancy. Am J Kidney Dis* 1987; 9:303–307.

Gao F, Ma X, Ostmann AB, Das SK, 2011. *GPR30 activation opposes estrogen-dependent uterine growth via inhibition of stromal ERK1/2 and estrogen receptor α (ER α) phosphorylation signals. Endocrinol* 152, 1434e1447.

Garland HO, Atherton JC, Baylis C, Morgan MR, Milne CM. *Hormone profiles for progesterone, oestradiol, prolactin, plasma renin activity, aldosterone and*

corticosterone during pregnancy and pseudopregnancy in two strains of rat: correlation with renal studies. J Endocrinol. 1987 Jun;113(3):435-44.

Gaudet HM, Cheng SB, Christensen EM, Filardo EJ. *The G-protein coupled estrogen receptor, GPER: The inside and inside-out story. Mol Cell Endocrinol.* 2015 Jul 17. pii: S0303-7207(15)30025-3.

Gencil VB, Benjamin MM, Bahou SN, Khalil RA. *Vascular effects of phytoestrogens and alternative menopausal hormone therapy in cardiovascular disease. Mini Rev Med Chem.* 2012 Feb;12(2):149-74.

Geisterfer AA, Peach MJ, Owens GK. Angiotensin II induces hypertrophy, not hyperplasia, of cultured rat aortic smooth muscle cells. *Circ Res* 62:749–756, 1988.

Gerber RT, Anwar MA, Poston L. *Enhanced acetylcholine induced relaxation in small mesenteric arteries from pregnant rats: an important role for endothelium-derived hyperpolarizing factor (EDHF). Br J Pharmacol* 1998; 125:455–460.

Gerretsen, G., Huisjes, H.J., Elema, J.D., 1981. *Morphological changes of the spiral arteries in the placental bed in relation to pre-eclampsia and foetal growth retardation. Br. J. Obstet. Gynaecol.* 88, 876–881.

Ginther OJ. *Internal regulation of physiological processes through local venoarterial pathways: a review. J Anim Sci* 1974;39:550–64.

Giretti MS, Simoncini T, 2008. *Rapid regulatory actions of sex steroids on cell movement through the actin cytoskeleton. Steroids* 73, 895–900.

Girling JE, Lederman FL, Walter LM, Rogers PA. *Progesterone, but not estrogen, stimulates vessel maturation in the mouse endometrium. Endocrinology* 2007;11:5433–41.

Gokina NI, Mandala M, Osol G. *Induction of localized differences in rat uterine radial artery behavior and structure during gestation. Am J Obstet Gynecol* 189: 1489–1493, 2003.

Goldman-Wohl DS, Yagel S. *Examination of distinct fetal and maternal molecular pathways suggests a mechanism for the development of preeclampsia. J Reprod Immunol* 76: 54–60, 2007.

Grandas OH, Mountain DH, Kirkpatrick SS, Cassada DC, Stevens SL, Freeman MB, Goldman MH. *Regulation of vascular smooth muscle cell expression and function of matrix metalloproteinases is mediated by estrogen and progesterone exposure. J Vasc Surg.* 2009 Jan;49(1):185-91.

Greenspan FS, Strewler GJ, *Endocrinologia generale e clinica*, Piccin 2000.

Griendling KK, Fuller EO, Cox RH. Pregnancy induced changes in sheep uterine and carotid arteries. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 248:H658–H665, 1985.

Grill, S., Rusterholz, C., Zanetti-Dallenbach, R., Tercanli, S., Holzgreve, W., Hahn, S., Lapaire, O., 2009. *Potential markers of preeclampsia – a review. Reprod. Biol. Endocrinol.* 7, 70.

Gros R, Ding Q, Liu B, Chorazyczewski J and Feldman RD, 2013. *Aldosterone mediates its rapid effects in vascular endothelial cells through GPER activation. Am. J. Physiol. Cell Physiol.* 304, C532-540.

Gros R, Ding Q, Sklar LA, Prossnitz EE, Arterburn JB, Chorazyczewski J and Feldman RD, 2011. *GPR30 expression is required for the mineralocorticoid receptor-independent rapid vascular effects of aldosterone. Hypertension* 57, 442-451.

Guenther AE, Conley AJ, Van Orden DE, Farley DB, Ford SP. *Structural and mechanical changes of uterine arteries during pregnancy in the pig. J Anim Sci* 66: 3144–3152, 1988.

Guo H et al. (2012) *Lipocalin 2 deficiency alters estradiol production and estrogen receptor signaling in female mice. Endocrinology* 153,1183–1193.

Gurevich EV, Tesmer JJ, Mushegian A, and Gurevich VV (2012) *G protein-coupled receptor kinases: more than just kinases and not only for GPCRs. Pharmacol Ther* 133:40–69.

Haas E, Meyer MR, Schurr U, Bhattacharya I, Minotti R, Nguyen HH, Heigl A, Lachat M, Genoni M, Barton M, 2007. *Differential effects of 17beta-estradiol on function and expression of estrogen receptor alpha, estrogen receptor beta, and GPR30 in arteries and veins of patients with atherosclerosis. Hypertension* 49, 1358–1363.

Haas E, Bhattacharya I, Brailoiu E, Damjanovic M, Brailoiu GC, Gao X, Mueller-Guerre L, Marjon NA, Gut A, Minotti R, Meyer MR, Amann K, Ammann E, Perez-Dominguez A, Genoni M, Clegg DJ, Dun NJ, Resta TC, Prossnitz ER, Barton M, 2009. *Regulatory role of G protein-coupled estrogen receptor for vascular function and obesity. Circ. Res.* 104, 288–291.

Haas MJ et al. (2012) *Estrogen-dependent inhibition of dextrose-induced endoplasmic reticulum stress and superoxide generation in endothelial cells. Free Radic. Biol. Med.* 52, 2161–2167.

Hager GL, Lim CS, Elbi C, and Baumann CT (2000) *Trafficking of nuclear receptors in living cells. J Steroid Biochem Mol Biol* 74:249–254.

Hall JM and McDonnell DP (2005) *Coregulators in nuclear estrogen receptor action: from concept to therapeutic targeting. Mol Interv* 5:343–357.

Halligan A, O'Brien E, O'Malley K, Mee F, Atkins N, Conroy R, Walsche J J, Darling M, 1993. *Twenty-four hour blood pressure measurement in primigravid population. Journal of Hypertension* 11, 869-873.

Hammer ES, Cipolla MJ. *Arterial wall hyperplasia is increased in placental compared with myoendometrial radial uterine arteries from late-pregnant rats. Am J Obstet Gynecol* 192: 302–308, 2005.

- Hammes SR and Levin ER (2007) *Extranuclear steroid receptors: nature and actions. Endocr Rev* 28:726–741.
- Han G, Li F, Yu X, and White RE (2013) *GPER: a novel target for non-genomic estrogen action in the cardiovascular system. Pharmacol Res* 71:53–60.
- Handschuh, K., Guibourdenche, J., Tsatsaris, V., Guesnon, M., Laurendeau, I., Evain-Brion, D., Fournier, T., 2007b. *Human chorionic gonadotropin produced by the invasive trophoblast but not the villous trophoblast promotes cell invasion and is down-regulated by peroxisome proliferator-activated receptor-gamma. Endocrinology* 148, 5011–5019.
- Harder DR & Coulson PB (1979). *Estrogen receptors and effects of estrogen on membrane electrical properties of coronary vascular smooth muscle. Journal of Cell Physiology*, 100: 375-382.
- Harrington WR, Sheng S, Barnett DH, Petz LN, Katzenellenbogen JA, and Katzenellenbogen BS (2003) *Activities of estrogen receptor α - and β -selective ligands at diverse estrogen responsive gene sites mediating transactivation or transrepression. Mol Cell Endocrinol* 206:13–22.
- Harris LK, Smith SD, Keogh RJ, Jones RL, Baker PN, Dive V, Knöfler M, Cartwright JE, Whitley GS, Aplin JD, 2010. *Trophoblast- and vascular smooth muscle cell-derived MMP-12 mediates elastolysis during uterine spiral artery remodelling. Am. J. Pathol.*
- Hasbi A, O'Dowd BF, and George SR (2005) *A G protein-coupled receptor for estrogen: the end of the search? Mol Interv* 5:158–161.
- Hayashi T, Fukuto JM, Ignarro LJ & Chaudhuri G (1992). *Basal release of nitric oxide from aortic rings is greater in female rabbits than male rabbits: implications for atherosclerosis. Proceedings of the National Academy of Sciences, USA*, 89: 11259-11263.
- Hayashi T, Yamada K, Esaki T, Kuzuya M, Satake S, Ishikawa T, Hidaka H, and Iguchi A (1995) *Estrogen increases endothelial nitric oxide by a receptor-mediated system. Biochem Biophys Res Commun* 214:847–855.
- Haynes MP, Sinha D, Russell KS, Collinge M, Fulton D, Morales-Ruiz M, Sessa WC, Bender JR, 2000. *Membrane estrogen receptor engagement activates endothelial nitric oxide synthase via the PI3-kinase-Akt pathway in human endothelial cells. Circ. Res.* 87, 677–682.
- Haynes MP, Li L, Russell KS, Bender JR. *Rapid vascular cell responses to estrogen and membrane receptors. Vascul Pharmacol* 2002;38(2):99–108.
- Hees H, Moll W, Wrobel KH, Hees I. *Pregnancy-induced structural changes and trophoblastic invasion in the segmental mesometrial arteries of the guinea pig (Cavia porcellus L.). Placenta* 8:609–626, 1987.
- Heino TJ, Chagin AS and Savendahl L, 2008. *The novel estrogen receptor G-protein-coupled receptor 30 is expressed in human bone. J. Endocrinol.* 197, R1-6.

Heldring N, Pike A, Andersson S, Matthews J, Cheng G, Hartman J, Tujague M, Ström A, Treuter E, and Warner M, et al. (2007) *Estrogen receptors: how do they signal and what are their targets. Physiol Rev* 87:905–931.

Henson MC, Pepe GJ, Albrecht ED: *Regulation of placental low-density lipoprotein uptake in baboons by estrogen: dose-dependent effects of the anti-estrogen ethamoxxytriphethylol (MER-25). Biol Reprod* 45:43-8, 1991.

Hisamoto K, Ohmichi M, Kurachi H et al. (2001). *Estrogen induces the Akt-dependent activation of endothelial nitric-oxide synthase in vascular endothelial cells. Journal of Biological Chemistry*, 276:3459-3467.

Hollestelle SC, De Vries MR, Van Keulen JK, Schoneveld AH, Vink A, Strijder CF, Van Middelaar BJ, Pasterkamp G, Quax PH, De Kleijn DP. *Toll-like receptor 4 is involved in outward arterial remodeling. Circulation* 109: 393–398, 2004.

Holm A, Baldetorp B, Olde B, Leeb-Lundberg LM, Nilsson BO. *The GPER1 agonist G-1 attenuates endothelial cell proliferation by inhibiting DNA synthesis and accumulating cells in the S and G2 phases of the cell cycle. J Vasc Res* 2010;48(4):327–35.

Holm A and Nilsson BO, 2013. *Identification and characterization of new mechanisms in vascular oestrogen signalling. Basic Clin. Pharmacol. Toxicol.* 113, 287-293.

Hsueh AJ, Peck EJ, Jr., Clark JH: *Progesterone antagonism of the oestrogen receptor and oestrogen-induced uterine growth. Nature* 254:337-9, 1975.

Huang A, Sun D, Koller A & Kaley G (2000). *17beta-estradiol restores endothelial nitric oxide release to shear stress in arterioles of male hypertensive rats. Circulation*, 101: 94-100.

Huang GZ and Woolley CS (2012) *Estradiol acutely suppresses inhibition in the hippocampus through a sex-specific endocannabinoid and mGluR-dependent mechanism. Neuron* 74, 801–808.

Huppertz, B., Sammar, M., Chefetz, I., Neumaier-Wagner, P., Bartz, C., Meiri, H., 2008. *Longitudinal determination of serum placental protein 13 during development of preeclampsia. Foetal Diagn. Ther.* 24, 230–236.

Hutchens MP, Fujiyoshi T, Komers R, Herson PS and Anderson S, 2012. *Estrogen protects renal endothelial barrier function from ischemia-reperfusion in vitro and in vivo. Am. J. Physiol. Renal Physiol.* 303, F377-385.

Ignar-Trowbridge DM et al. (1992) *Coupling of dual signaling pathways: epidermal growth factor action involves the estrogen receptor. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 89, 4658–4662.

Isensee J, Meoli L, Zazzu V, Nabzdyk C, Witt H, Soewarto D, Effertz K, Fuchs H, Gailus-Durner V, Busch D, Adler T, de Angelis MH, Irgang M, Otto C, Noppinger

PR. *Expression pattern of G protein-coupled receptor 30 in LacZ reporter mice. Endocrinology* 150: 1722–1730, 2009.

Jacob J, Sebastian KS, Devassy S, Priyadarsini L, Farook MF, Shameem A, Mathew D, Sreeja S, and Thampan RV (2006) *Membrane estrogen receptors: genomic actions and post transcriptional regulation. Mol Cell Endocrinol* 246:34–41.

Jacquet P, Gerber GB, Leonard A, Maes J. *Plasma hormone levels in normal and lead-treated pregnant mice. Experientia.* 1977 Oct 15;33(10):1375-7.

Jeevaratnam K, Nadarajah VD, Judson JP, Nalliah S, Abdullah MF: *Periodic assessment of Plasma sFlt-1 and PlGF concentrations and its association with placental morphometry in gestational hypertension (GH) – a prospective follow-up study. BMC Pregnancy Childbirth* 2010; 10: 58.

Jensen EV, DeSombre ER, *Estrogen-receptor interaction, Science* 182 (108) (1973) 126-134.

Jensen EV, Jacobson HI, *Basic guides to the mechanism of estrogen action, Recent Prog.Horm. Res.* 18 (1962) 387-414.

Jordan VC. *SERMs: meeting the promise of multifunctional medicines. J Natl Cancer Inst* 2007;99:350–6.

Jose SO, Ramadoss J, Koch JM, Jiang Y, Zheng J, Magness RR. *Estradiol-17 beta and its cytochrome P450- and catechol-Omethyltransferase-derived metabolites stimulate proliferation in uterine artery endothelial cells: role of estrogen receptor-alpha versus estrogen receptor-beta. Hypertension* 2010;55:1005–11.

Kanda, N., Watanabe, S., 2003. *17beta-estradiol inhibits oxidative stress-induced apoptosis in keratinocytes by promoting Bcl-2 expression. J. Invest. Dermatol.*121, 1500–1509.

Kanda N and Watanabe S, 2004. *17beta-estradiol stimulates the growth of human keratinocytes by inducing cyclin D2 expression. J. Invest. Dermatol.* 123, 319-328.

Kang S, Liu Y, Sun D, Zhou C, Liu A, Xu C, Hao Y, Li D, Yan C and Sun H, 2012. *Chronic activation of the G protein-coupled receptor 30 with agonist G-1 attenuates heart failure. PLoS One* 7, e48185.

Kanel WB, Hjortland MC, McNamara PM & Gordon T (1976). *Menopause and risk of cardiovascular disease: the Framingham study. Annals of Internal Medicine*, 85: 447-452.

Kato S et al. (2000) *Molecular mechanism of a cross-talk between oestrogen and growth factor signalling pathways. Genes Cells* 5, 593–601.

Katzenellenbogen BS, Montano MM, Ediger TR, Sun J, Ekena K, Lazennec G, Martini PG, McInerney EM, Delage-Mourroux R, Weis K, et al. (2000) *Estrogen receptors: selective ligands, partners, and distinctive pharmacology. Recent Prog Horm Res* 55:163–193; discussion 194–195.

Kaufmann P, Black S, Huppertz B. *Endovascular trophoblast invasion: implications for the pathogenesis of intrauterine growth retardation and preeclampsia. Biol Reprod* 69: 1–7, 2003.

Kelly B, Stone S, Poston L. *Cardiovascular adaptation to pregnancy: the role of altered vascular structure. Fetal Matern Med Rev* 11: 105–116, 1999.

Keogh RJ, Harris LK, Freeman A, Baker PN, Aplin, JD, Whitley GS, Cartwright JE, 2007. *Foetal-derived trophoblast use the apoptotic cytokine tumor necrosis factor-alpha-related apoptosis-inducing ligand to induce smooth muscle cell death. Circ. Res.* 100, 834–841.

Keyes LE, Moore LG, Walchak SJ, Dempsey EC. *Pregnancy-stimulated growth of vascular smooth muscle cells: importance of protein kinase C dependent synergy between estrogen and platelet-derived growth factor. J Cell Physiol* 166:22–32, 1996.

Keyes LE, Majack R, Dempsey EC, Moore LG. *Pregnancy stimulation of DNA synthesis and uterine blood flow in the guinea pig. Pediatr Res* 41:708–715, 1997.

Kharfi, A., Giguere, Y., Sapin, V., Masse, J., Dastugue, B., Forest, J.C., 2003. *Trophoblastic remodeling in normal and preeclamptic pregnancies: implication of cytokines. Clin. Biochem.* 36, 323–331.

Khosla S et al. (1997) *Effects of age and estrogen status on serum parathyroid hormone levels and biochemical markers of bone turnover in women: a population-based study. J. Clin. Endocrinol. Metab.* 82, 1522–1527.

Kim KH, Moriarty K, Bender JR. *Vascular cell signaling by membrane estrogen receptors. Steroids* 2008;73(9–10):864–9.

Kim KH and Bender JR (2009) *Membrane-initiated actions of estrogen on the endothelium. Mol Cell Endocrinol* 308:3–8.

Kim KH, Toomre D, and Bender JR (2011) *Splice isoform estrogen receptors as integral transmembrane proteins. Mol Biol Cell* 22:4415–4423.

King AE, Critchley HO, 2010. *Oestrogen and progesterone regulation of inflammatory processes in the human endometrium. J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* 31;120(2-3):116-26.

Kishi Y, Numano F, 1982. *A study of the mechanism of estrogen as an antiatherosclerotic: the inhibitory effect of estrogen on A23187-induced contraction of the aortic wall. Mech. Ageing Dev.* 18, 115–123.

Kitazawa T, Hamada E, Kitazawa K & Gaznabi AK (1997). *Nongenomic mechanism of 17 beta-oestradiol-induced inhibition of contraction in mammalian vascular smooth muscle. Journal of Physiology*, 499 (Part 2): 497-511.

Kleinert H, Wallerath T, Euchenhofer C, Ihrig-Biedert I, Li H, and Förstermann U (1998) *Estrogens increase transcription of the human endothelial NO synthase gene: analysis of the transcription factors involved. Hypertension* 31:582–588.

Kleppisch T and Nelson MA (1995) *ATP-sensitive K_v currents in cerebral arterial smooth muscle: pharmacological and hormonal modulation.* *Am J Physiol* 269:H1634–H1640.

Kleuser B, Malek D, Gust R, Pertz HH, Potteck H, 2008. *17 β -estradiol inhibits transforming growth factor- β signalling and function in breast cancer cells via activation of extracellular signal-regulated kinase through the G protein coupled receptor 30.* *Mol. Pharmacol.* 74, 1533–1543.

Klotz DM et al. (2002) *Requirement of estrogen receptor-alpha in insulin-like growth factor-1 (IGF-1)-induced uterine responses and in vivo evidence for IGF-1/estrogen receptor cross-talk.* *J. Biol. Chem.* 277, 8531–8537.

Knot HJ, Lounsbury KM, Brayden JE, Nelson MT. *Gender differences in coronary artery diameter reflect changes in both endothelial Ca²⁺ and eNOS activity.* *Am J Physiol.* 1999; 276:H961–H969.

Koganti S, Snyder R, Gumaste U, Karamyan VT and Thekkumkara T, 2013. *2-Methoxyestradiol binding of GPR30 down-regulates angiotensin AT receptor.* *Eur. J.Pharmacol.* 723C, 131-140.

Kotov A. et al. (1999) *Regulation of estrogen activity by sulfation in human Ishikawa endometrial adenocarcinoma cells.* *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* 68, 137–144

Krantz D, Goetzl L, Simpson JL, Thom E, Zachary J, Hallahan TW, Silver R, Pergament E, Platt LD, Filkin, K, et al., 2004. *Association of extreme firsttrimester free human chorionic gonadotropin-beta, pregnancy-associated plasma protein A, and nuchal translucency with intrauterine growth restriction and other adverse pregnancy outcomes.* *Am. J. Obstet. Gynecol.* 191, 1452–1458.

Krug AW, Pojoga LH, Williams GH, Adler GK. *Cell membrane-associated mineralocorticoid receptors? New evidence.* *Hypertension.* 2011 Jun;57(6):1019-25.

Kuiper GG, Enmark E, Pelto-Huikko M, Nilsson S, Gustafsson JA, *Cloning of a novel receptor expressed in rat prostate and ovary,* *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 93 (12) (1996) 5925-5930.

Kuiper GG, Carlsson B, Grandien K, Enmark E, Häggblad J, Nilsson S, and Gustafsson JA (1997) *Comparison of the ligand binding specificity and transcript tissue distribution of estrogen receptors alpha and beta.* *Endocrinology* 138:863–870.

Kumar P, Wu Q, Chambliss KL, Yuhanna IS, Mumby SM, Mineo C, Tall GG, Shaul PW, 2007. *Direct interactions with G alpha i and G betagamma mediate nongenomic signaling by estrogen receptor alpha.* *Mol. Endocrinol.* 21, 1370–1380.

Lafferty AR, Torpy DJ, Stowasser M, Taymans SE, Lin JP, Huggard P, Gordon RD, Stratakis CA, 2000. *Anovel genetic locus for lowreninhypertension: familial hyperaldosteronism type II maps to chromosome 7 (7p22).* *J. Med. Genet.* 37,831–835.

- Landon MB, Gabbe SG: *Fetal surveillance in the pregnancy complicated by diabetes mellitus. Clin Obstet Gynecol* 34:535-43, 1991.
- Lang U, Baker RS, Braems G, Zygmunt M, Kunzel W, Clark KE. Uterine blood flow: a determinant of fetal growth. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol* 110, Suppl 1: S55–S61, 2003.
- Langille BL. Arterial remodeling: relation to hemodynamics. *Can J Physiol Pharmacol* 74: 834–841, 1996.
- Lappano R, Rosano C, De Marco P, De Francesco EM, Pezzi V, and Maggiolini M (2010) *Estradiol acts as a GPR30 antagonist in estrogen receptor-negative breast cancer cells. Mol Cell Endocrinol* 320:162–170.
- Lappano R, Rosano C, Santolla MF, Pupo M, De Francesco EM, De Marco P, Ponassi M, Spallarossa A, Ranise A and Maggiolini M, 2012a. *Two novel GPER agonists induce gene expression changes and growth effects in cancer cells. Curr. Cancer Drug Targets* 12, 531-542.
- Lappano R, Santolla MF, Pupo M, Sinicropi MS, Caruso A, Rosano C and Maggiolini M, 2012b. *MIBE acts as antagonist ligand of both estrogen receptor alpha and GPER in breast cancer cells. Breast Cancer Res.* 14, R12.
- Lappano R, De Marco P, De Francesco EM, Chimento A, Pezzi V and Maggiolini M, 2013. *Cross-talk between GPER and growth factor signaling. J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* 137, 50-56.
- Lappano R, Pisano A, and Maggiolini M (2014) *GPER Function in Breast Cancer: An Overview. Front Endocrinol (Lausanne)* 5:66.
- La Rosa P, Pesiri V, Leclercq G, Marino M, and Acconcia F (2012) *Palmitoylation regulates 17 β -estradiol-induced estrogen receptor- α degradation and transcriptional activity. Mol Endocrinol* 26:762–774.
- Learmont JG, Cockell AP, Knock GA, Poston L. *Myogenic and flow-mediated responses in isolated mesenteric small arteries from pregnant and nonpregnant rats. Am J Obstet Gynecol.* 1996 May;174(5):1631-6.
- Lees MH, Hill JD, Ochsner AJ, Thomas CL, Novy MJ. *Maternal placental and myometrial blood flow of the rhesus monkey during uterine contractions. Am J Obstet Gynecol* 1971;110:68–81.
- Leiberman JR, Wiznitzer A, Glezerman M, Feldman B, Levy J, Sharoni Y. *Estrogen and progesterone receptors in the uterine artery of rats during and after pregnancy. Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol.* 1993 Sep;51(1):35-40.
- Lekontseva O, Chakrabarti S, Jiang Y, Cheung CC, Davidge ST. *Role of neuronal nitric-oxide synthase in estrogen-induced relaxation in rat resistance arteries. J Pharmacol Exp Ther.* 2011 Nov;339(2):367-75.

- Lenhart PM, Broselid S, Barrick CJ, Leeb-Lundberg LM, and Caron KM (2013) *Gprotein-coupled receptor 30 interacts with receptor activity-modifying protein 3 and confers sex-dependent cardioprotection. J Mol Endocrinol* 51:191–202.
- Li C et al. (2001) *Requirement of Sp1 and estrogen receptor alpha interaction in 17beta-estradiol-mediated transcriptional activation of the low density lipoprotein receptor gene expression. Endocrinology* 142, 1546–1553.
- Li Y, Birnbaumer L and Teng CT, 2010. *Regulation of ERRalpha gene expression by estrogen receptor agonists and antagonists in SKBR3 breast cancer cells: differential molecular mechanisms mediated by g protein-coupled receptor GPR30/GPER-1. Mol. Endocrinol.* 24,969-980.
- Li ZL, Liu JC, Liu SB, Li XQ, Yi DH and Zhao MG, 2012. *Improvement of vascular function by acute and chronic treatment with the GPR30 agonist G1 in experimental diabetes mellitus. PLoS One* 7, e38787.
- Liggett SB (2011) *Phosphorylation barcoding as a mechanism of directing GPCR signaling. Sci Signal* 4:pe36.
- Lin Y, Smrcka AV, 2011. *Understanding molecular recognition by G protein β subunits on the path to pharmacological targeting. Mol. Pharmacol.* 80, 551e557.
- Lincoln TM, Cornwell TL, Taylor AE. *CGMP-dependent protein kinase mediates the reduction of Ca²⁺ by cAMP in vascular smooth muscle cells. Am J Physiol Cell Physiol* 1990;258:C399–407.
- Lin AH, Li RW, Ho EY, Leung GP, Leung SW, Vanhoutte PM, and Man RY (2013) *Differential ligand binding affinities of human estrogen receptor-a isoforms. PLoS ONE* 8:e63199.
- Lindberg BS, Johansson ED, Nilsson BA: *Plasma levels of nonconjugated oestrone, oestradiol-17beta and oestriol during uncomplicated pregnancy. Acta Obstet Gynecol Scand Suppl* 32:21-36, 1974.
- Lindsey SH, Cohen JA, Brosnihan KB, Gallagher PE, Chappell MC. *Chronic treatment with the G protein-coupled receptor 30 agonist G-1 decreases blood pressure in ovariectomized mRen2.Lewis rats. Endocrinology* 2009;150(8):3753–8.
- Lindsey SH, Yamaleyeva LM, Brosnihan KB, Gallagher PE, Chappell MC, 2011. *Estrogen receptor GPR30 reduces oxidative stress and proteinuria in the salt-sensitive female mRen2.Lewis rat. Hypertension* 58, 665e671.
- Lindsey SH, Carver KA, Prossnitz ER, Chappell MC. *Vasodilation in response to the GPR30 agonist G-1 is not different from estradiol in the mRen2.Lewis female rat. J Cardiovasc Pharmacol.* 2011b May;57(5):598-603.
- Lindsey SH, da Silva AS, Silva MS and Chappell MC, 2013a. *Reduced vasorelaxation to estradiol and G-1 in aged female and adult male rats is associated with GPR30 downregulation. Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* 305, E113-118.

- Lindsey SH, Liu L and Chappell MC, 2013b. *Vasodilation by GPER in mesenteric arteries involves both endothelial nitric oxide and smooth muscle cAMP signaling. Steroids.*
- Lindsey SH, Liu L, and Chappell MC (2014) *Vasodilation by GPER in mesenteric arteries involves both endothelial nitric oxide and smooth muscle cAMP signaling. Steroids* 81:99–102.
- Ling S, Deng G, Ives HE et al. (2001) *Estrogen inhibits mechanical strain-induced mitogenesis in human vascular smooth muscle cells via down-regulation of Sp-1. Cardiovasc. Res.* 50, 108–114
- Ling S, Little PJ, Williams MR et al. (2002) *High glucose abolishes the antiproliferative effect of 17 β -estradiol in human vascular smooth muscle cells. Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* 282, E746–E751.
- Ling S, Dai A, Williams MRI et al. (2004) *The isoflavone metabolite cis-tetrahydrodazein inhibits ERK-1 activation and proliferation in human vascular smooth muscle cells. J. Cardiovasc. Pharmacol.* 43,622–628.
- Liu Y et al. (2008) *The genome landscape of ERalpha- and ERbetabinding DNA regions. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 105, 2604–2609.
- Liu MM et al. (2002) *Opposing action of estrogen receptors alpha and beta on cyclin D1 gene expression. J. Biol. Chem.* 277, 24353–24360.
- Liverman CS, Brown JW, Sandhir R, McCarson KE, and Berman NE (2009) *Role of the oestrogen receptors GPR30 and ERalpha in peripheral sensitization: relevance to trigeminal pain disorders in women. Cephalalgia* 29:729–741.
- Loufrani L, Henrion D. *Role of the cytoskeleton in flow (shear stress)-induced dilation and remodeling in resistance arteries. Med Biol Eng Comput* 46: 451–460, 2008.
- Lombardi G, Zarrilli S, Colao A, Paesano L, Di Somma C, Rossi F, De Rosa M, *Estrogens and health in males, Mol. Cell. Endocrinol.* 178 (1-2) (2001) 51-55.
- Lóránd T, Vigh E, and Garai J (2010) *Hormonal action of plant derived and anthropogenic non-steroidal estrogenic compounds: phytoestrogens and xenoestrogens. Curr Med Chem* 17:3542–3574.
- Lu Q, Pallas DC, Surks HK, Baur WE, Mendelsohn ME, and Karas RH (2004) *Striatin assembles a membrane signaling complex necessary for rapid, nongenomic activation of endothelial NO synthase by estrogen receptor α . Proc Natl Acad Sci U S A* 101:17126–17131.
- Lunell, N.O., Nylund, L.E., Lewander, R., Sarby, B., 1982. *Uteroplacental blood flow in pre-eclampsia measurements with indium-113m and a computer-linked gamma camera. Clin. Exp. Hypertens. B.* 1, 105–117.
- Luttrell LM and Miller WE (2013) *Arrestins as regulators of kinases and phosphatases. Prog Mol Biol Transl Sci* 118:115–147.

Lyll F. *Priming and remodelling of human placental bed spiral arteries during pregnancy: a review.* *Placenta* 26, Suppl A: S31–S36, 2005.

Lindsey SH, Chappell MC. *Evidence that the G protein-coupled membrane receptor GPR30 contributes to the cardiovascular actions of estrogen.* *Gen Med.* 2011 Dec;8(6):343-54.

Lindsey SH, Carver KA, Prossnitz ER, Chappell MC. *Vasodilation in response to the GPR30 agonist G-1 is not different from estradiol in the mRen2.Lewis female rat.* *J Cardiovasc Pharmacol.* 2011b; 57:598–603.

Ma Y, Qiao X, Falone AE, Reslan OM, Sheppard SJ, Khalil RA. *Gender-specific reduction in contraction is associated with increased estrogen receptor expression in single vascular smooth muscle cells of female rat.* *Cell Physiol Biochem* 2011;26(3):457–70.

Mackey K, Meyer MC, Stirewalt WS, Starcher BC, McLaughlin MK. *Composition and mechanics of mesenteric resistance arteries from pregnant rats.* *Am J Physiol.* 1992 Jul;263(1 Pt 2):R2-8.

Madak-Erdogan Z, Kieser KJ, Kim SH, Komm B, Katzenellenbogen JA, Katzenellenbogen BS. *Nuclear and extranuclear pathway inputs in the regulation of global gene expression by estrogen receptors.* *Mol Endocrinol* 2008;22:2116–27.

Madeo A and Maggiolini M (2010) *Nuclear alternate estrogen receptor GPR30 mediates 17beta-estradiol-induced gene expression and migration in breast cancer associated fibroblasts.* *Cancer Res* 70:6036–6046.

Maggiolini M, Vivacqua A, Fasanella G, Recchia AG, Sisci D, Pezzi V, Montanaro D, Musti AM, Picard D, Ando S, 2004. *The G protein-coupled receptor GPR30 mediates c-fos up-regulation by 17beta-estradiol and phytoestrogens in breast cancer cells.* *J. Biol. Chem.* 279, 27008–27016.

Magness RR, Rosenfeld CR. *Local and systemic estradiol-17beta: effects on uterine and systemic vasodilation.* *Am J Physiol.* 1989 Apr;256(4 Pt 1):E536-42.

Magness RR. *Maternal cardiovascular and other physiologic responses to the endocrinology of pregnancy.* In: Bazer FW, editor. *The endocrinology of pregnancy.* Totowa: Humana Press; 1999. p. 507-39.

Maiti K, Paul JW, Read M, Chan EC, Riley SC, Nahar P, Smith R, 2011. *G-1-activated membrane estrogen receptors mediate increased contractility of the human myometrium.* *Endocrinol* 152, 2448e2455.

Mandala M, Osol G. *Physiological remodelling of the maternal uterine circulation during pregnancy.* *Basic Clin Pharmacol Toxicol.* 2012 Jan;110(1):12-8.

Mandalà M, Gokina N, Barron C, Osol G. *Endothelial-derived hyperpolarization factor (EDHF) contributes to PlGF-induced dilation of mesenteric resistance arteries from pregnant rats.* *J Vasc Res.* 2012;49(1):43-9.

Marchi N, Tierney W, Alexopoulos AV, Puvenna V, Granata T, Janigro D. *The etiological role of blood-brain barrier dysfunction in seizure disorders. Cardiovasc Psychiatry Neurol* 2011;482415, 2011.

Margueron R, Duong V, Bonnet S, Escande A, Vignon F, Balaguer P, and Cavailles V (2004) *Histone deacetylase inhibition and estrogen receptor alpha levels modulate the transcriptional activity of partial antiestrogens. J Mol Endocrinol* 32:583–594.

Mårtensson UE, Salehi SA, Windahl S, Gomez MF, Sward K, Daszkiewicz-Nilsson J, Wendt A, Andersson N, Hellstrand P, Grande PO, Owman C, Rosen CJ, Adamo ML, Lundquist I, Rorsman P, Nilsson BO, Ohlsson C, Olde B, Leeb-Lundberg LM, 2009. *Deletion of the G protein-coupled receptor 30 impairs glucose tolerance, reduces bone growth, increases blood pressure, and eliminates estradiol-stimulated insulin release in female mice. Endocrinology* 150, 687–698.

Martin MB et al. (2000) *A role for Akt in mediating the estrogenic functions of epidermal growth factor and insulin-like growth factor I. Endocrinology* 141, 4503–4511.

Martinez C, Sanchez M, Hidalgo A & Garcia de Boto MJ (2001). *Involvement of K(ATP) channels in diethylstilbestrol-induced relaxation in rat aorta. European Journal of Pharmacology*, 413: 109-116.

Mata KM, Li W, Reslan OM, Siddiqui WT, Opsasnick LA, Khalil RA. *Adaptive Increases in Expression and Vasodilator Activity of Estrogen Receptor Subtypes in Blood Vessel-Specific Pattern during Pregnancy. Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2015 Sep 25:ajpheart.00532.2015.

Mateev SN, Mouser R, Young DA, Mecham RP, Moore LG. *Chronic hypoxia augments uterine artery distensibility and alters the circumferential wall stress-strain relationship during pregnancy. J Appl Physiol* 100: 1842–1850, 2006.

Matsuda K et al. (2008) *Expression and intracellular distribution of the G protein-coupled receptor 30 in rat hippocampal formation. Neurosci. Lett.* 441, 94–99.

Matsuzawa Y, Suematsu S, Saito J, Omura M and Nishikawa T, 2013. *Vascular Aldosterone Production at the Pre-Diabetic Stage of Young Otsuka Long-Evans Tokushima Fatty (OLETF) Rats, Compared with Long-Evans Tokushima Otsuka (LETO) Rats. Molecules* 18,15636-15647.

Maynard SE, Min JY, Merchan J, Lim KH, Li J, Mondal S, Libermann TA, Morgan JP, Sellke FW, Stillman IE, Epstein FH, Sukhatme VP, Karumanchi SA: *Excess placental soluble fms-like tyrosine kinase 1 (sFlt1) may contribute to endothelial dysfunction, hypertension, and proteinuria in preeclampsia. J Clin Invest* 2003; 111: 649–658.

Maynard SE, Venkatesha S, Thadhani R, Karumanchi SA. Soluble Fms-like tyrosine kinase 1 and endothelial dysfunction in the pathogenesis of preeclampsia. *Pediatr Res* 2005;57:1–7.

McCurley A, Pires PW, Bender SB, Aronovitz M, Zhao MJ, Metzger D, Chambon P, Hill MA, Dorrance AM, Mendelsohn ME and Jaffe IZ, 2012. *Direct regulation of blood pressure by smooth muscle cell mineralocorticoid receptors. Nat. Med.* 18, 1429-1433.

McDonnell DP and Wardell SE (2010) *The molecular mechanisms underlying the pharmacological actions of ER modulators: implications for new drug discovery in breast cancer. Curr Opin Pharmacol* 10:620–628.

Mendelsohn ME, Karas RH, 1999. *The protective effects of estrogen on the cardiovascular system. N. Engl. J. Med.* 340, 1801–1811.

Merchant SJ, Davidge ST. *The role of matrix metalloproteinases in vascular function: implications for normal pregnancy and preeclampsia. BJOG* 2004;111:931–9.

Mercier I, Mader S, Calderone A, 2003. *Tamoxifen and ICI 182,780 negatively influenced cardiac cell growth via an estrogen receptor-independent mechanism. Cardiovasc. Res.* 59, 883–892.

Meyer MC, Brayden JE, McLaughlin MK 1993. *Characteristics of vascular smooth muscle in the maternal resistance circulation during pregnancy in the rat. American Journal of Obstetrics and Gynaecology* 169, 1510-1516.

Meyer MR, Haas E, Barton M, 2006. *Gender differences of cardiovascular disease: new perspectives for estrogen receptor signaling. Hypertension* 47, 1019–1026.

Meyer MR, Haas E, Prossnitz ER, Barton M. *Non-genomic regulation of vascular cell function and growth by estrogen. Mol Cell Endocrinol* 2009;308(1–2):9–16.

Meyer MR, Baretella O, Prossnitz ER, Barton M. *Dilation of epicardial coronary arteries by the G protein-coupled estrogen receptor agonists G-1 and ICI 182,780. Pharmacology* 2010;86(1):58–64.

Meyer MR, Clegg DJ, Prossnitz ER, Barton M, 2011a. *Obesity, insulin-resistance, and diabetes: sex differences and role of oestrogen receptors. Acta Physiol. (Oxf)* 203, 259e269.

Meyer MR, Prossnitz ER, Barton M, 2011b. *The G protein-coupled estrogen receptor GPER/GPR30 as a regulator of cardiovascular function. Vasc. Pharmacol.* 55, 17e25.

Meyer MR, Amann K, Field AS, Hu C, Hathaway HJ, Kanagy NL, et al. *Deletion of G protein-coupled estrogen receptor increases endothelial vasoconstriction. Hypertension* 2012;59(2):507–12.

Meyer MR, Fredette NC, Howard TA, Hu C, Ramesh C, Daniel C, Amann K, Arterburn JB, Barton M, Prossnitz ER, 2014. *G protein-coupled estrogen receptor protects from atherosclerosis. Sci. Rep.* 4, 7564.

Meyers MJ, Sun J, Carlson KE, Marriner GA, Katzenellenbogen BS, and Katzenellenbogen JA (2001) *Estrogen receptor- β potency-selective ligands: structure activity relationship studies of diarylpropionitriles and their acetylene and polar analogues. J Med Chem* 44:4230–4251.

Meschia G. *Circulation to female reproductive organs. In: Greep RO, Astwood EB, editors. Handbook of physiology: the cardiovascular system. Vol 3: Peripheral circulation and organ blood flow. Washington (DC): American Physiological Society; 1983. p. 241-69.*

Metcalf J, Romney SL, Ramsey LH, Reid DE, Burwell CS. *Estimation of uterine blood flow in normal human pregnancy at term. J Clin Invest* 34:1632–1638, 1955.

Miller VM, Duckles SP, *Vascular actions of estrogens: functional implications Pharmacol Rev.* 2008 Jun; 60(2): 210–241.

Mintz PJ, Habib NA, Jones LJ, Giamas G, Lewis JS, Bowen RL, Coombes RC, and Stebbing J (2008) *The phosphorylated membrane estrogen receptor and cytoplasmic signaling and apoptosis proteins in human breast cancer. Cancer* 113:1489–1495.

Misso ML et al. (2005) *Adipose aromatase gene expression is greater in older women and is unaffected by postmenopausal estrogen therapy. Menopause* 12, 210–215.

Mizutani K, Ikeda K and Yamori Y (2000) *Resveratrol inhibits AGEs-induced proliferation and collagen synthesis activity in vascular smooth muscle cells from stroke-prone spontaneously hypertensive rates. Biochem. Biophys. Res. Commun.* 274, 61–67.

Moll W, Kunzel W, Herberger J. *Hemodynamic implications of hemochorial placentation. Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol* 5: 67–74, 1975.

Moll W, Kunzel W. *The blood pressure in arteries entering the placentae of guinea pigs, rats, rabbits, and sheep. Pflugers Arch* 338: 125–131, 1973.

Moll W, Espach A, Wrobel KH. *Growth of mesometrial arteries in guinea pigs during pregnancy. Placenta* 4: 111–123, 1983.

Moll W. *Structure adaptation and blood flow control in the uterine arterial system after hemochorial placentation. Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol* 110, Suppl 1: S19–S27, 2003.

Molvarec A, Szarka A, Walentin S, Szucs E, Nagy B, Rigo J Jr: *Circulating angiogenic factors determined by electrochemiluminescence immunoassay in relation to the clinical features and laboratory parameters in women with pre-eclampsia. Hypertens Res* 2010; 33: 892–898.

Moreira IS (2014) *Structural features of the G-protein/GPCR interactions. Biochim Biophys Acta* 1840:16–33.

- Morey AK, Pedram A, Razandi M et al. (1997) *Estrogen and progesterone inhibit vascular smooth muscle proliferation. Endocrinology* 138, 3330–3339.
- Moriarty K, Kim KH, and Bender JR (2006) *Minireview: Estrogen receptor-mediated rapid signaling. Endocrinology* 147:5557–5563.
- Morris EA, Hale SA, Badger GJ, Magness RR, Bernstein I M. *Pregnancy induces persistent changes in vascular compliance in primiparous women. Am J Obstet Gynecol.* 2015 May;212(5):633.
- Mukherjee T K, Dinh H, Chaudhuri G and Nathan L. (2002) *Testosterone attenuates expression of vascular cell adhesion molecule-1 by conversion to estradiol by aromatase in endothelial cells: implications in atherosclerosis. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 99,4055–4060.
- Mügge A, Riedel M, Barton M, Kuhn M, Lichtlen PR, 1993. *Endothelium independent relaxation of human coronary arteries by 17 beta-oestradiol in vitro. Cardiovasc. Res.* 27, 1939–1942.
- Mugge A, Riedel M, Barton M, Kuhn M, Lichtlen PR. *Endothelium independent relaxation of human coronary arteries by 17 beta-oestradiol in vitro. Cardiovasc Res* 1993;27:1939–42.
- Mulvany MJ. *Vascular remodelling of resistance vessels: can we define this? Cardiovasc Res* 41:9–13, 1999.
- Murata T, Dietrich HH, Xiang C and Dacey RG Jr., 2013. *G Protein-Coupled Estrogen Receptor Agonist Improves Cerebral Microvascular Function After Hypoxia/Reoxygenation Injury in Male and Female Rats. Stroke.*
- Murphy, V.E., Smith, R., Giles, W.B., Clifton, V.L., 2006. *Endocrine regulation of human foetal growth: the role of the mother, placenta, and foetus. Endocr. Rev.* 27, 141–169.
- Myers JE, Merchant SJ, Macleod M, Mires GJ, Baker PN, Davidge ST. *MMP-2 levels are elevated in the plasma of women who subsequently develop preeclampsia. Hypertens Pregnancy* 24:103–115, 2005.
- Nanaev A, Chwalisz K, Frank HG, Kohnen G, Hegele-Hartung C, Kaufmann P. *Physiological dilation of uteroplacental arteries in the guinea pig depends on nitric oxide synthase activity of extravillous trophoblast. Cell Tissue Res* 282:407–421, 1995.
- Nathan L, Pervin S, Singh R, Rosenfeld M and Chaudhuri G (1999) *Estradiol inhibits leukocyte adhesion and transendothelial migration in rabbit in vivo: possible mechanisms for gender differences in atherosclerosis. Circ. Res.* 85, 377–385.
- Natoli AK, Medley TL, Ahimastos AA, Drew BG, Thearle DJ, Dilley RJ, Kingwell BA. *Sex steroids modulate human aortic smooth muscle cell matrix protein deposition and matrix metalloproteinase expression. Hypertension* 46: 1129–1134, 2005.

Nelson SH, Steinsland OS, Wang Y, Yallampalli C, Dong YL, Sanchez JM. *Increased nitric oxide synthase activity and expression in the human uterine artery during pregnancy. Circ Res* 2000;87:406–11.

Nelson LR, Bulun SE. *Estrogen production and action. J Am Acad Dermatol.* 2001 Sep;45(3 Suppl):S116-24.

Nicolaides, K.H., Bindra, R., Turan, O.M., Chefetz, I., Sammar, M., Meiri, H., Tal, J., Cuckle, H.S., 2006. *A novel approach to first-trimester screening for early preeclampsia combining serum PP-13 and Doppler ultrasound. Ultrasound Obstet. Gynecol.* 27, 13–17.

Nienartowicz A, Link S, Moll W. *Adaptation of the uterine arcade in rats to pregnancy. J Dev Physiol* 12: 101–108, 1989.

Nickenig G, Strehlow K, Wassmann S, Baumer AT, Albory K, Sauer H & Bohm M (2000). *Differential effects of estrogen and progesterone on AT(1) receptor gene expression in vascular smooth muscle cells. Circulation,* 102: 1828-1833.

Nigro D, Fortes ZB, Scivoletto R & Carvalho MHC (1990). *Simultaneous release of endothelium-derived relaxing and contracting factors induced by noradrenaline in normotensive rats. General Pharmacology,* 21: 443-446.

Noris M, Morigi, M, Donadelli, R, Aiello S, Foppolo M, Todeschini M, Orisio S, Remuzzi G, Remuzzi A (1995). *Nitric oxide synthesis by cultured endothelial cells is modulated by flow conditions. Circulation Research* 76, 536-543.

Norman PE and Powell JT, 2014. *Vitamin d and cardiovascular disease. Circ. Res.* 114, 379-393.

Odorisio T, Schietroma C, Zaccaria ML, Cianfarani F, Tiveron C, Tatangelo L et al. *Mice overexpressing placenta growth factor exhibit increased vascularization and vessel permeability. J Cell Sci* 2002;115:2559–67.

O'Dowd BF, Nguyen T, Marchese A, Cheng R, Lynch KR, Heng HH, Kolakowski LF Jr, George SR. *Discovery of three novel G-protein-coupled receptor genes. Genomics* 1998;47(2):310–313.

Okamoto T, Schlegel A, Scherer PE, Lisanti MP, 1998. *Caveolins, a family of scaffolding proteins for organizing “preassembled signaling complexes” at the plasma membrane. J. Biol. Chem.* 273, 5419–5422.

Okano H, Jayachandran M, Yoshikawa A, and Miller VM (2006) *Differential effects of chronic treatment with estrogen receptor ligands on regulation of nitric oxide synthase in porcine aortic endothelial cells. J Cardiovasc Pharmacol* 47:621–628.

Okulicz, W.C., Savasta, A.M., Hoberg, L.M., Longcope, C., 1989. *Immunofluorescent analysis of estrogen induction of progesterone receptor in the rhesus uterus. Endocrinology* 125, 930–934.

Olesen KM and Auger AP (2008) *Dopaminergic activation of estrogen receptors induces fos expression within restricted regions of the neonatal female rat brain. PLoS ONE* 3, e2177.

O'Lone R et al. (2004) *Genomic targets of nuclear estrogen receptors. Mol. Endocrinol.* 18, 1859–1875.

Ong SS, Baker PN, Mayhew TM, Dunn WR. *Remodeling of myometrial radial arteries in preeclampsia. Am J Obstet Gynecol* 192: 572–579, 2005.

Orshal JM, Khalil RA. *Gender, sex hormones, and vascular tone. Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol.* 2004; 286:R233–R249.

Osanai T, Yamada M, Okumura K. *Nongenomic response to aldosterone. Hypertension.* 2011 Aug;58(2):e3.

Ososki AL and Kennelly EJ (2003) *Phytoestrogens: a review of the present state of research. Phytother Res* 17:845–869.

Osol G, Cipolla M. *Pregnancy-induced changes in the threedimensional mechanical properties of pressurized rat uteroplacental (radial) arteries. Am J Obstet Gynecol* 1993;168:268-74.

Osol G, Celia G, Gokina N, Barron C, Chien E, Mandala M, Luksha L, Kublickiene K. *Placental growth factor is a potent vasodilator of rat and human resistance arteries. Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2008 Mar;294(3):H1381-7.

Osol G, Barron C, Gokina N, Mandala M. *Inhibition of nitric oxide synthases abrogates pregnancy-induced uterine vascular expansive remodeling. J Vasc Res.* 2009;46(5):478-86.

Osol G, Mandala M. *Maternal uterine vascular remodeling during pregnancy. Physiology (Bethesda).* 2009 Feb;24:58-71.

Oosterhof H, Wichers G, Fidler V, Aarnoudse JG. *Blood viscosity and uterine artery flow velocity waveforms in pregnancy: a longitudinal study. Placenta* 14: 555–561, 1993.

Otto C, Rohde-Schulz B, Schwarz G, Fuchs I, Klewer M, Brittain D, Langer G, Bader B, Prella K, and Nubbemeyer R, et al. (2008) *G protein-coupled receptor 30 localizes to the endoplasmic reticulum and is not activated by estradiol. Endocrinology* 149:4846–4856.

Owman C, Blay P, Nilsson C, and Lolait SJ (1996) *Cloning of human cDNA encoding a novel heptahelix receptor expressed in Burkitt's lymphoma and widely distributed in brain and peripheral tissues. Biochem Biophys Res Commun* 228:285–292.

Page KL, Celia G, Leddy G, Taatjes DJ, Osol G. *Structural remodeling of rat uterine veins in pregnancy. Am J Obstet Gynecol* 187: 1647–1652, 2002.

Paller MS. *Mechanism of decreased pressor responsiveness to ANG II, NE, and vasopressin in pregnant rats. Am J Physiol* 1984; 247:H100–108.

Palmer SK, Zamudio S, Coffin C, Parker S, Stamm E, Moore LG. *Quantitative estimation of human uterine artery blood flow and pelvic blood flow redistribution in pregnancy. Obstet Gynecol* 80:1000–1006, 1992.

Pang Y, Dong J, Thomas P, 2008. *Estrogen signaling characteristics of Atlantic croaker GPR30 and evidence it is involved in maintenance of oocyte meiotic arrest. Endocrinol* 149, 3410e3426.

Pascoal IF, Lindheimer MD, Nalbantian-Brandt C, Umans JG. *Contraction and endothelium-dependent relaxation in mesenteric microvessels from pregnant rats. Am J Physiol* 1995; 269:H1899–1904.

Pastore MB, Jobe SO, Ramadoss J, Magness RR. *Estrogen receptor- α and estrogen receptor- β in the uterine vascular endothelium during pregnancy: functional implications for regulating uterine blood flow. Semin Reprod Med.* 2012 Jan;30(1):46-61.

Patkar S, Farr TD, Cooper E, Dowell FJ, Carswell HV. *Differential vasoactive effects of oestrogen, oestrogen receptor agonists and selective oestrogen receptor modulators in rat middle cerebral artery. Neurosci Res.* 2011 Sep;71(1):78-84.

Pavlik R, Wypior G, Hecht S, Papadopoulos P, Kupka M, Thaler C, Wiest I, Pestka A, Friese K and Jeschke U, 2011. *Induction of G protein-coupled estrogen receptor (GPER) and nuclear steroid hormone receptors by gonadotropins in human granulosa cells. Histochem. Cell Biol.* 136, 289-299.

Pedram A, Razandi M, Sainson RC, Kim JK, Hughes CC, Levin ER, 2007. *A conserved mechanism for steroid receptor translocation to the plasma membrane. J. Biol. Chem.* 282, 22278–22288.

Petrie WK, Dennis MK, Hu C, Dai D, Arterburn JB, Smith HO, Hathaway HJ and Prossnitz ER, 2013. *G protein-coupled estrogen receptor-selective ligands modulate endometrial tumor growth. Obstet. Gynecol. Int.* 2013, 472720.

Peyton C, Thomas P, 2011. *Involvement of epidermal growth factor receptor signaling in estrogen inhibition of oocyte maturation mediated through the G protein-coupled estrogen receptor (GPER) in zebrafish (Danio rerio). Biol.Reprod.* 85, 42e50.

Pietras RJ and Szego CM (1975) *Endometrial cell calcium and oestrogen action. Nature* 253:357–359.

Pietras RJ, Szego CM, 1977. *Specific binding sites for oestrogen at the outer surfaces of isolated endometrial cells. Nature* 265, 69–72.

Pijnenborg R, Robertson WB, Brosens I, Dixon G. *Review article: trophoblast invasion and the establishment of haemochorial placentation in man and laboratory animals. Placenta* 1981;2:71–91.

- Pijnenborg R, Vercruyssen L, Hanssens M, 2006. *The uterine spiral arteries in human pregnancy: facts and controversies*. *Placenta* 27, 939–958.
- Power RF et al. (1991) *Dopaminergic and ligand-independent activation of steroid hormone receptors*. *Science* 254, 1636–1639.
- Prakash YS, Togaibayeva AA, Kannan MS, Miller VM, Fitzpatrick LA, and Sieck GC (1999) *Estrogen increases [Ca²⁺] efflux from female porcine coronary arterial smooth muscle*. *Am J Physiol* 45:H926–H934.
- Prossnitz ER, Arterburn JB, Smith HO, Oprea TI, Sklar LA, and Hathaway HJ (2008) *Estrogen signaling through the transmembrane G protein-coupled receptor GPR30*. *Annu Rev Physiol* 70:165–190.
- Prossnitz ER and Barton M (2009) *Signaling, physiological functions and clinical relevance of the G protein-coupled estrogen receptor GPER*. *Prostaglandins Other Lipid Mediat* 89:89–97.
- Prossnitz ER and Barton M (2011) *The G-protein-coupled estrogen receptor GPER in health and disease*. *Nat Rev Endocrinol* 7:715–726.
- Prossnitz ER and Barton M (2014) *Estrogen biology: new insights into GPER function and clinical opportunities*. *Mol Cell Endocrinol* 389:71–83.
- Prossnitz ER and Maggiolini M (2009a) *Mechanisms of estrogen signaling and gene expression via GPR30*. *Mol Cell Endocrinol* 308:32–38.
- Prossnitz ER and Maggiolini M (2009b) *Non-genomic signaling by steroids*. *Mol Cell Endocrinol* 308:1–2.
- Pruthi D, McCurley A, Aronovitz M, Galayda C, Karumanchi SA and Jaffe IZ, 2014. *Aldosterone promotes vascular remodeling by direct effects on smooth muscle cell mineralocorticoid receptors*. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 34, 355-364.
- Pupo M, Pisano A, Lappano R, Santolla MF, De Francesco EM, Abonante S, Rosano C, and Maggiolini M (2012) *Bisphenol A induces gene expression changes and proliferative effects through GPER in breast cancer cells and cancer-associated fibroblasts*. *Environ Health Perspect* 120:1177–1182.
- Puri CP, Garfield RE. *Changes in hormone levels and gap junctions in the rat uterus during pregnancy and parturition*. *CBiol Reprod.* 1982 Nov;27(4):967-75.
- Quayle JM, Bonev AD, Brayden JE, and Nelson MT (1995) *Pharmacology of ATP sensitive K⁺ currents in smooth muscle cells from rabbit mesenteric artery*. *Am J Physiol* 269:C1112–C1118.
- Raffetto JD, Khalil RA. *Matrix metalloproteinases and their inhibitors in vascular remodeling and vascular disease*. *Biochem Pharmacol* 75:346–359, 2008.
- Raffetto JD, Qiao X, Beauregard KG, Khalil RA. *Estrogen receptor-mediated enhancement of venous relaxation in female rat: implications in sex-related differences in varicose veins*. *J. Vasc. Surg.* 2010;51:972–81.

Ramsey E M. *Placental vasculature and circulation*. In: Shepherd JT, Abboud FM, editors. *Handbook of physiology: endocrinology*. Vol 2: Female reproductive system. Bethesda (Md): American Physiological Society; 1973. p. 323-37.

Ranjan V, Xiao Z, Diamond SL (1995). *Constitutive NOS expression in cultured endothelial cells is elevated by fluid shear stress*. *American Journal of Physiology* 269, H550-555.

Razandi M, Pedram A, Levin ER, 2000. *Estrogen signals to the preservation of endothelial cell form and function*. *J. Biol. Chem.* 275, 38540–38546.

Razandi M, Oh P, Pedram A, Schnitzer J, Levin ER, 2002. *ERs associate with and regulate the production of caveolin: implications for signaling and cellular actions*. *Mol. Endocrinol.* 16, 100–115.

Razandi M, Pedram A, Park ST, Levin ER. *Proximal events in signaling by plasma membrane estrogen receptors*. *J Biol Chem* 2003;278:2701–12.

Ren J and Wu JH, 2012. *17beta-estradiol rapidly activates calcium release from intracellular stores via the GPR30 pathway and MAPK phosphorylation in osteocyte-like MLO-Y4 cells*. *Calcif. Tissue Int.* 90, 411-419.

Reslan OM, Yin Z, do Nascimento GR and Khalil RA, 2013. *Subtype-specific Estrogen Receptor-mediated Vasodilator Activity in the Cephalic, Thoracic, and Abdominal Vasculature of Female Rat*. *J. Cardiovasc. Pharmacol.* 62, 26-40.

Resnik R, Killam AP, Battaglia FC, et al.: *The stimulation of uterine blood flow by various estrogens*. *Endocrinology* 94:1192-6, 1974.

Revankar CM, Cimino DF, Sklar LA, Arterburn JB, and Prossnitz ER (2005) *A transmembrane intracellular estrogen receptor mediates rapid cell signaling*. *Science* 307:1625–1630.

Revankar CM, Mitchell HD, Field AS, Burai R, Corona C, Ramesh C, Sklar LA, Arterburn JB, Prossnitz ER, 2007. *Synthetic estrogen derivatives demonstrate the functionality of intracellular GPR30*. *ACS Chem. Biol.* 2, 536e544.

Revelli A, Massobrio M, and Tesarik J (1998) *Nongenomic actions of steroid hormones in reproductive tissues*. *Endocr Rev* 19:3–17.

Richardson TE et al. (2012) *Estrogen prevents oxidative damage to the mitochondria in Friedreich's ataxia skin fibroblasts*. *PLoS ONE* 7, e34600.

Roberts JM. *Endothelial dysfunction in preeclampsia*. *Semin Reprod Endocrinol* 1998;16:5-15.

Robertson WB, Manning PJ. *Elastic tissue in uterine blood vessels*. *J Pathol* 109: P3, 1973.

Rosenfeld CR, Morriss FH, Makowski EL, Meschia G, Battaglia FC. *Circulatory changes in the reproductive tissues of ewes during pregnancy*. *Gynecol Invest* 1974;5:252–68.

Ross R, Glomset JA. *Atherosclerosis and the arterial smooth muscle cell: Proliferation of smooth muscle is a key event in the genesis of the lesions of atherosclerosis*. *Science* 973;180(4093):1332–9.

Rudic RD, Shesely EG, Maeda N, Smithies O, Segal SS, Sessa WC. *Direct evidence for the importance of endothelium-derived nitric oxide in vascular remodeling*. *J Clin Invest* 101: 731–736,1998.

Russell KS, Haynes MP, Sinha D, Clerisme E, Bender JR, 2000. *Human vascular endothelial cells contain membrane binding sites for estradiol, which mediate rapid intracellular signaling*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 97, 5930–5935.

Sakamoto H, Matsuda K, Hosokawa K, Nishi M, Morris JF, Prossnitz ER, and Kawata M (2007) *Expression of G protein-coupled receptor-30, a G protein coupled membrane estrogen receptor, in oxytocin neurons of the rat paraventricular and supraoptic nuclei*. *Endocrinology* 148:5842–5850.

Shaikh AA. *Estrone and estradiol levels in the ovarian venous blood from rats during the estrous cycle and pregnancy*. *Biol Reprod*. 1971 Dec;5(3):297-307.

Saitta A, Altavilla D, Cucinotta D et al. (2001). *Randomized, doubleblind, placebo-controlled study on effects of raloxifene and hormone replacement therapy on plasma NO concentrations, endothelin-1 levels, and endothelium-dependent vasodilation in postmenopausal women*. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*, 21:1512-1519.

Sandèn C , Broselid S, Cornmark L, Andersson K, Daszkiewicz-Nilsson J, Mårtensson UE, Olde B, Leeb-Lundberg LM, 2011. *G protein-coupled estrogen receptor 1/G protein-coupled receptor 30 localizes in the plasma membrane and traffics intracellularly on cytokeratin intermediate filaments*. *Mol. Pharmacol.* 79, 400e410.

Santoni A, Carlino C, Gismondi A. *Uterine NK cell development, migration and function*. *Reprod Biomed Online* 16: 202–210, 2008.

Sargent IL, Borzychowski AM, Redman CW. *Immunoregulation in normal pregnancy and preeclampsia: an overview*. *Reprod Biomed Online* 13: 680–686, 2006.

Savvidou MD, Noori M, Anderson JM, Hingorani AD, Nicolaides KH: *Maternal endothelial function and serum concentrations of placental growth factor and soluble endoglin in women with abnormal placentation*. *Ultrasound Obstet Gynecol* 2008; 32: 871–876.

Schiffers PM, Henrion D, Boulanger CM, Colucci-Guyon E, Langa-Vuves F, van Essen H, Fazzi GE, Levy BI, De Mey JG. *Altered flow-induced arterial remodeling in vimentin-deficient mice*. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 20: 611–616, 2000.

Schiffrin EL. *Role of endothelin-1 in hypertension and vascular disease. Am J Hypertens* 2001;14(6 Pt 2):83S–9S.

Schiffrin EL, 2013. *Vascular mineralocorticoid receptors regulate blood pressure effects on myogenic tone and role in aging. Circ. Res.* 112, 415-417.

Schreihofner DA et al. (2001) *Ligand-independent activation of pituitary ER: dependence on PKA-stimulated pathways. Endocrinology* 142, 3361–3368.

Schubert V, Dotti CG, 2007. *Transmitting on actin: synaptic control of dendritic architecture. J. Cell Sci.* 120, 205–212.

Schultz-Norton JR, Ziegler YS, Nardulli AM, *ERalpha-associated protein networks, Trends Endocrinol. Metab.* 22 (4) (2011) 124-129.

Sharma G and Prossnitz ER, 2011. *Mechanisms of estradiol-induced insulin secretion by the G protein-coupled estrogen receptor GPR30/GPER in pancreatic beta-cells. Endocrinology* 152, 3030-3039.

Sharma G, Hu C, Brigman JL, Zhu G, Hathaway HJ and Prossnitz ER, 2013. *GPER deficiency in male mice results in insulin resistance, dyslipidemia, and a proinflammatory state. Endocrinology* 154, 4136-4145.

Shi J, Zhang YQ and Simpkins JW (1997) *Effects of 17 β -estradiol on glucose transporter 1 expression and endothelial cell survival following focal ischemia in the rats. Exp. Brain Res.* 117, 200–206.

Sibai, B., Dekker, G., Kupferminc, M., 2005. *Pre-eclampsia. Lancet* 365, 785–799.

Siiteri PK, MacDonald PC: *Placental estrogen biosynthesis during human pregnancy. J Clin Endocrinol Metab* 26:751-61, 1966.

Simoncini T, Genazzani AR & Liao JK (2002). *Nongenomic mechanisms of endothelial nitric oxide synthase activation by the selective estrogen receptor modulator raloxifene. Circulation*, 105: 1368-1373.

Simoncini T, Scorticati C, Mannella P, Fadiel A, Giretti MS, Fu XD, Baldacci C, Garibaldi S, Caruso A, Fornari L, Naftolin F, Genazzani AR, 2006. *Estrogen receptor alpha interacts with Galpha13 to drive actin remodeling and endothelial cell migration via the RhoA/Rho kinase/moesin pathway. Mol. Endocrinol.* 20,1756–1771.

Simpson ER, Mahendroo MS, Means GD, et al.: *Aromatase cytochrome P450, the enzyme responsible for estrogen biosynthesis. Endocr Rev* 15:342-55, 1994.

Simpson, E.R. et al. (1997) *Aromatase expression in health and disease. Recent Prog. Horm. Res.* 52, 185–213.

Singh M et al. (1999) *Estrogen-induced activation of mitogen activated protein kinase in cerebral cortical explants: convergence of estrogen and neurotrophin signaling pathways. J. Neurosci.* 19, 1179–1188.

Singleton DW, Khan SA. *Xenoestrogen exposure and mechanisms of endocrine disruption. Front Biosci* 2003;8:s110–8.

Smith CL and O'Malley BW (2004) *Coregulator function: a key to understanding tissue specificity of selective receptor modulators. Endocr Rev* 25:45–71.

Smith HO, Leslie KK, Singh M, Qualls CR, Revankar CM, Joste NE, Prossnitz ER, 2007. *GPR30: a novel indicator of poor survival for endometrial carcinoma. Am. J. Obstet. Gynecol.* 196, 386.e1–386.e9 (discussion: 386.e9–389.e11).

Smith HO, Arias-Pulido H, Kuo DY, Howard T, Qualls CR, Lee SJ, Verschraegen CF, Hathaway HJ, Joste NE, and Prossnitz ER (2009) *GPR30 predicts poor survival for ovarian cancer. Gynecol Oncol* 114:465–471.

Somjen D, Kohen F, Gayer B, Sharon O, Baz M, Limor R, Kulik T, Knoll E, Stern N, 2004. *Role of putative membrane receptors in the effects of estradiol on human vascular cell growth. Am. J. Hypertens.* 17, 462–469.

Somjen D, Kohen F, Jaffe A, Amir-Zaltsman Y, Knoll E and Stern N (1998) *Effects of gonadal steroids and their antagonists on DNA synthesis in human vascular cells. Hypertension* 32, 39–45.

Song RX, Barnes CJ, Zhang Z, Bao Y, Kumar R, Santen RJ, 2004. *The role of Shc and insulin-like growth factor 1 receptor in mediating the translocation of estrogen receptor alpha to the plasma membrane. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 101, 2076–2081.

Sprague BJ, Phernetton TM, Magness RR, Chesler NC. *The effects of the ovarian cycle and pregnancy on uterine vascular impedance and uterine artery mechanics. Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol* 2009;144:170–8.

Srivastava DP and Evans PD (2013) *G-protein oestrogen receptor 1: trials and tribulations of a membrane oestrogen receptor. J Neuroendocrinol* 25:1219–1230.

Stauffer SR, Coletta CJ, Tedesco R, Nishiguchi G, Carlson K, Sun J, Katzenellenbogen BS, and Katzenellenbogen JA (2000) *Pyrazole ligands: structure-affinity/activity relationships and estrogen receptor- α -selective agonists. J Med Chem* 43:4934–4947.

Staub-Ram, E., Goldman, S., Gabarin, D., Shalev, E., 2004. *Expression and importance of matrix metalloproteinase 2 and 9 (MMP-2 and -9) in human trophoblast invasion. Reprod. Biol. Endocrinol.* 2, 59.

Stewart EA, Nowak RA. *New concepts in the treatment of uterine leiomyomas. Obstet Gynecol* 1998; 92:624–7.

Strehlow K, Rotter S, Wassmann S, Adam O, Grohe C, Laufs K, Böhm M, and Nickenig G (2003a) *Modulation of antioxidant enzyme expression and function by estrogen. Circ Res* 93:170–177.

Stricker R et al. (2006) *Establishment of detailed reference values for luteinizing hormone, follicle stimulating hormone, estradiol, and progesterone during different phases of the menstrual cycle on the Abbott ARCHITECT analyzer. Clin. Chem. Lab. Med.* 44, 883–887

Su EJ, Cheng YH, Chatterton RT, Lin ZH, Yin P, Reierstad S, Innes J, Bulun SE. *Regulation of 17- β -hydroxysteroid dehydrogenase type 2 in human placental endothelial cells. Biol Reprod* 2007; 77:517–525.

Su EJ, Lin ZH, Zeine R, Yin P, Reierstad S, Innes JE, Bulun SE. *Estrogen receptor-beta mediates cyclooxygenase-2 expression and vascular prostanoid levels in human placental villous endothelial cells. Am J Obstet Gynecol* 2009; 200:427.e1-8.

Subramanian S, Miller LM, Grafe MR, Vandenbark AA and Offner H, 2012. *Contribution of GPR30 for 1,25 dihydroxyvitamin D(3) protection in EAE. Metab. Brain Dis.* 27, 29-35.

Sukocheva O, Wadham C, Holmes A, et al. *Estrogen transactivates EGFR via the sphingosine 1-phosphate receptor Edg-3: the role of sphingosine kinase-1. J Cell Biol* 2006;173:301–10.

Sumi D, Hayashi T, Jayachandran M, and Iguchi A (2001) *Estrogen prevents destabilization of endothelial nitric oxide synthase mRNA induced by tumor necrosis factor α through estrogen receptor mediated system. Life Sci* 69:1651–1660.

Suzuki A, Mizuno K, Ino Y et al. (1996) *Effect of 17 β -estradiol and progesterone on growth-factor induced proliferation and migration in human aortic smooth muscle cells in vitro. Cardiovasc. Res.* 32,516–523.

Szego CM and Davis JS (1967) *Adenosine 39,59-monophosphate in rat uterus: acute elevation by estrogen. Proc Natl Acad Sci USA* 58:1711–1718.

Szego CM, Davis JS, 1969. *Inhibition of estrogen-induced cyclic AMP elevation in rat uterus. II: By glucocorticoids. Life Sci.* 8, 1109–1116.

Tabata M, Negishi H, Yamaguchi T, Makinoda S, Fujimoto S, Moll W. *The effects of the proliferation of the radial arteries of the placenta on oxygen transport to the fetal guinea pig. Adv Exp Med Biol* 1988;222:675–81.

Tai LK, Okuda M, Abe J, Yan C, Berk BC. *Fluid shear stress activates proline-rich tyrosine kinase via reactive oxygen species-dependent pathway. Arterioscler Thromb Vasc Biol* 22: 1790–1796, 2002.

Takada Y, Kato C, Kondo S, Korenaga R, and Ando J (1997) *Cloning of cDNAs encoding G protein-coupled receptor expressed in human endothelial cells exposed to fluid shear stress. Biochem Biophys Res Commun* 240:737–741.

Takeda-Matsubara Y, Nakagami H, Iwai M, Cui TX, Shiuchi T, Akishita M, Nahmias C, Ito M & Horiuchi M (2002). *Estrogen activates phosphatases and antagonizes growth-promoting effect of angiotensin II. Hypertension*, 39: 41-45.

- Tamimi, R., Lagiou, P., Vatten, L.J., Mucci, L., Trichopoulos, D., Hellerstein, S., Ekblom, A., Adami, H.O., Hsieh, C.C., 2003. *Pregnancy hormones, pre-eclampsia, and implications for breast cancer risk in the offspring. Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev.* 12, 647–650.
- Taylor SE, Martin-Hirsch PL, and Martin FL (2010) *Oestrogen receptor splice variants in the pathogenesis of disease. Cancer Lett* 288:133–148.
- Terasawa E, Noel SD, and Keen KL (2009) *Rapid action of oestrogen in luteinizing hormone-releasing hormone neurones: the role of GPR30. J Neuroendocrinol* 21:316–321.
- Thaler I, Manor D, Itskovitz J, Rottem S, Levit N, Timor-Tritsch I, Brandes JM. *Changes in uterine blood flow during human pregnancy. Am J Obstet Gynecol* 162: 121–125, 1990.
- Thampan RV (1985) *The nuclear binding of estradiol stimulates ribonucleoprotein transport in the rat uterus. J Biol Chem* 260:5420–5426.
- Thomas P, Pang Y, Filardo EJ, and Dong J (2005) *Identity of an estrogen membrane receptor coupled to a G protein in human breast cancer cells. Endocrinology* 146:624–632.
- Thomas P, Dong J. *Binding and activation of the seven-transmembrane estrogenreceptor GPR30 by environmental estrogens: a potential novel mechanism of endocrine disruption. J Steroid Biochem Mol Biol* 2006;102:175–9.
- Thornburg KL, Jacobson SL, Giraud GD, Morton MJ. *Hemodynamic changes in pregnancy. Semin Perinatol* 24: 11–14, 2000.
- Tiano JP, Delghingaro-Augusto V, Le May C, Liu S, Kaw MK, Khuder SS, Latour MG, Bhatt SA, Korach KS, Najjar SM, Prentki M and Mauvais-Jarvis F, 2011. *Estrogen receptor activation reduces lipid synthesis in pancreatic islets and prevents beta cell failure in rodent models of type 2 diabetes. J. Clin. Invest.* 121, 3331-3342.
- Tisdale MJ, 2002. *Biochemical mechanisms of cellular catabolism. Curr. Opin. Clin. Nutr. Metab. Care* 5, 401-405.
- Tiyerili V et al. (2012) *Estrogen improves vascular function via peroxisome-proliferator-activated-receptor-gamma. J. Mol. Cell. Cardiol.* 53, 268–276.
- Toran-Allerand CD et al. (2002) *ER-X: a novel, plasma membrane associated putative estrogen receptor that is regulated during development and after ischemic brain injury. J. Neurosci.* 22, 8391–8401.
- Tostes RC, Nigro D, Fortes ZB, Carvalho MH. *Effects of estrogen on the vascular system. Braz J Med Biol Res.* 2003 Sep;36(9):1143-58.
- Tran Q-K, VerMeer M, Burgard MA, Hassan AB, Giles J, 2015. *Hetero-oligomeric complex between the G protein-coupled estrogen receptor 1 and the plasma membrane Ca2p-ATPase 4b. J. Biol. Chem.* 290,, 10.1074/jbc.M114.628743.

- Traupe T, Stettler CD, Li H, Haas E, Bhattacharya I, Minotti R and Barton M, 2007. *Distinct roles of estrogen receptors alpha and beta mediating acute vasodilation of epicardial coronary arteries. Hypertension* 49, 1364-1370.
- Tronc F, Mallat Z, Lehoux S, Wassef M, Esposito B, Tedgui A. *Role of matrix metalloproteinases in blood flow-induced arterial enlargement: interaction with NO. Arterioscler Thromb Vasc Biol* 20:E120–E126, 2000.
- Tsutsumi S et al. (2008) *Differential regulation of the inducible nitric oxide synthase gene by estrogen receptors 1 and 2. J. Endocrinol.* 199, 267–273.
- Tulchinsky D, Hobel CJ, Korenman SG: *A radioligand assay for plasma unconjugated estriol in normal and abnormal pregnancies. Am J Obstet Gynecol* 111:311-8, 1971.
- Tulchinsky D, Hobel CJ, Yeager E, et al.: *Plasma estrone, estradiol, estriol, progesterone, and 17-hydroxyprogesterone in human pregnancy. I. Normal pregnancy. Am J Obstet Gynecol* 112:1095-100, 1972.
- Tulchinsky D, Hobel CJ: *Plasma human chorionic gonadotropin, estrone, estradiol, estriol, progesterone, and 17 alpha-hydroxyprogesterone in human pregnancy. 3. Early normal pregnancy. Am J Obstet Gynecol* 117:884-93, 1973.
- Tuttle JL, Nachreiner RD, Bhuller AS, Condict KW, Connors BA, Herring BP, Dalsing MC, Unthank JL. *Shear level influences resistance artery remodeling: wall dimensions, cell density, and eNOS expression. Am J Physiol Heart Circ Physiol* 281:H1380–H1389, 2001.
- Ullrich ND, Krust A, Collins P, MacLeod KT, 2008. *Genomic deletion of estrogen receptors ERalpha and ERbeta does not alter estrogen-mediated inhibition of Ca²⁺ influx and contraction in murine cardiomyocytes. Am. J. Physiol. Heart Circ.Physiol.* 294, H2421–2427.
- Valverde MA, Rojas P, Amigo J, Cosmelli D, Orio P, Bahamonde MI, Mann GE, Vergara C & Latorre R (1999). *Acute activation of Maxi-K channels (hSlo) by estradiol binding to the beta subunit. Science*, 285: 1929-1931.
- van der Heijden OW, Essers YP, Simkens LH, Teunissen QG, Peeters LL, De Mey JG, van Eys GJ. *Aging blunts remodeling of the uterine artery during murine pregnancy. J Soc Gynecol Invest* 11: 304–310, 2004.
- van der Heijden OW, Essers YP, Fazzi G, Peeters LL, De Mey JG, van Eys GJ. *Uterine artery remodeling and reproductive performance are impaired in endothelial nitric oxide synthase-deficient mice. Biol Reprod* 72: 1161–1168, 2005 (a).
- van der Heijden OW, Essers YP, Spaanderman ME, De Mey JG, van Eys GJ, Peeters LL. *Uterine artery remodeling in pseudopregnancy is comparable to that in early pregnancy. Biol Reprod* 73:1289–1293, 2005 (b).
- Vasudevan N and Pfaff DW (2008) *Non-genomic actions of estrogens and their interaction with genomic actions in the brain. Front. Neuroendocrinol.* 29, 238–257.

Verlohren S, Niehoff M, Hering L, Geusens N, Herse F, Tintu AN, Plagemann A, LeNoble F, Pijnenborg R, Muller DN, Luft FC, Dudenhausen JW, Gollasch M, Dechend R. *Uterine vascular function in a transgenic preeclampsia rat model. Hypertension* 51: 547–553, 2008.

Viridis A, Ghiadoni L, Pinto S, Lombardo M, Petraglia F, Gennazzani A, Buralli S, Taddei S & Salvetti A (2000). *Mechanisms responsible for endothelial dysfunction associated with acute estrogen deprivation in normotensive women. Circulation*, 101: 2258-2263.

Vivacqua A, Bonofiglio D, Albanito L, et al. *17 β -estradiol, genistein and 4 - hydroxytamoxifen induce the proliferation of thyroid cancer cells through the G protein-coupled receptor GPR30. Mol Pharmacol* 2006;70:1414–23.

Volpe M, Gigante B, Enea I, Porcellini A, Russo R, Lee MA, Magri P, Condorelli G, Savoia C, Lindpaintner K and Rubattu S, 1997. *Role of tissue renin in the regulation of aldosterone biosynthesis in the adrenal cortex of nephrectomized rats. Circ. Res.* 81, 857-864.

Wagner AH, Schroeter MR & Hecker M (2001). *17 β -estradiol inhibition of NADPH oxidase expression in human endothelial cells. FASEB Journal*, 15: 2121-2130.

Wang Z, Zhang X, Shen P, Loggie BW, Chang Y and Deuel TF, 2005. *Identification, cloning, and expression of human estrogen receptor- α 36, a novel variant of human estrogen receptor- α 66. Biochem. Biophys. Res. Commun.* 336, 1023-1027.

Wang Z, Zhang X, Shen P, Loggie BW, Chang Y, and Deuel TF (2006) *A variant of estrogen receptor- α , hER- α 36: transduction of estrogen- and antiestrogen-dependent membrane-initiated mitogenic signaling. Proc Natl Acad Sci USA* 103:9063–9068.

Wang H, Jessup JA, Lin MS, Chagas C, Lindsey SH and Groban L, 2012. *Activation of GPR30 attenuates diastolic dysfunction and left ventricle remodeling in oophorectomized mRen2.Lewis rats. Cardiovasc. Res.* 94, 96-104.

Washburn N, Borgquist A, Wang K, Jeffery GS, Kelly MJ and Wagner EJ, 2013. *Receptor subtypes and signal transduction mechanisms contributing to the estrogenic attenuation of cannabinoid-induced changes in energy homeostasis. Neuroendocrinology* 97, 160-175.

Wassmann S, Baumer AT, Strehlow K, van Eickels M, Grohe C, Albory K, Rosen R, Bohm M & Nickenig G (2001). *Endothelial dysfunction and oxidative stress during estrogen deficiency in spontaneously hypertensive rats. Circulation*, 103: 435-441.

Weiner CP, Martinez E, Liu ZK, Ghodsi A, Chestnut DH (1989). *In vitro release of endothelium derived relaxing factor by acetylcholine is increased during the guinea pig pregnancy. American Journal of Obstetrics and Gynaecology* 161, 1599-1605.

- Wehling M (1997) *Specific, nongenomic actions of steroid hormones. Annu Rev Physiol* 59:365–393.
- Weiner CP, Lizasoian I, Bayliss SA, Knowles RG, Charles IG, Moncada S. (1994). *Induction of calcium-dependent nitric oxide synthases by sex hormones. Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA* 91, 5212-5216.
- Wendler A, Wehling M. *Is GPR30 the membrane aldosterone receptor postulated 20 years ago? Hypertension* 2001;57(5):e16; author reply e7.
- Wendler A, Albrecht C, Wehling M. *Nongenomic actions of aldosterone and progesterone revisited. Steroids*. 2012 Aug;77(10):1002-6.
- White RE, Darkow DJ, and Lang JL (1995) *Estrogen relaxes coronary arteries by opening BKCa channels through a cGMP-dependent mechanism. Circ Res* 77:936–942.
- White RE, Kryman JP, El-Mowafy AM, Han G, Carrier GO. *CAMP-dependent vasodilators cross-activate the cGMP-dependent protein kinase to stimulate BK(Ca) channel activity in coronary artery smooth muscle cells. Circ. Res.*2000;86:897–905.
- Whitley GS, Cartwright JE, 2009. *Trophoblast-mediated spiral artery remodelling: a role for apoptosis. J. Anat.* 215, 21–26.
- Whitney EA, Ducsay CA, Valenzuela GJ. *Is uterine blood flow controlled locally or systemically in the pregnant rabbit? Am J Obstet Gynecol* 169:1507–1509, 1993.
- WHO, 2005. *The World Health Report: 2005: make every mother and child count. In The World Health Report. Geneva: World Health Organisation.*
- Woods AK, Hoffmann DS, Weydert CJ, Butler SD, Zhou Y, Sharma RV, Davisson RL: *Adenoviral delivery of VEGF121 early in pregnancy prevents spontaneous development of preeclampsia in BPH/5 mice. Hypertension* 2011; 57: 94–102.
- Wong JK, Le HH, Zsarnovszky A, and Belcher SM (2003) *Estrogens and ICI182,780 (Faslodex) modulate mitosis and cell death in immature cerebellar neurons via rapid activation of p44/p42 mitogen-activated protein kinase. J Neurosci* 23:4984–4995.
- Wu H, Sun L, Zhang Y, Chen Y, Shi B, Li R, Wang Y, Liang J, Fan D, Wu G, et al. (2006) *Coordinated regulation of AIB1 transcriptional activity by sumoylation and phosphorylation. J Biol Chem* 281:21848–21856.
- Wyckoff MH, Chambliss KL, Mineo C, Yuhanna IS, Mendelsohn ME, Mumby SM, Shaul PW. *Plasma membrane estrogen receptors are coupled to endothelial nitric-oxide synthase through Galpha (i). J. Biol. Chem* 2001;276(29):27071–27076.
- Xiong Z, Sperelakis N. *Regulation of L-type calcium channels of vascular smooth muscle cells. J. Mol. Cell. Cardiol.* 1995;27:75–91.
- Xu, P., Wang, Y.L., Zhu, S.J., Luo, S.Y., Piao, Y.S., Zhuang, L.Z., 2000. *Expression of matrix metalloproteinase-2, -9, and -14, tissue inhibitors of metalloproteinase-1,*

and matrix proteins in human placenta during the first trimester. *Biol. Reprod.* 62, 988–994.

Ylikomi T, Vienonen A and Ahola TM, 2004. *G protein-coupled receptor 30 down-regulates cofactor expression and interferes with the transcriptional activity of glucocorticoid.* *Eur. J. Biochem.* 271, 4159-4168.

Yoshinaga K, Hawkins RA, Stocker JF *Estrogen secretion by the rat ovary in vivo during the estrous cycle and pregnancy.* *Endocrinology.* 1969 Jul;85(1):103-12.

Yu X, Ma H, Barman SA, Liu AT, Sellers M, Stallone JN, Prossnitz ER, White RE, and Han G (2011) *Activation of G protein-coupled estrogen receptor induces endothelium-independent relaxation of coronary artery smooth muscle.* *Am J Physiol Endocrinol Metab* 301:E882–E888.

Yue, W. et al. (2010) *Effects of estrogen on breast cancer development: Role of estrogen receptor independent mechanisms.* *Int. J. Cancer* 127, 1748–1757.

Zeisler, H., Jirecek, S., Hohlagschwandtner, M., Knofler, M., Tempfer, C., Livingston, J.C., 2002. *Concentrations of estrogens in patients with preeclampsia.* *Wien Klin Wochenschr.* 114, 458–461.

Zhang Y, Stewart KG, Davidge ST. *Endogenous estrogen mediates vascular reactivity and distensibility in pregnant rat mesenteric arteries.* *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2001 Mar;280(3):H956-61.

Zhou CC, Zhang Y, Irani RA, Zhang H, Mi T, Popek EJ, Hicks MJ, Ramin SM, Kellems RE, Xia Y. *Angiotensin receptor agonistic autoantibodies induce preeclampsia in pregnant mice.* *Nat Med* 14: 855–862, 2008.

Zucchetti AE, Barosso IR, Boaglio AC, Basiglio CL, Misczuk G, Larocca MC, Ruiz ML, Davio CA, Roma MG, Crocenzi FA and Pozzi EJ, 2013. *G protein-coupled receptor30-adenylyl cyclase-protein kinase A pathway is involved in estradiol 17 β -dglucuronide-induced cholestasis.* *Hepatology.*