



UNIVERSITA' DEGLI STUDI DI SASSARI
SCUOLA DI DOTTORATO DI SCIENZE BIOMEDICHE

INDIRIZZO: FARMACOLOGIA DI GENERE
Ciclo XXII

**L'assunzione di associazioni estro-progestiniche
seleziona due popolazioni femminili che differiscono in
molti aspetti inclusi i processi di metilazione del DNA**

Coordinatore:
Prof. EUSEBIO TOLU

Tutor:
Prof. FLAVIA FRANCONI

Tesi di dottorato di:
ILARIA CAMPESI

ANNO ACCADEMICO: 2008-2009

INDICE

SCOPO DEL LAVORO	pag. 1
INTRODUZIONE	
✓ La farmacologia di genere	pag. 3
✓ Malattie cardiovascolari, genere e ruolo dei macrofagi	pag.11
✓ Epigenetica e metilazione del DNA	pag. 14
✓ Tioli plasmatici	pag. 16
MATERIALI E METODI	pag. 24
RISULTATI E DISCUSSIONE	
✓ Confronto tra la popolazione femminile e la popolazione maschile	pag. 37
✓ Stratificazione della popolazione femminile in base all'assunzione di CO	pag. 44
✓ Macrofagi derivati dai monociti	pag. 52
CONCLUSIONI	pag. 59
BIBLIOGRAFIA	pag. 60
RINGRAZIAMENTI	pag. 73

Ilaria Campesi.

L'assunzione di associazioni estro-progestiniche seleziona due popolazioni femminili che differiscono in molti aspetti inclusi i processi di metilazione del DNA.

Tesi di dottorato in Farmacologia di Genere, Università degli studi di Sassari.

SCOPO DEL LAVORO

Fino ad oggi si è assistito ad uno scarso reclutamento delle donne negli studi clinici e ciò a portato ad estrapolare i dati ottenuti nel genere maschile anche a quello femminile. La scoperta che le differenze di genere sono più numerose di quanto si potesse pensare suggerisce l'importanza del reclutamento delle donne negli studi d'intervento anche in virtù del fatto che esse sono le più grandi consumatrici di farmaci, supplementi, nutrienti e rimedi botanici (Mann C, 1995; Harris DJ and Douglas PS, 2000). Inoltre le fluttuazioni ormonali che caratterizzano la vita della donna (ciclo mestruale, gravidanza, allattamento, menopausa) e l'uso che, per lunghi periodi della loro vita, molte donne (60-70 milioni di donne per anno) fanno, in tutto il mondo, delle associazioni estro-progestiniche (Back DJ and Orme ML, 1990) selezionano diverse sottopopolazioni di donne.

Pertanto l'estrapolazione dei dati non è più possibile considerando l'importanza che gli ormoni sessuali hanno su molti parametri farmacocinetici e le possibili azioni sia degli estrogeni che del progesterone su targets farmacologici e quindi sulla farmacodinamica.

L'uso di associazioni estro-progestiniche per la contraccezione e per la terapia ormonale sostitutiva può, infatti, modificare la fisiologia femminile e di conseguenza la risposta ai farmaci.

In tale ottica ci è apparso interessante andare a individuare delle differenze in tutta una serie di biomarkers ematici, spesso usati per misurare l'efficacia di alcune classi di farmaci, in funzione del genere (maschi e femmine) e in seguito alla stratificazione della popolazione femminile in base all'assunzione o meno di contraccettivi orali (CO).

La nostra attenzione, inoltre, si è concentrata nel valutare il grado di metilazione del DNA in campioni di sangue intero delle diverse popolazioni in esame, considerando il ruolo sempre più importante che sta assumendo l'epigenetica nell'analisi dell'eziologia di diverse patologie.

Infine è stato analizzato il comportamento dei macrofagi (ottenuti a partire dai monociti isolati da sangue periferico umano di individui maschi e femmine, sia

Ilaria Campesi.

L'assunzione di associazioni estro-progestiniche seleziona due popolazioni femminili che differiscono in molti aspetti inclusi i processi di metilazione del DNA.

Tesi di dottorato in Farmacologia di Genere, Università degli studi di Sassari.

in condizioni basali che dopo stimolazione con LPS), per la loro implicazione nei processi infiammatori e nell'aterosclerosi, al fine di valutare se la somministrazione di CO potesse in qualche modo influenzarne la funzionalità.

Ilaria Campesi.

L'assunzione di associazioni estro-progestiniche seleziona due popolazioni femminili che differiscono in molti aspetti inclusi i processi di metilazione del DNA.

Tesi di dottorato in Farmacologia di Genere, Università degli studi di Sassari.

INTRODUZIONE

✓ *La farmacologia di genere*

Prima di inoltrarsi nell'introduzione specifica, è opportuno definire sesso e genere, in accordo con la definizione proposta dall'*Institute Medicine's Report*, secondo cui il sesso identifica le differenze genetiche e fenotipiche (maschio/femmina) mentre il genere descrive le caratteristiche che nascono dalle influenze sociali e culturali basate sul sesso dell'individuo (donne/uomini) (Malorni W et al., 2007).

La farmacologia di genere è quella branca della farmacologia che studia le interazioni soggetto-farmaco etico e non etico in funzione del "genere". Essa comprende tutti gli aspetti della farmacologia come la farmacogenomica, la farmacogenetica, la tossicologia, la farmacocinetica e la farmacodinamica. Questa disciplina nasce nell'ultimo decennio del secolo scorso quando, sotto una forte spinta di carattere sociale, si prende atto del fatto che sino ad allora le sperimentazioni sui farmaci mostravano delle lacune metodologiche: negli studi clinici la partecipazione delle donne era scarsa o addirittura irrilevante per ragioni etiche, difficoltà pratiche da parte della donna nell'aderire con costanza ai protocolli e per il fatto che il corpo femminile veniva considerato simile a quello maschile, soltanto più piccolo; gli studi preclinici non usavano gli animali femmina (Franconi F et al., 2007) perché di solito le variazioni ormonali nel sesso femminile erano considerate elementi confondenti i risultati sperimentali.

Le differenze di genere furono individuate, in un primo momento, negli animali da esperimento, quando Nicholas e Barrow (1932) osservarono che la dose ipnoinducente di barbiturici nei ratti femmina era inferiore del 50% rispetto a quella necessaria ai ratti maschio (Franconi F et al., 2007).

Differenze di genere esistono sia a livello farmacocinetico che farmacodinamico (Franconi F et al., 2007) e si osservano, nell'uomo, nelle caratteristiche anatomiche, fisiologiche e comportamentali. È noto che gli uomini adulti sono più alti, hanno un maggior peso corporeo (circa 30% in più

Ilaria Campesi.

L'assunzione di associazioni estro-progestiniche seleziona due popolazioni femminili che differiscono in molti aspetti inclusi i processi di metilazione del DNA.

Tesi di dottorato in Farmacologia di Genere, Università degli studi di Sassari.

in condizioni normali), hanno una percentuale significativamente più bassa di grasso corporeo (circa 25% in meno), una maggiore quantità di massa magra e un maggior contenuto minerale osseo rispetto alle donne. Tali fattori possono essere coinvolti nelle differenze farmacocinetiche osservate nell'uomo e nella donna (Tab.1).

GD sono state evidenziate nella motilità gastrointestinale dopo l'assunzione di farmaci per via orale, in quanto il tempo di transito è più lento nelle femmine rispetto ai maschi e ciò è dovuto anche agli effetti degli ormoni sessuali (Hutson WR et al., 1989). Le donne, rispetto agli uomini, sono caratterizzate da una minore capacità di svuotamento gastrico (Chen ML et al., 2000) che si traduce in una ridotta concentrazione plasmatica dei farmaci.

La diversa percentuale massa grassa/massa magra tra uomini e donne determina un diverso volume di distribuzione dei farmaci che tenderà ad essere maggiore nelle femmine con conseguente diminuzione della loro concentrazione plasmatica. Molti farmaci psicotropi, come ad esempio le benzodiazepine, sono caratterizzati da un'alta affinità per il tessuto adiposo, nel quale tendono ad accumularsi con facilità, il che provoca un aumento significativo della loro emivita (Kashuba AD and Nafziger AN, 1998).

Ilaria Campesi.

L'assunzione di associazioni estro-progestiniche seleziona due popolazioni femminili che differiscono in molti aspetti inclusi i processi di metilazione del DNA.

Tesi di dottorato in Farmacologia di Genere, Università degli studi di Sassari.

Tabella 1. Differenze di genere nelle varie fasi della farmacocinetica.

	Differenze	Effetti
Assorbimento	ridotta capacità di svuotamento gastrico nelle donne	ridotta concentrazione dei farmaci assunti
	tempo di transito intestinale più rapido nelle donne	ridotta concentrazione dei farmaci assunti
	donne acidità gastrica ridotta nelle	aumentata concentrazione dei farmaci assunti
	ridotta attività degli enzimi gastrici nelle donne	aumentata concentrazione dei farmaci assunti
Distribuzione	minore peso corporeo nella donna	aumento delle concentrazioni plasmatiche
	minore volume di distribuzione nella donna	aumento delle concentrazioni plasmatiche
	minore percentuale di massa grassa nell'uomo	diminuzione delle concentrazioni plasmatiche con accumulo e aumento dell'emivita
Escrezione	Ridotta VFG nella donna	diminuzione della clearance renale

Ilaria Campesi.

L'assunzione di associazioni estro-progestiniche seleziona due popolazioni femminili che differiscono in molti aspetti inclusi i processi di metilazione del DNA.

Tesi di dottorato in Farmacologia di Genere, Università degli studi di Sassari.

L'assunto che donne e uomini metabolizzano e rispondono ai farmaci allo stesso modo non è più accettabile in quanto risulta chiaro come eventi sesso-specifici, quali la gravidanza, la menopausa e l'uso di CO, influenzino profondamente il metabolismo dei farmaci e quindi la risposta ad un dato trattamento.

Dalla valutazione delle clearance renali (volume di plasma che passando attraverso il rene viene depurato da una sostanza in un'unità di tempo) di alcuni farmaci è stato possibile risalire alle GD che si riscontrano nell'attività dei diversi sistemi enzimatici deputati al metabolismo dei farmaci (Franconi F et al., 2007) (Tab.2).

Tabella 2. Differenze di genere nell'attività degli enzimi deputati al metabolismo dei farmaci.

METABOLISMO	
Enzima/Reazione Enzimatica	Differenze uomo/donna
Alcol deidrogenasi gastrica	ridotta attività nella donna
CYP1A2	ridotta attività nella donna
CYP2D6	ridotta attività nella donna
CYP2C9	=
CYP2C19	non chiare
CYP2E1	ridotta attività nella donna
CYP3A4	aumentata attività nella donna, correlata all'età
Glucuronazione	ridotta attività nella donna
N-acetiltransferasi	=
Tiopurina metiltransferasi	ridotta attività nella donna
Diidropirimidina transferasi	ridotta attività nella donna
Catecol-O-metil transferasi	ridotta attività nella donna
DHEA ST	ridotta attività nella donna

Ilaria Campesi.

L'assunzione di associazioni estro-progestiniche seleziona due popolazioni femminili che differiscono in molti aspetti inclusi i processi di metilazione del DNA.

Tesi di dottorato in Farmacologia di Genere, Università degli studi di Sassari.

Le GD non riguardano solamente le diversità riscontrabili tra maschi e femmine, ma comprendono anche le differenze dovute alle varie fasi della vita riproduttiva di una donna. Infatti, anche l'assunzione di associazioni estrogeno-progestiniche, la gravidanza ed il ciclo mestruale possono avere influenza sui parametri farmacocinetici (Franconi F et al., 2007). Ad esempio, nel corso della gravidanza la donna va incontro a diverse modificazioni fisiologiche che possono far variare alcune proprietà farmacocinetiche dei farmaci che assume. L'assorbimento dei farmaci utilizzati per via orale può essere modificato da sintomi quali nausea e vomito, comuni nei primi mesi di gravidanza. I cambiamenti ormonali, inoltre, producono un rallentamento dello svuotamento gastrico e del transito intestinale e possono far ritardare l'inizio di azione di alcuni farmaci ai quali è richiesto un effetto terapeutico rapido. La distribuzione di alcuni farmaci può subire delle variazioni anche in relazione all'aumento progressivo del volume del plasma nel corso della gravidanza. Il metabolismo di alcuni farmaci è maggiore durante la gravidanza; ad esempio farmaci metabolizzati dal CYP2D6 (fluoxetina, citalopram), CYP2A6 (nicotina), e CYP3A4 (ad esempio, inibitori delle proteasi) presentano concentrazioni sieriche sostanzialmente inferiori verso la fine della gravidanza (Koren G, 2006). Inoltre l'aumento del progesterone inibisce l'attività del CYP1A2 e aumenta quella del CYP3A4 (Tracy TS et al., 2005). Nelle donne, a partire dalla sesta settimana di gestazione la VFG aumenta, benché il riassorbimento tubulare renale non sembri subire modificazioni durante la gravidanza.

Va, poi, considerato che la maggior parte delle donne assume associazioni estrogeno-progestiniche durante la propria vita e questo influenza sia la risposta ai farmaci (Tab.3) che alcuni parametri fisiologici. I CO sono stati introdotti sul mercato quasi 50 anni fa, e ad oggi più di 100 milioni di donne utilizzano questo metodo per il controllo della fertilità. In uno studio effettuato nel 2003 in cinque paesi europei, tra cui l'Italia, su un campione di donne di età compresa tra 15 e 49 anni, è stata stimata una prevalenza di utilizzo di CO pari al 19% in Italia e Spagna, al 27% in Gran Bretagna, al 34% in Germania e al 45% in Francia (Skouby SO, 2004).

Ilaria Campesi.

L'assunzione di associazioni estrogeno-progestiniche seleziona due popolazioni femminili che differiscono in molti aspetti inclusi i processi di metilazione del DNA.

Tesi di dottorato in Farmacologia di Genere, Università degli studi di Sassari.

Tabella 3. Interazioni tra contraccettivi orali e altri farmaci

Classe di farmaci	Effetto dei CO	Effetto sui CO
Anticonvulsivanti carbamazepina, fenitoina, fenobarbitale, topiramato, primidone Lamotrignina	Aumento delle concentrazioni di fenitoina Diminuzione delle concentrazioni di lamotrignina	Diminuzione efficacia CO per ridotto metabolismo epatico Diminuzione efficacia CO per probabile aumento del trasporto intestinale
Antibiotici Rifampicina Penicilline, cefalosporine, macrolidi, metronidazolo, tetracicline		Diminuzione efficacia CO per ridotto metabolismo epatico Diminuzione efficacia CO per probabile aumento del trasporto intestinale
Corticosteroidi	Aumento delle concentrazioni dei corticosteroidi	
Ciclosporina	Aumento delle concentrazioni di ciclosporina	
Warfarin	Aumento o diminuzione delle concentrazioni di warfarin per alterazione del metabolismo	
Inibitori delle proteasi indinavir,atazanavir nelfinavir, ritonavir		aumento dei livelli ematici dei CO riduzione dei livelli ematici dei CO
Paracetamolo		aumento dei livelli ematici dei CO
Lipolipemizzanti Atorvastatina		aumento delle concentrazioni plasmatiche dei CO

Ilaria Campesi.

L'assunzione di associazioni estro-progestiniche seleziona due popolazioni femminili che differiscono in molti aspetti inclusi i processi di metilazione del DNA.

Tesi di dottorato in Farmacologia di Genere, Università degli studi di Sassari.

La pillola rappresenta il contraccettivo ormonale più diffuso, caratterizzato da principi attivi, schemi e dosaggi molto diversificati. Le diverse pillole hanno, invece, effetti collaterali, interazioni, controindicazioni, benefici e modalità di assunzione molto simili tra loro. La maggior parte dei CO è costituita da un progestinico e da un estrogeno di sintesi. Il blocco dell'ovulazione è il meccanismo principale con il quale la pillola esercita la sua attività anticoncezionale (Frye CA, 2006). Proprio come l'innalzamento dei livelli di estrogeni e di progesterone che si trovano naturalmente in circolo, allo stesso modo la combinazione di estrogeni e progestinico contenuta nei CO inibisce il funzionamento dell'ipotalamo e dell'ipofisi; la soppressione degli ormoni gonadotropi a sua volta inibisce l'ovulazione. L'innalzamento dei livelli di estrogeni in circolazione impedisce la maturazione della cellula uovo, mentre l'azione provocata dalla componente progestinica blocca il picco di produzione di LH e FSH che precede l'ovulazione. A livello ovarico la somministrazione di estrogeni, anche a basso dosaggio, determina una limitazione della produzione pre-ovulatoria di estradiolo, mentre la somministrazione di un progestinico diminuisce la sintesi del progesterone durante la fase luteale. Il meccanismo d'azione dei contraccettivi a contenuto prevalentemente progestinico nasce dalla combinazione del blocco dell'ovulazione con altri effetti, quali una diminuzione della motilità tubarica (Sondheimer SJ, 2008). L'azione degli estrogeni sulle tube provoca delle modificazioni nel tessuto tubarico tali da disturbare l'accoglimento ed il trasporto dell'ovocita. La somministrazione di un progestinico all'inizio del ciclo, quando cioè i livelli del progesterone naturalmente in circolo sarebbero ancora bassi, inibisce la proliferazione dell'endometrio. Di conseguenza, anche nell'eventualità in cui si abbia ugualmente una fecondazione, nonostante l'utilizzo del contraccettivo, l'endometrio non sarebbe comunque in grado di sostenere la crescita della cellula uovo fecondata.

Recentemente si sono affacciati sul mercato nuovi schemi posologici e nuove modalità di assunzione della pillola, anche se nessuno di questi schemi ha una validità di per sé superiore agli altri. Le pillole a base di estrogeni e progestinici si dividono in monofasiche, difasiche e trifasiche (Van Vliet HA et al., 2002;

Ilaria Campesi.

L'assunzione di associazioni estro-progestiniche seleziona due popolazioni femminili che differiscono in molti aspetti inclusi i processi di metilazione del DNA.

Tesi di dottorato in Farmacologia di Genere, Università degli studi di Sassari.

van Vliet HA et al., 2002). Esistono, inoltre, delle pillole a base di solo progestinico (mini-pillola). La pillola monofasica è una pillola che mantiene inalterato il suo dosaggio ormonale per tutta la durata del ciclo. Tutte le pillole sono uguali tra di loro e devono essere assunte per 21 giorni consecutivi. Nei 7 giorni di intervallo tra un ciclo e l'altro si presenta un'emorragia similmenstruale da sospensione.

Nella pillola bifasica i dosaggi dell'estrogeno e del progestinico non sono costanti. Nella prima parte del ciclo (7 giorni) è più alto il dosaggio estrogenico, nella seconda (15 giorni) è più elevato quello progestinico. In questo modo si è cercato di mimare l'andamento del ciclo mestruale, con l'obiettivo, non sempre raggiunto, di ottenere una migliore tollerabilità e un miglior controllo del ciclo. Naturalmente, in questo caso, non si può cominciare l'assunzione da una pillola qualsiasi, ma si deve cominciare da quella con il dosaggio maggiore di estrogeni. Per questo le pillole all'interno della confezione sono colorate in modo diverso.

Con la pillola trifasica si è cercato di andare ancora più incontro al ciclo fisiologico, creando tre diversi dosaggi di estrogeno e di progestinico. L'estrogeno è inizialmente basso per 6 giorni, più alto nei successivi 5, per poi ritornare ai livelli di partenza negli ultimi 10. Il progestinico, invece, incrementa costantemente nelle tre fasi di dosaggio.

Molti CO sono stati associati a cambiamenti del metabolismo glucidico (Adams MR et al., 1990; Watanabe RM et al., 1994). Le alterazioni possono comprendere una ridotta tolleranza al glucosio ed un aumento della resistenza all'insulina, che rappresentano ben noti fattori di rischio per diabete mellito di tipo 2 e per malattia cardiovascolare. Queste problematiche sono sorte sia con l'uso di contraccettivi a base di solo progestinico che con quelli contenenti estrogeno. Questi potenziali effetti potrebbero influenzare le raccomandazioni per l'uso, e l'uso stesso, di questi CO così diffusi.

Ilaria Campesi.

L'assunzione di associazioni estro-progestiniche seleziona due popolazioni femminili che differiscono in molti aspetti inclusi i processi di metilazione del DNA.

Tesi di dottorato in Farmacologia di Genere, Università degli studi di Sassari.

✓ *Malattie cardiovascolari, genere e ruolo dei macrofagi*

Differenze di genere sono state descritte a vari livelli (Legato MJ, 2004; Franconi F et al., 2007), in particolare il sistema immunitario e quello cardiovascolare sembrano presentare un importante dimorfismo sessuale (Legato MJ, 2004; Pilote L et al., 2007).

Le donne in età fertile, in genere, hanno un sistema immunitario sia per quanto riguarda la risposta cellulare, che umorale, più efficiente rispetto a quello maschile (Grossman C, 1989; Fairweather D and Frisancho-Kiss S, 2008).

Ictus e infarto del miocardio, patologie in cui è possibile mettere in evidenza notevoli differenze di genere, rappresentano le complicazioni più serie dell'aterosclerosi (Mendelsohn ME and Karas RH, 2005; Franconi F et al., 2007). In generale, sia nell'uomo che nella donna, in tempi e modi diversi, l'incidenza delle malattie cardiovascolari (MCV) è in continua crescita; diversi studi clinici, sperimentali ed epidemiologici enfatizzano il fatto che le differenze di genere sono rintracciabili nelle manifestazioni delle MCV (Legato MJ, 2004; Hirakawa Y et al., 2007). E' possibile affermare che la donna sviluppa MCV dai 10 ai 20 anni più tardi rispetto all'uomo e, nel caso l'età sia paragonabile, si è spesso visto che la gravità delle patologie nelle donne è molto maggiore (Regitz-Zagrosek V, 2006). Un'altra differenza è rappresentata dal fatto che nell'uomo l'insorgenza e la progressione delle MCV sono costanti con l'avanzare dell'età, mentre nella donna lo stato biologico influenza sia l'insorgenza che l'incidenza delle MCV, aumentando in maniera evidente durante la menopausa, condizione in cui vengono a mancare gli effetti protettivi degli ormoni sessuali femminili (Mendelsohn ME and Karas RH, 2005; Regitz-Zagrosek V, 2006).

E' noto che le MCV e, in particolare, l'aterosclerosi, sono caratterizzate da processi infiammatori (Pasqui AL et al., 2005; Franconi F et al., 2007). In questa patologia i macrofagi partecipano alla formazione delle foam cells (Ross R, 1993), che avviene in seguito all'uptake delle lipoproteine a bassa densità (LDL) modificate da parte dei monocyte-derived macrophages (MDMs) della parete vasale (Tabas I, 1995) (Fig.1).

Ilaria Campesi.

L'assunzione di associazioni estro-progestiniche seleziona due popolazioni femminili che differiscono in molti aspetti inclusi i processi di metilazione del DNA.

Tesi di dottorato in Farmacologia di Genere, Università degli studi di Sassari.

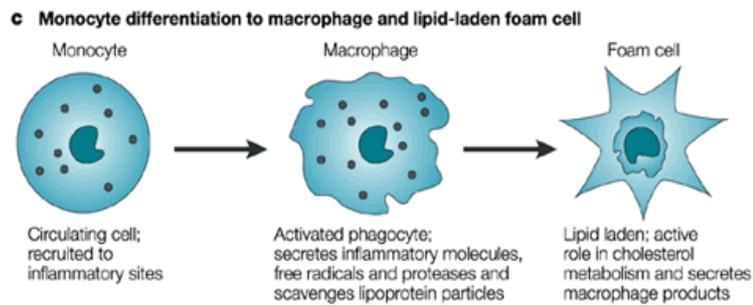


Figura 1. Formazione delle foam cells

Una volta entrate in questa sede le LDL subiscono delle modificazioni ossidandosi ed aumentando la permeabilità dell'endotelio vascolare verso monociti e linfociti T che migrano così all'interno della parete.

Con il passare del tempo queste cellule evolvono in macrofagi ed ingeriscono le LDL ossidate accumulando vacuoli lipidici nello spazio citoplasmatico (foam cells o cellule schiumose).

Le foam cells secernono delle sostanze pro-infiammatorie e fattori di crescita che inducono proliferazione delle fibrocellule muscolari lisce (Fig. 2).

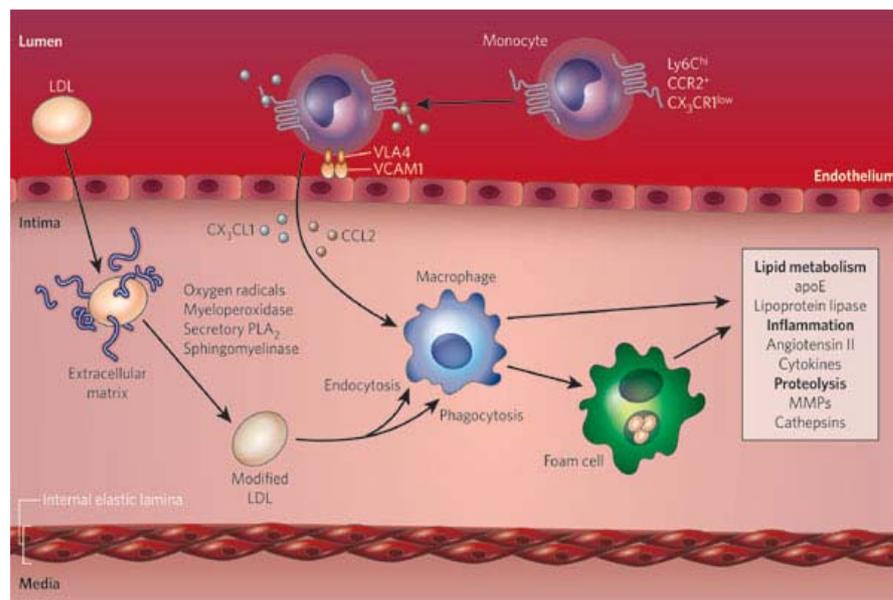


Figura 2. Modificazioni delle LDL e sostanze liberate dalle foam cells.

Ilaria Campesi.

L'assunzione di associazioni estro-progestiniche seleziona due popolazioni femminili che differiscono in molti aspetti inclusi i processi di metilazione del DNA.

Tesi di dottorato in Farmacologia di Genere, Università degli studi di Sassari.

Recenti studi suggeriscono che alcune modificazioni delle LDL ed il loro uptake nei macrofagi siano controllati proprio dagli ormoni sessuali (Schmitz G and Grandl M, 2007) e quindi non meraviglia che la formazione delle foam cells possa essere regolata, fra l'altro, da questi ormoni.

Il processo infiammatorio implicato nell'aterosclerosi si accompagna alla produzione delle specie reattive dell'ossigeno (ROS) (Harrison D et al., 2003; Paravicini TM and Touyz RM, 2006).

Il DNA è probabilmente il bersaglio critico dei radicali liberi che lo attaccano determinando lesioni ossidative come modificazioni delle basi, rottura di uno o entrambi i filamenti, cross-linking dei filamenti. Queste lesioni sono capaci, se non riconosciute e riparate, di impedire l'esecuzione di processi vitali come la trascrizione e la replicazione. Conseguenze di questi processi possono essere: l'arresto della crescita cellulare, uno stato d'instabilità genomica che può innescare l'apoptosi, la senescenza cellulare, l'induzione di mutazioni che possono portare allo sviluppo di tumori, la morte cellulare (Hasty P et al., 2003).

Il TNF- α è una citochina che gioca un importante ruolo nell'infiammazione. Inizialmente descritta per la sua attività anti-tumorale, questa citochina pro-infiammatoria è implicata in diverse patologie infiammatorie come l'artrite reumatoide, lo shock settico, la malaria cerebrale e il cancro. Il TNF- α è prodotto da diversi tipi di cellule come linfociti T, cellule endoteliali, linfociti B ed anche monociti e macrofagi attivati. Alcune delle funzioni svolte dal TNF- α sono rappresentate dalla mediazione della sintesi di prostaglandine e IL-1, induzione dell'espressione di molecole di adesione, induzione di enzimi degradanti il tessuto connettivo appartenenti alla classe delle metalloproteinasi di matrice (MMP) e attivazione delle cellule B. La sua secrezione può essere indotta in vitro dagli esteri del forbolo, come il forbolo acetato miristato (PMA), o dal lipopolisaccaride (LPS) (Di Girolamo N et al., 1997).

Le citochine svolgono importanti azioni autocrine e paracrine che sono alla base dei processi infiammatori (Kuiper J et al., 2007). Fra le varie citochine, il TNF- α appare di particolare interesse perché porta alla produzione di ROS (Shen HM and Pervaiz S, 2006) e perché sembra essere uno dei link che collega l'obesità al

Ilaria Campesi.

L'assunzione di associazioni estro-progestiniche seleziona due popolazioni femminili che differiscono in molti aspetti inclusi i processi di metilazione del DNA.

Tesi di dottorato in Farmacologia di Genere, Università degli studi di Sassari.

diabete e alle malattie cardiovascolari (Park HS et al., 2005). Inoltre, numerose differenze di genere sembrano riguardare il sistema del TNF- α (Jo D et al., 2005; Wang M et al., 2005; Wang M et al., 2006) essendo probabilmente la sua ridotta sintesi nel sesso femminile, estrogeno-dipendente (Moxley G et al., 2002).

✓ *Epigenetica e metilazione del DNA*

Si intende per Epigenetica una qualunque attività di regolazione dei geni tramite processi chimici che non comportino cambiamenti nel codice del DNA ma possono modificare il fenotipo dell'individuo e/o della progenie (ad esempio la metilazione del DNA e l'acetilazione degli istoni) (Gruenert DC and Cozens AL, 1991).

La metilazione che contribuisce all'eredità epigenetica può avvenire attraverso la metilazione del DNA o delle proteine.

La metilazione del DNA è una delle più importanti modificazioni post-replicative del genoma (Patra SK and Bettuzzi S, 2009). Si tratta di un tipo di modificazione chimica di DNA che si sono stabilizzati per cicli di divisione cellulare, ma non comportano modifiche nella sequenza del DNA di base dell'organismo. Cromatina e modificazioni del DNA sono due caratteristiche importanti dell'epigenetica e svolgono un ruolo nel processo di differenziazione cellulare, consentendo alle cellule di mantenere stabilmente le diverse caratteristiche. Tuttavia, il livello di metilazione del DNA è dinamica nel corso dello sviluppo degli organismi pluricellulari. Consiste nel legame covalente di gruppi metilici alle basi azotate del DNA che, nei vertebrati, avviene tipicamente nei siti CpG (citosina-fosfato-guanina; che si ha dove la citosina è direttamente seguita da una guanina nella sequenza del DNA). La formazione del Me-CpG è catalizzato dall'enzima DNA metiltransferasi. I siti CpG sono poco comuni nel genoma degli invertebrati, mentre sono spesso trovati con maggiore densità nei promoters genici dei vertebrati, in cui sono collettivamente denominati isole CpG. Lo stato di metilazione di questi siti

Ilaria Campesi.

L'assunzione di associazioni estro-progestiniche seleziona due popolazioni femminili che differiscono in molti aspetti inclusi i processi di metilazione del DNA.

Tesi di dottorato in Farmacologia di Genere, Università degli studi di Sassari.

CpG può avere un grave impatto sull'attività/espressione genica in quanto è associata a ridotti livelli di trascrizione dei geni. Grazie all'azione di alcuni enzimi che sono delle specifiche metiltransferasi, al C-5 della Citosina viene legato un gruppo metile tramutandola così in 5-Metilcitosina (Fig. 3).

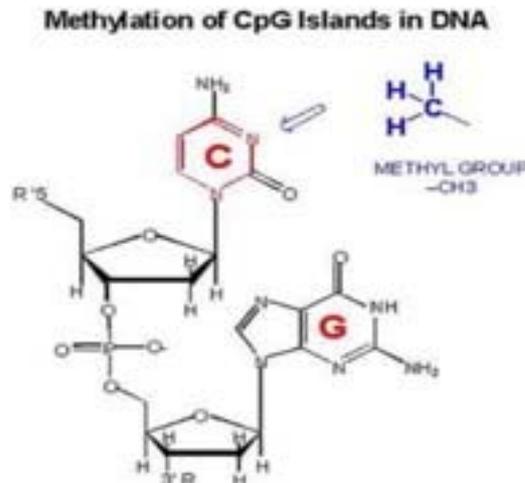


Figura 3. trasferimento di un gruppo metile sul C5 della citosina

Nelle cellule normali la metilazione avviene soprattutto nelle regioni povere di citosina e guanina, mentre le zone ricche di C-G, chiamate “isole CpG” restano **non** metilate, Le citosine localizzate in posizione 5’ rispetto alle guanine sono presenti nelle regioni regolatrici di molti geni. La loro metilazione incide profondamente sull’espressione di diversi geni eucariotici. Pertanto una più estesa metilazione anche delle “isole CpG” è associata ad inattivazione delle regioni regolatrici di geni “imprinted”, così come nelle sindromi di Prader-Willy (malattia genetica rara caratterizzata dall’alterazione del cromosoma 15) (Buiting K et al., 1994) ed Angelman (malattia genetica dovuta a un difetto nella duplicazione cromosomica da imprinting genetico) (Glenn CC et al., 1993) e all’inattivazione di geni soppressori dei tumori.

Tra le importanti funzioni biologiche controllate dalla metilazione del DNA un ruolo importante è svolto da questa modificazione epigenetica nel processo tumorigenico. Il processo di metilazione del DNA è coinvolto nella

Ilaria Campesi.

L’assunzione di associazioni estro-progestiniche seleziona due popolazioni femminili che differiscono in molti aspetti inclusi i processi di metilazione del DNA.

Tesi di dottorato in Farmacologia di Genere, Università degli studi di Sassari.

carcinogenesi in modo paradossale in quanto è possibile osservare che quel quadro di metilazione bimodale che caratterizza le cosiddette cellule “normali” viene ad essere ribaltato al punto che l’ipermetilazione che caratterizza circa il 99% del DNA genomico viene ad essere sostituita nelle cellule tumorali da una diffusa ipometilazione mentre le regioni CpG, localizzate essenzialmente a monte di geni costitutivi e caratterizzate da un quadro non metilato, diventano metilate con perdita d’ espressione di geni oncosoppressori (de Capoa A et al., 2003). Questi fenomeni epigenetici alterano l'accessibilità fisica al genoma da parte di complessi molecolari deputati all'espressione genica e, quindi, alterano il grado di funzionamento dei geni.

Alterazioni nel grado di metilazione del DNA sono state associate con alcune patologie; ad esempio è stato dimostrato che l’ipermetilazione globale del DNA è associata con l'infiammazione e un aumento della mortalità in malattie renali croniche (Stenvinkel P et al., 2007).

L'infiammazione cronica è stata riportata come uno dei fattori associati ad un aumento della metilazione del DNA sia nella gastrite cronica (Kang GH et al., 2003) che nel cancro allo stomaco (Jang TJ et al., 2001).

Modificazioni epigenetiche potrebbero essere più importanti dei polimorfismi genetici nella patogenesi dell'aterosclerosi (Dong C et al., 2002). Potrebbe essere ipotizzato che la metilazione aberrante del DNA possa contribuire ad aterosclerosi per upregulation di geni aterosclerosi sensibili e downregulation di geni aterosclerosi-protettivi. Infatti, è stato dimostrato in vitro che l’inattivazione metilazione-associata del recettore α degli estrogeni, svolge un ruolo nell'aterogenesi e nell'invecchiamento del sistema vascolare (Post WS et al., 1999).

✓ *Tioli plasmatici*

La **metilazione proteica** ha solitamente luogo sui residui amminoacidici di arginina o lisina nella sequenza proteica. L'arginina può essere metilata una (arginina monometilata, MMA) o due volte, con entrambi i gruppi metile su un

Ilaria Campesi.

L'assunzione di associazioni estro-progestiniche seleziona due popolazioni femminili che differiscono in molti aspetti inclusi i processi di metilazione del DNA.

Tesi di dottorato in Farmacologia di Genere, Università degli studi di Sassari.

terminale azoto (arginina dimetilata asimmetrica, ADMA) o uno su entrambi gli atomi di azoto (arginina dimetilata simmetrica, SDMA) dalla peptidilarginina metiltransferasi (PRMTs). La lisina può essere metilata una, due o tre volte dalla lisina metiltransferasi. La metilazione proteica è stata studiata nel modo migliore negli istoni. Il trasferimento del gruppo metile dall'S-adenosil metionina (SAM) agli istoni è catalizzato da enzimi noti come istone metiltransferasi. Gli istoni che sono metilati su certi residui possono agire epigeneticamente per reprimere o attivare l'espressione genica. La metilazione proteica è un tipo di modificazione pre-trascrizionale.

I gruppi metilici necessari alle reazioni di metilazione biologiche derivano da donatori di metili introdotti con la dieta.

Un pathway chiave per molte di queste reazioni è rappresentato dal ciclo metabolico della metionina (Fig. 4).

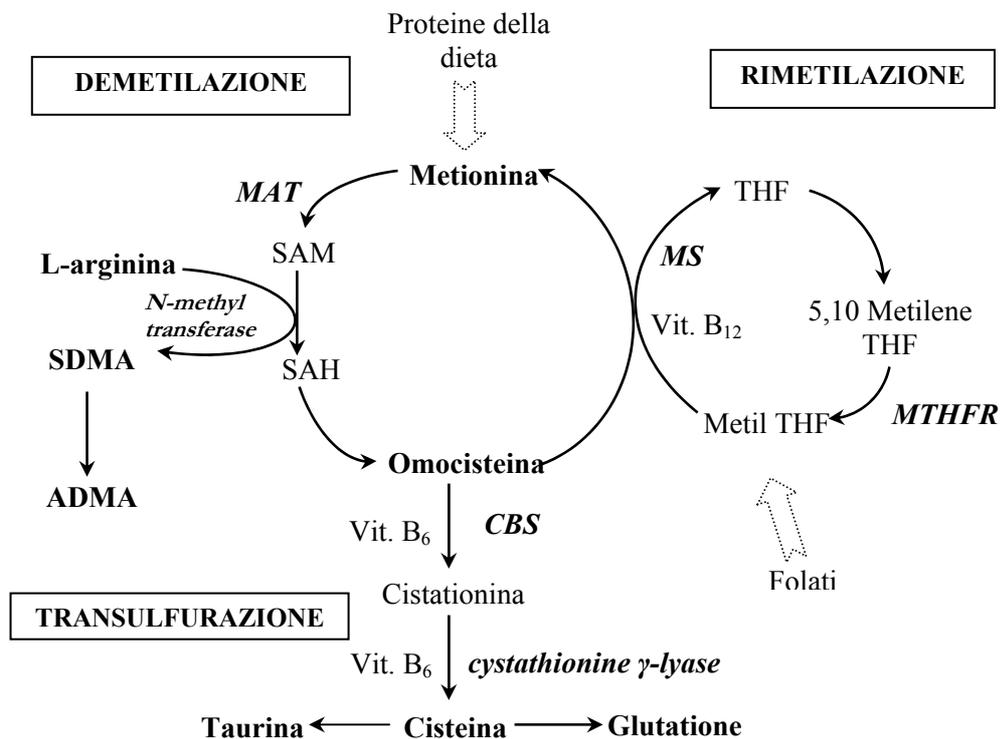


Figura 4. Ciclo metabolico della metionina.

Ilaria Campesi.

L'assunzione di associazioni estro-progestiniche seleziona due popolazioni femminili che differiscono in molti aspetti inclusi i processi di metilazione del DNA.

Tesi di dottorato in Farmacologia di Genere, Università degli studi di Sassari.

L'omocisteina. L'omocisteina (Hcy) è un prodotto intermedio della via metabolica della metionina; si trova all'intersezione di due vie metaboliche, quella della transulfurazione (a cisteina) e quella della rimetilazione (a metionina). La via metabolica dell'Hcy prevede (Selhub J, 1999):

- 1) transulfurazione irreversibile in cistationina e quindi a cisteina tramite la cistationina beta-sintetasi (CBS) e come cofattore il piridossal-fosfato (vit. B6);
- 2) rimetilazione a metionina tramite la metionina sintetasi (MS) che necessita come cofattore della transcobalamina (vit. B12 metilata) e, come donatore di metili, il 5 metiltetraidrofolato (metil THF) che viene rigenerato dal metilene tetraidrofolato reduttasi (MTHFR). La metionina-sintetasi (MS), inattivata durante la reazione, viene rigenerata dalla metionina sintetasi reduttasi riboflavina-dipendente;
- 3) rimetilazione alternativa tramite la betaina-omocisteina metiltransferasi e come donatore di metili la betaina.

La trans-sulfurazione e la rimetilazione betaina-dipendente avvengono esclusivamente nel fegato e nel rene mentre la rimetilazione folato e vitamina B12 dipendente è l'unica trasformazione metabolica dell'Hcy operante nei distretti cellulari periferici. La saturazione delle vie metaboliche intracellulari provoca un eccesso di Hcy che viene liberata nella circolazione dove si lega alle proteine plasmatiche o viene eliminata per via renale.

Un incremento dei livelli di Hcy plasmatica si registra con l'aumento dell'età (Strassburg A et al., 2004), ma può essere causato anche da mutazioni genetiche, deficit vitaminici, in particolare B12 e B6 (McCully K, 1998) malattia renali (van Guldener C and Robinson K, 2000) ed altre malattie e da numerosi farmaci. Questi aumenti sono associati con evidenze di laboratorio di aterogenesi con trombosi ed evidenze anche epidemiologiche di un incremento del rischio di manifestazioni per la malattia aterotrombotica vascolare come lo stroke ischemico (Terwecoren A et al., 2009). Quest'ultima associazione pare sia indipendente dagli altri fattori di rischio noti. Tuttavia trial randomizzati controllati non hanno dimostrato questa relazione causale ed il tema è quanto mai dibattuto e sebbene alcuni non hanno confermato la riduzione del rischio relativo con il trattamento utilizzando la Vit. B, non esclude in maniera certa

Ilaria Campesi.

L'assunzione di associazioni estro-progestiniche seleziona due popolazioni femminili che differiscono in molti aspetti inclusi i processi di metilazione del DNA.

Tesi di dottorato in Farmacologia di Genere, Università degli studi di Sassari.

una riduzione sino al 20% del rischio relativo di stroke (Schwammenthal Y and Tanne D, 2004).

La cisteina. La cisteina (cys) è un amminoacido polare. Per l'organismo umano adulto non è un amminoacido *essenziale*, in quanto può essere ottenuto dalla metionina tramite due reazioni: la transmetilazione, che trasforma la metionina in Hcy, seguita dalla transulfurazione, che trasforma l'Hcy in cisteina. La cys è inoltre il substrato per la sintesi del glutatione (GSH). La cys ha una generale citotossicità in vitro e favorisce il distacco delle cellule endoteliali umane in coltura (Dudman NP et al., 1991). Possiede anche proprietà auto-ossidative in presenza di ioni metallici, con conseguente generazione di radicali liberi e perossido di idrogeno (Nath KA and Salahudeen AK, 1993). Questo amminotiolo può essere particolarmente aterogenico in soggetti ipercolesterolemici in quanto è in grado di supportare le modificazioni delle LDL superossido-mediate, facilitando così la formazione delle foam cells (Jacob N et al., 1999). Inoltre, la cys forma un addotto con NO e potrebbe dunque compromettere la funzione endoteliali (El-Khairi L et al., 2001). Rappresenta pertanto un potenziale fattore di rischio per patologie a livello cardiovascolare.

Il Glutatione, Il Glutatione, sintetizzato all'interno delle cellule a partire dagli amminoacidi cisteina, glutammato e glicina, svolge un ruolo fondamentale nella protezione antiossidante delle cellule e costituisce il maggiore pool sulfidrilico non proteico intracellulare, intermedio importante nell'azione del NO.

Esiste nelle forme ridotta (GSH) e ossidata (GSSG). Nello stato ridotto, il gruppo tiolo della cys è in grado di donare un equivalente riducente ($H^+ + e^-$) ad altre molecole instabili, come le specie reattive dell'ossigeno. In questo modo, il glutatione stesso diventa reattivo e reagisce facilmente con un altri glutationi reattivi per formare glutatione disolfuro (GSSG). Tale reazione è possibile grazie alla concentrazione relativamente alta di glutatione nelle cellule (fino a 5 mM nel fegato). GSH può essere rigenerato dal GSSG dall' enzima glutatione reduttasi.

Ilaria Campesi.

L'assunzione di associazioni estro-progestiniche seleziona due popolazioni femminili che differiscono in molti aspetti inclusi i processi di metilazione del DNA.

Tesi di dottorato in Farmacologia di Genere, Università degli studi di Sassari.

In cellule sane e tessuti, oltre il 90% del pool totale di glutazione è in forma ridotta (GSH) e meno del 10% esiste nella forma disolfuro (GSSG). Un aumento del rapporto GSSG/GSH è considerato indicativo di stress ossidativo.

Il GSH ha molteplici funzioni:

1. È il principale antiossidante endogeno prodotto dalle cellule, che partecipano direttamente nella neutralizzazione dei radicali liberi e di composti reattivi dell'ossigeno, così come il mantenimento nello stato ridotto (attiva) di antiossidanti esogeni come le vitamine C ed E (Pejaver RK and Watson AH, 1994).
2. Attraverso la coniugazione diretta, disintossica molti xenobiotici (composti stranieri) e cancerogeni, sia organici e inorganici (Lee DH et al., 2008).
3. E' essenziale per il sistema immunitario, ad esempio, (i) modula la presentazione dell'antigene ai linfociti, influenzando in tal modo la produzione di citochine e il tipo di risposta (cellulare o umorale) che si sviluppa, (ii) migliora la proliferazione dei linfociti aumentando in tal modo l'entità della risposta, (iii) regola l'apoptosi, in modo da mantenere il controllo della risposta immunitaria (Hamilos DL et al., 1989; Ghibelli L et al., 1998).
4. Svolge un ruolo fondamentale in numerose reazioni metaboliche e biochimiche, come la sintesi e riparazione del DNA, la sintesi delle proteine, la sintesi delle prostaglandine, il trasporto degli aminoacidi e l'attivazione degli enzimi (Mailliard ME, 1993; Asensi M et al., 1996).

La taurina. La via metabolica primaria per la sintesi di taurina nei mammiferi avviene nel fegato nella via dell'acido sulfinico della cisteina. In questa via, il gruppo sulfidrico della cys è all'inizio ossidato a cisteina-acido sulfinico dall'enzima cisteina deossigenasi. La cisteina acido sulfinico, in seguito, è decarbossilata dalla cisteina-acido sulfinico decarbossilasi per formare ipotaurina. Non è chiaro se poi l'ipotaurina viene poi ossidata a taurina normale spontaneamente o per via enzimatica. La taurina ha due ruoli fisiologici ben documentati:

Ilaria Campesi.

L'assunzione di associazioni estro-progestiniche seleziona due popolazioni femminili che differiscono in molti aspetti inclusi i processi di metilazione del DNA.

Tesi di dottorato in Farmacologia di Genere, Università degli studi di Sassari.

1. Per molti animali/metazoi, la taurina è tra i principali osmoliti intracellulari ed è quindi un contributo importante alla regolazione del volume cellulare (Hansen SH, 2001; Oja SS and Saransaari P, 2007).

2. La taurina è coniugata attraverso il suo gruppo ammino-terminale agli acidi biliari acido chenodesossicolico e acido colico per formare il sale biliare taurochenodesossicolato di sodio e taurocolato di sodio (vedi bile). Il basso pKa (1.5) del gruppo sulfonico della taurina assicura che quella parte di molecola sia caricata negativamente nei range di pH che si trovano normalmente nel tratto intestinale e ciò migliora le proprietà surfatanti del coniugato dell'acido colico.

La taurina è anche implicata in un grande numero di vari fenomeni fisiologici inclusa l'inibizione della neurotrasmissione, il potenziamento a lungo termine dello striato/ippocampo (Molchanova SM et al., 2007) la stabilizzazione di membrana, l'inibizione feedback dei burst respiratori di neutrofili/macrofagi, e l'omeostasi del calcio (Foos TM and Wu JY, 2002). Gli effetti riscontrati sono relativamente poveri se comparati con i casi riportati sul ruolo della taurina nella sintesi degli acidi biliari e nella osmoregolazione.

Neonati prematuri che mancano nell'enzima necessario per convertire il cistatione in cys potrebbero diventare taurina-deficienti. Per questo la taurina è una componente essenziale nella dieta di questi neonati (Vina J et al., 1995).

Ci sono anche prove che l'eccesso di taurina negli adulti provochi ipertensione. Ad ogni modo, i suoi effetti positivi e negativi sugli uomini non sono stati pienamente documentati.

La taurina potrebbe prevenire l'insorgenza del diabete mellito nei topi NOD e modificare le curve da carico di glucosio negli adulti (Franconi F et al., 2006).

La taurina come antiossidante ha proprietà epatoprotettive (Erman F et al., 2004; Balkan J et al., 2005) e neuroprotettive (Wu H et al., 2005), quando somministrata terapeuticamente. Il ruolo antiossidante della taurina è stato attribuito alla sua capacità di scavenging dei ROS, alla riduzione della produzione dei prodotti finiti della perossidazione lipidica e alla stabilizzazione delle membrane (Schaffer S et al., 2003; Franconi F et al., 2004).

Sono stati ricercati molti impieghi terapeutici per la taurina, ma non sono mai stati confermati e allo stato attuale delle conoscenze nessuno di questi entra

Ilaria Campesi.

L'assunzione di associazioni estro-progestiniche seleziona due popolazioni femminili che differiscono in molti aspetti inclusi i processi di metilazione del DNA.

Tesi di dottorato in Farmacologia di Genere, Università degli studi di Sassari.

nella pratica clinica, quindi non è da considerare un farmaco ma al limite un integratore alimentare. Le condizioni in cui viene supposto un effetto benefico in relazione all'assunzione di taurina sono: malattie cardiovascolari, ipercolesterolemia, epilessia, degenerazione maculare, Morbo di Alzheimer, disordini epatici, specie alcoolismo, e fibrosi cistica.

La dimetilarginina asimmetrica. La dimetilarginina asimmetrica (ADMA) è una forma modificata post-traslazionalmente dell'arginina che viene prodotta nelle cellule durante il processo di turnover delle proteine. La sua biosintesi è catalizzata da una famiglia di enzimi chiamati protein-arginin-N-methyltransferasi (PRMT), che utilizzano SAM come donatore di gruppi metile (Zinellu A et al., 2007). La PRMT catalizza anche la conversione dell'arginina in monometilarginina (MMA) e dimetilarginina simmetrica (SDMA). Le concentrazioni plasmatiche di ADMA e SDMA sono molto basse ($<1\mu\text{M}$) rispetto a quelle degli altri amminoacidi. Circa l'80% dell'ADMA viene degradato a citrullina e dimetilammina dalla dimetildiammino idrolisi (DDAH), mentre la SDMA viene eliminata inalterata attraverso il rene (Obianyo O et al., 2008).

L'ADMA è un inibitore endogeno di tutte le isoforme di nitrossido sintasi (NOS) determinando una diminuzione della sintesi di nitrossido (NO). In questo modo determina un aumento pressorio, delle resistenze vascolari, riduce la vasodilatazione. A livello cardiaco l'ADMA riduce la frequenza cardiaca, mentre a livello renale riduce la perfusione, l'escrezione di sodio e causa ipertensione reno-vascolare (MacAllister R and Vallance P, 1994).

Un'esposizione a lungo termine all'ADMA può causare aterogenesi, ipertensione con danno ai reni e insufficienza cardiaca (Cayatte AJ et al., 1994; Boger RH et al., 2000).

Pertanto può essere considerato come un marker predittivo di disfunzione endoteliale in caso di ipercolesterolemia (Boger RH et al., 2000), ipertensione, diabete di tipo 2, insulino-resistenza, iperomocisteinemia (Boger RH et al., 2001; Stuhlinger MC et al., 2001), aterosclerosi, insufficienza renale (Vallance P et al., 1992) e preeclampsia (Savvidou MD et al., 2003) (Fig. 5).

Ilaria Campesi.

L'assunzione di associazioni estro-progestiniche seleziona due popolazioni femminili che differiscono in molti aspetti inclusi i processi di metilazione del DNA.

Tesi di dottorato in Farmacologia di Genere, Università degli studi di Sassari.

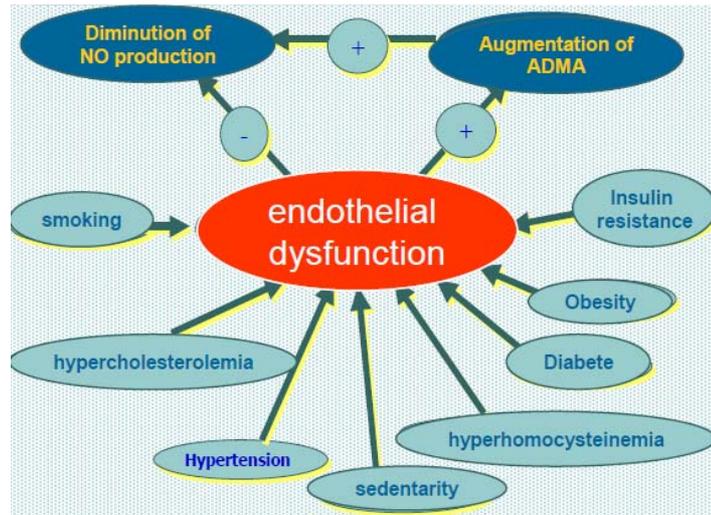


Figura 5. Livelli di ADMA e situazioni che determinano un danno endoteliale.

Ilaria Campesi.

L'assunzione di associazioni estro-progestiniche seleziona due popolazioni femminili che differiscono in molti aspetti inclusi i processi di metilazione del DNA.

Tesi di dottorato in Farmacologia di Genere, Università degli studi di Sassari.

MATERIALI E METODI

Reclutamento dei soggetti

Lo studio ha coinvolto volontari sani, di sesso femminile e maschile di età compresa tra i 18 e i 40 anni. Le femmine sono state esaminate nella fase follicolare del ciclo mestruale e sono state divise in due gruppi in base all'assunzione o meno di CO orali. Le informazioni riguardanti sesso, età, peso, altezza, assunzione di farmaci sono state raccolte insieme alle misurazioni dei valori ematologici e plasmatici ottenuti con procedure standard. Per ogni volontario è stato calcolato l'indice di massa corporea (BMI) come peso in kg diviso il quadrato dell'altezza (espressa in metri).

Sono stati ammessi allo studio soggetti con valori di colesterolemia inferiori a 250 mg/ml e di trigliceridemia inferiori a 200 mg/ml. Sono stati esclusi soggetti con patologie renali, epatiche e cardiache, con diabete e altre patologie endocrine, ed anche soggetti che facevano uso di farmaci che modificano il metabolismo lipidico ed energetico e di farmaci anoressizzanti. I CO assunti dai soggetti reclutati appartengono tutti alle nuove generazioni di pillole e sono stati classificati in base all'attività androgenica/antiandrogena del progestinico di sintesi presente nella formulazione (Tab. 4).

principi attivi
Drospirenone + etinilestradiolo
Clormadinone + etinilestradiolo
Gestodene + etinilestradiolo
Desogestrel + etinilestradiolo
Levonorgestrel+ etinilestradiolo
Ciproterone + etinilestradiolo

Tabella 4. Classificazione dei CO in base all'attività del progestinico presente nella formulazione.

Ilaria Campesi.

L'assunzione di associazioni estro-progestiniche seleziona due popolazioni femminili che differiscono in molti aspetti inclusi i processi di metilazione del DNA.

Tesi di dottorato in Farmacologia di Genere, Università degli studi di Sassari.

Il Drospirenone ed il clormadinone hanno un'attività antiandrogenica e antimineralcorticoide; il Gestodene, Desogestrel, ed il Levonorgestrel presentano un'attività androgenica; il Ciproterone è un antiandrogeno.

Analisi ematiche effettuate

Tutti i soggetti sono stati sottoposti ai comuni esami di routine. Il sangue venoso è stato prelevato tra le ore 8 e le ore 10 del mattino, a digiuno, e sono stati misurati i seguenti parametri: emocromo, formula leucocitaria, glicemia a digiuno, assetto lipidico, creatinina, acido urico, urea, bilirubina diretta, AST/GOT, ALT/GTP, gamma GT, fosfatasi alcalina, livelli ematici di calcio, sodio, potassio, ferro, capacità ferro legante, % saturazione, emoglobina, ferritina, proteina C reattiva, cortisolo, TSH, LH, FSH, estradiolo e testosterone.

Per poter tenere conto delle differenze di sesso nell'entità della massa corporea, i valori dei parametri ematici di creatinina, acido urico, urea, AST, ALT, gamma GT sono stati rapportati al BMI.

Dosaggio della MDA plasmatica

La misurazione dei TBARS (*Thiobarbituric Acid Reactive Substances*) costituisce un saggio d'elezione per lo screening ed il monitoraggio della perossidazione lipidica, tra i

maggiori indicatori dello stress ossidativo. La malonildialdeide (MDA) è un prodotto naturale della perossidazione lipidica. La perossidazione lipidica è un meccanismo consolidato di lesioni cellulari in entrambe le piante e gli animali ed è utilizzato come indicatore dello stress ossidativo nelle cellule e nei tessuti. I perossidi lipidici, derivati da acidi grassi polinsaturi, sono instabili e si decompongono per formare una serie complessa di composti, che includono composti carbonilici reattivi, come la MDA.

Il dosaggio della MDA plasmatica è stato effettuato per valutare il grado di perossidazione lipidica. Il sangue è stato centrifugato a 2500 g per 10 minuti a 4° C per ottenere plasma che, dopo centrifugazione, è stato immediatamente separato e conservato a -80° C fino al momento dell'analisi.

Ilaria Campesi.

L'assunzione di associazioni estro-progestiniche seleziona due popolazioni femminili che differiscono in molti aspetti inclusi i processi di metilazione del DNA.

Tesi di dottorato in Farmacologia di Genere, Università degli studi di Sassari.

A 200 µl di plasma sono stati addizionati 200 µl di acido acetico diluito (1:3 in H₂O). A questa miscela sono stati aggiunti 150 µl di sodio dodecilsolfato 10% (SDS) per poter facilmente far precipitare le proteine e 200 µl di Tris-HCl 50 mM. Tale soluzione è stata tenuta in incubazione per 10 minuti a temperatura ambiente (RT) e successivamente sono stati aggiunti 500 µl di una soluzione di acido tiobarbiturico 0,75% in acido acetico diluito (1:3). La miscela così ottenuta è stata bollire per 60 minuti, spenta in ghiaccio per 10 minuti e successivamente addizionata con 400 µl di acido acetico (1:3).

Dopo una centrifugazione a 4°C alla massima velocità per 20 minuti, è stata eseguita la lettura del sovrantante.

La quantificazione è stata effettuata spettrofotometricamente ad una lunghezza d'onda (λ) di 532 nm misurando l'assorbanza prodotta dal campione.

Standards di MDA a concentrazione nota sono utilizzati per la costruzione di una curva di riferimento contro la quale sono stati poi rapportati i campioni oggetto del monitoraggio.

La MDA forma con l'acido tiobarbiturico un addotto 1:2 come quello riportato in figura 6.

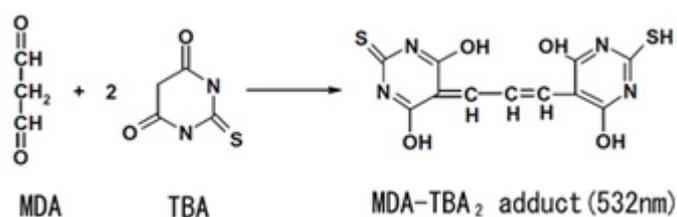


Figura 6. Formazione dell'addotto MDA-acido tiobarbiturico.

Valutazione del grado di metilazione globale del DNA (Sotgia S et al., 2008)

L'estrazione del DNA genomico è stata eseguita da sangue intero utilizzando il kit QIAamp DNA Blood Mini in base alle istruzioni fornite dal fornitore. Dopo l'estrazione sono state controllate la concentrazione e la purezza del DNA

Ilaria Campesi.

L'assunzione di associazioni estro-progestiniche seleziona due popolazioni femminili che differiscono in molti aspetti inclusi i processi di metilazione del DNA.

Tesi di dottorato in Farmacologia di Genere, Università degli studi di Sassari.

attraverso la valutazione dell'assorbimento UV a 260 e 260/280 nm, rispettivamente. E' stato considerato indicativo di purezza accettabile un rapporto di densità ottica 260/280 compresa tra 1,7 e 1,9. Il DNA purificato è stato conservato nel buffer di eluizione a -20°C fino alla successiva fase di idrolisi. Da 200 µl di eluato (50 µg /µl) ottenuto da ogni fase di purificazione, il DNA è stato precipitato con un uguale volume di 2 -isopropanolo freddo e il pellet ottenuto è stato lavato con etanolo freddo al 70%. Il pellet è stato poi risospeso in 100 µl di acido formico al 90% e incubato a 130 ° C per 80 minuti. Dopo l'idrolisi, i campioni sono stati concentrati a 60 ° C sotto vuoto e il residuo secco contenente le basi libere è stato sciolto in 50 µl di acqua ultrapura.

L'analisi per elettroforesi capillare è stata effettuata con un sistema MDQ dotato di un rilevatore Diode Array (Beckman Coulter, Milano, Italia), utilizzando un capillare non rivestito di silice fusa. Il buffer di separazione era costituito da stato un tampone Tris fosfato 100 mM a pH 3,75. Le curve di calibrazione sono state ottenute plottandol'area corretta (area del picco diviso per il tempo di migrazione) rispetto alle concentrazioni delle soluzioni standard di nucleotidi (da 0,25 a 200 uM). Le rette di calibrazione sono state utilizzate per calcolare le concentrazioni di citosina e metilcitosina nei controlli e nei campioni. La percentuale di citosina metilata rispetto al totale (mC/tC) è stata calcolata utilizzando la formula: $mC \text{ umol} / (\text{umol mC} + \text{umol C}) \times 100$.

Quantificazione di omocisteina, cisteina, cisteinilglicina, glutamilcisteina, GSH, taurina, arginina, ADMA, SDMA

Il sangue è stato centrifugato a 2500 g per 10 minuti a 4 ° C per ottenere plasma che, dopo centrifugazione, è stato immediatamente separato e conservato a -80 ° C fino al momento dell'analisi. Il plasma è stato impiegato per valutare i livelli plasmatici dei seguenti analiti: omocisteina, cisteina, cisteinilglicina, glutamilcisteina, GSH, taurina, arginina, ADMA, SDMA, attraverso la tecnica dell'elettroforesi capillare.

Per la determinazione di omocisteina, cisteina, cisteinilglicina, glutamilcisteina e GSH, 100 µl di standard o di plasma sono stati mescolati con 10 µl di tri-*n*-

Ilaria Campesi.

L'assunzione di associazioni estro-progestiniche seleziona due popolazioni femminili che differiscono in molti aspetti inclusi i processi di metilazione del DNA.

Tesi di dottorato in Farmacologia di Genere, Università degli studi di Sassari.

butylphosphine (TBP, 10%), vortexati per 30 secondi e successivamente incubati a 4 ° C per 10 minuti. Alla fine dell'incubazione sono stati aggiunti 100 µl di acido tricloroacetico (TCA10%), vortexati per 10 secondi e quindi centrifugati per 10 minuti a 3000 g. 100 µl di surnatante sono stati mescolati con 100 µl di Na₃PO₄ (300 mM, pH 12,5) e con 25 µl di 5-IAF (4,1 mM), e successivamente incubati a temperatura ambiente per 10 min. La miscela è stato diluita 1:100 prima di essere iniettata nella CE-LIF (capillary electrophoresis with laser-induced fluorescence) (Zinellu A et al., 2003).

Per la determinazione della taurina, un volume di 50 µl di plasma è stato mescolato con 50 µl di acido omocisteico (200 uM). 100 µl di TCA (10%) sono stati poi aggiunti per far precipitare le proteine. Dopo la centrifugazione a 3000 g per 5 minuti, 10 µl di surnatante limpido sono stati mescolati con 90 µl di Na₂HPO₄ (100 mM, pH 9,5) e 11 µl di fluoresceina isotiocianato (FITC, 15 mM). Dopo un'incubazione di 20 minuti a 100° C, i campioni sono stati diluiti 100 volte e iniettati in CE-LIF (Zinellu A et al., 2009).

Per la determinazione di arginina, ADMA, SDMA il plasma (400 µl) è stato miscelato con 50 µl di omoarginina (concentrazione finale di 50 mM). e addizionati con una miscela di ACN/ammoniaca (900 µl, 90:10) per la precipitazione delle proteine. Dopo centrifugazione a 3000g per 5 minuti, il supernatante è stato evaporato sotto vuoto e il residuo è stato disciolto con 500 µl di acqua filtrata mediante centrifugazione a 3000g per 20 minuti per rimuovere ulteriori residui di proteine. I campioni filtrati (300 µl) sono stati essiccati sotto vuoto ed il residuo è stato disciolto con 50 µl di acqua e iniettato nella CE (Zinellu A et al., 2007).

Ilaria Campesi.

L'assunzione di associazioni estro-progestiniche seleziona due popolazioni femminili che differiscono in molti aspetti inclusi i processi di metilazione del DNA.

Tesi di dottorato in Farmacologia di Genere, Università degli studi di Sassari.

Un riassunto di tutti i parametri misurati nei soggetti reclutati è riportato in tabella 5.

Glicemia	Globuli rossi
Colesterolo totale	Emoglobina
LDL-Chol	Ematocrito
HDL-Chol	MCV
Trigliceridi	Globuli bianchi
Creatinina	Neutrofilo (#)
Acido urico	Linfociti (#)
Urea	Monociti (#)
Bilirubina totale	Eosinofili (#)
Fosfatasi alcalina	Basofili (#)
Proteina C reattiva	Piastrine
Cortisolo	Tempo di protrombina
AST	DNA-Metilato (%metilcitosina)
ALT	MDA
GGT	Cys-Gly
Calcemia	Hcy
Natremia	Cys
Potasseemia	GSH
Sideremia	Glu-Cys
TIBC	Tau
% saturazione	Arg
Ferritina	ADMA
Testosterone	SDMA
Estradiolo	ADMA/Arg Ratio
LH	
FSH	
TSH	

Tabella 5. Parametri analizzati in tutti I soggetti reclutati per lo studio.

Ilaria Campesi.

L'assunzione di associazioni estro-progestiniche seleziona due popolazioni femminili che differiscono in molti aspetti inclusi i processi di metilazione del DNA.

Tesi di dottorato in Farmacologia di Genere, Università degli studi di Sassari.

Isolamento dei monociti

Il sangue, 40 ml circa, prelevato da volontari sani è stato trattato con ugual volume di destrano 2,5% in soluzione fisiologica e lasciato riposare per 30 minuti a temperatura ambiente (RT) per far sedimentare gli eritrociti. Il sedimento è stato quindi eliminato e il surnatante è stato stratificato con Histopaque 1077 e centrifugato a 400xg per 25 minuti a RT senza freno.

L'anello di leucociti, ben visibile all'interfaccia tra gli eritrociti residui ed il plasma surnatante, è stato raccolto, sospeso in 5 ml di PBS e centrifugato a 200xg per 5 minuti a RT. Il surnatante è stato eliminato e il pellet è stato risospeso in 5 ml PBS e centrifugato a 150xg per 10 minuti a RT. Il surnatante è stato eliminato e le cellule sono state risospese in terreno di coltura costituito da RPMI 1640 arricchito con 20% di FBS, 1% di antibiotico/antimicotico, glutammina 2mM e HEPES 10mM. Le cellule sono state quindi contate con emacitometro e seminate ad una densità di $2 \cdot 10^6$ cellule/cm². I leucociti sono stati mantenuti in incubatore a 37⁰ C e 5% CO₂. Dopo 24 ore le cellule non aderenti sono state allontanate ed i monociti adesi sono stati mantenuti in coltura per 8-10 giorni fino alla differenziazione in macrofagi.

Caratterizzazione dei macrofagi

La caratterizzazione dei macrofagi è stata effettuata, oltre che attraverso l'analisi morfologica al microscopio (Fig. 7), valutando sia l'espressione del CD14 che l'uptake di LDL acetilate (Dil Ac-LDL).

Espressione di CD14

L'espressione del CD14 (Fig. 8) è stata valutata nei primi tre giorni di coltura. Dopo l'isolamento, le cellule sono state seminate in una piastra da 48 pozzetti. Dopo aver eliminato il terreno di coltura è stato eseguito un lavaggio con PBS. Le cellule sono state fissate con paraformaldeide (PFA) al 4% per 5 minuti a RT, lavate con PBS, trattate con metanolo per 1 minuto a RT, lavate con PBS e incubate per 10 minuti a RT con blocking solution (BS) costituita da PBS, 4% di albumina di siero bovino (BSA) e 0,1% di triton X-100. Dopo aver eliminato la BS le cellule sono state incubate per 1 h a 37° con l'anticorpo primario anti-

Ilaria Campesi.

L'assunzione di associazioni estro-progestiniche seleziona due popolazioni femminili che differiscono in molti aspetti inclusi i processi di metilazione del DNA.

Tesi di dottorato in Farmacologia di Genere, Università degli studi di Sassari.

CD14 alla concentrazione di 0,05 mg/ml diluito 1:50 in BS. Sono stati eseguiti due lavaggi con BS e le cellule sono state incubate per 1 h a RT al buio con l'anticorpo secondario (anti-rabbit IgG coniugato con FITC) in rapporto 1:50 in BS. Le cellule sono quindi state lavate con BS e con PBS e per evidenziare il nucleo sono state incubate per 4 minuti a RT al buio con DAPI 0,5 mg/ml.

Uptake di Ac-LDL

Per valutare l'uptake di Ac-LDL (Fig. 9) le cellule sono state incubate per 3 h a 37° con Dil Ac-LDL. Dopo lavaggio con PBS le cellule sono state fissate con PFA 4% per 10 minuti a RT, lavate con PBS e incubate per 4 minuti a RT, al buio con DAPI 0,5 mg/ml.

Entrambe le colorazioni sono state quindi osservate e fotografate al microscopio munito di lampada a fluorescenza con ingrandimento 40x.

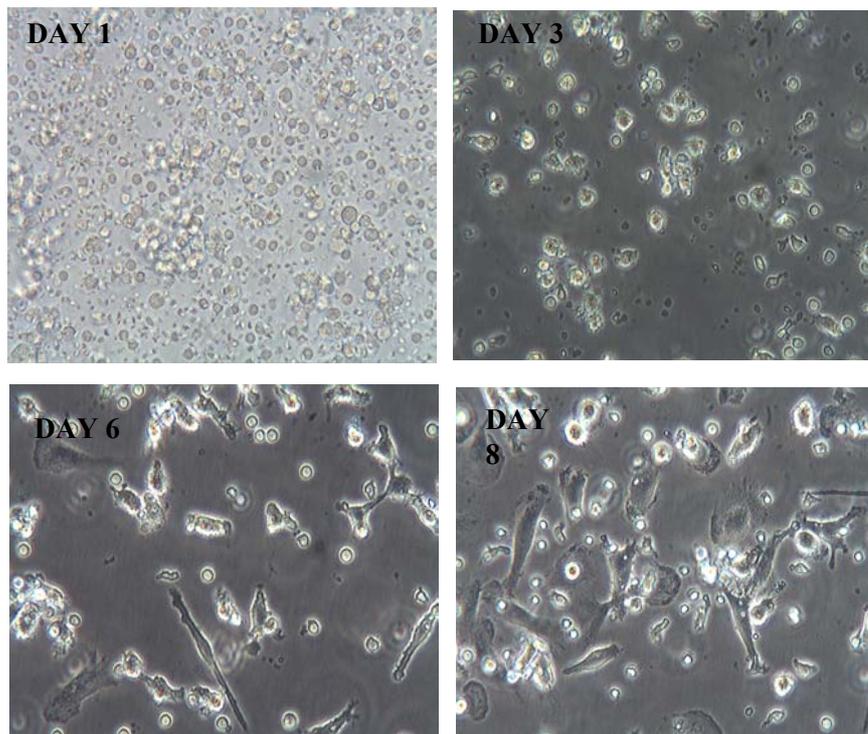


Figura 7. Trasformazione dei monociti in macrofagi nei diversi giorni di coltura

Ilaria Campesi.

L'assunzione di associazioni estro-progestiniche seleziona due popolazioni femminili che differiscono in molti aspetti inclusi i processi di metilazione del DNA.

Tesi di dottorato in Farmacologia di Genere, Università degli studi di Sassari.

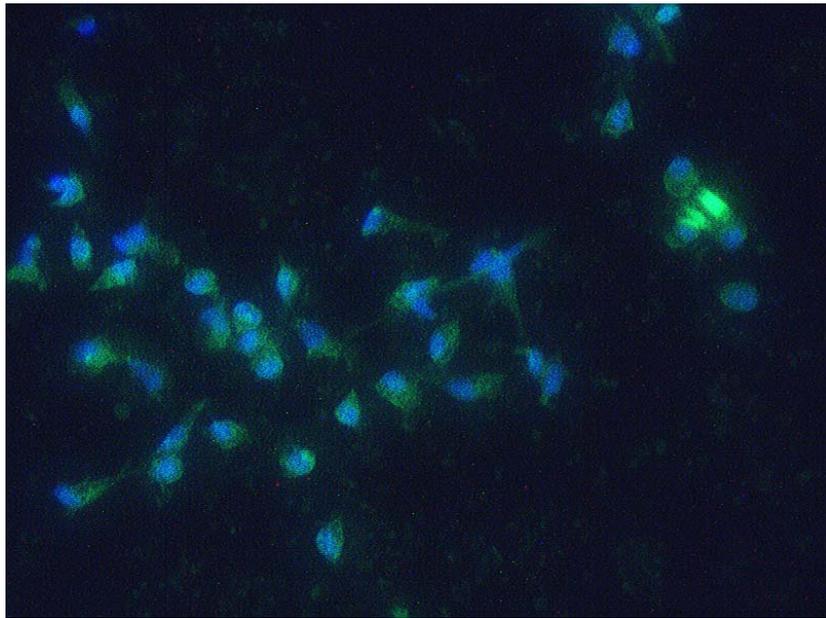


Figura 8. Espressione del CD14.

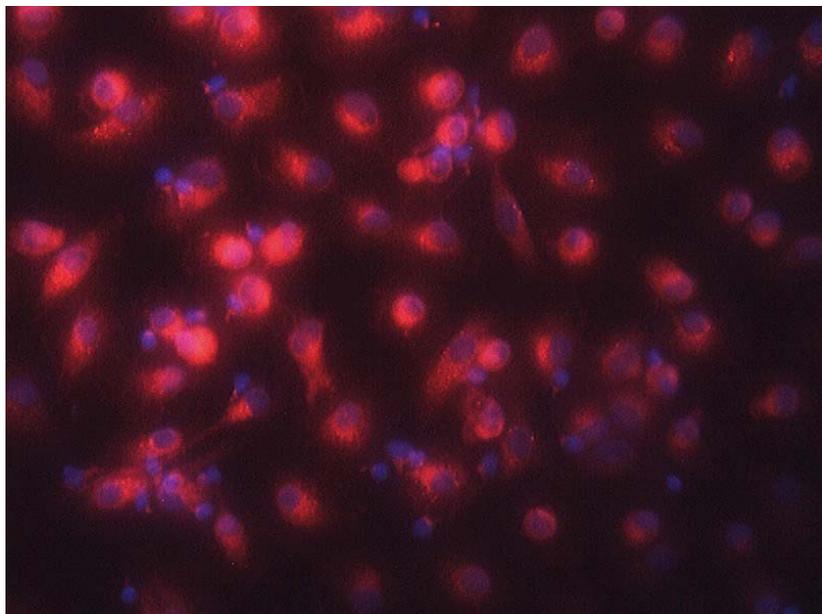


Figura. 9. Uptake delle Ac-LDL.

Ilaria Campesi.

L'assunzione di associazioni estro-progestiniche seleziona due popolazioni femminili che differiscono in molti aspetti inclusi i processi di metilazione del DNA.

Tesi di dottorato in Farmacologia di Genere, Università degli studi di Sassari.

Analisi d'immagine

Al fine di valutare se i monociti/macrofagi provenienti dai due sessi differenziassero allo stesso modo è stata eseguita una valutazione delle dimensioni cellulari attraverso un'analisi di immagine. Le cellule sono state fotografate nei diversi giorni di coltura (dal giorno 1 al giorno 8) con ingrandimento 40x utilizzando il programma Motic Image Plus. Per ogni fiasca (T25) sono state effettuate 4 foto disponendo la fiasca sempre nella stessa posizione. E' stata quindi calcolata l'area media delle cellule ottenuta dalla misurazione dell'area di almeno 5 cellule per foto con il programma Labworks di analisi d'immagine. L'analisi delle rette di regressione è stata utilizzata per valutare eventuali differenze nel tempo di differenziamento dei monociti ottenuti dai diversi gruppi sperimentali.

I macrofagi sono, inoltre, stati fotografati al giorno 10, dopo la raccolta del surnatanti, e anche a questo tempo è stata effettuata l'analisi di immagine. Tale misurazione è stata messa in relazione con le proteine totali dosate nei macrofagi al giorno 10. Questo ha permesso di verificare se una eventuale differenza nelle dimensioni potesse essere attribuita ad una diversa quantità di proteine.

Dosaggio delle proteine totali

La determinazione delle proteina totali è stata effettuata utilizzando il kit Pierce BCA protein assay. Questo metodo combina la riduzione di Cu^{2+} a Cu^{1+} da parte delle proteine in un mezzo alcalino con il rilevamento colorimetrico altamente sensibile e selettiva del catione rameoso (Cu^{1+}) utilizzando un reagente unico contenente acido bicinconinico (BCA). Il color porpora prodotto dalla reazione è costituito dalla chelazione di due molecole di BCA con uno ione rameoso. Questo complesso solubile in acqua presenta un forte assorbimento a 562 nm, che è quasi lineare con concentrazioni crescenti di proteine in un ampio intervallo di lavoro (20-2,000 $\mu\text{g/ml}$).

Per la determinazione delle proteine sono stati utilizzati i lisati dei macrofagi al giorno 10.

Ilaria Campesi.

L'assunzione di associazioni estro-progestiniche seleziona due popolazioni femminili che differiscono in molti aspetti inclusi i processi di metilazione del DNA.

Tesi di dottorato in Farmacologia di Genere, Università degli studi di Sassari.

La lisi è stata effettuata utilizzando un buffer di lisi composto da Tris-HCl (20 mM, pH 7.5), NaCl (150 mM), Na₂EDTA (1 mM), EGTA (1 mM), Triton X (1%) pirofosfato sodico (2,5 mM), β-glicerofosfato (1 mM), Na₃VO₄ (1 mM), leupeptina (1 µg/ml) e PMSF (a concentrazione finale 1 mM). Le cellule sono state incubate con il buffer per 15 minuti sotto ghiaccio e quindi staccate e trasferite in provette. Dopo centrifugazione a 4° C a 13000 rpm i surnatanti contenenti le proteine sono stati conservati a -80°C fino all'utilizzo.

La quantificazione delle proteine è stata effettuata aggiungendo a 10 µl di lisato 200 µl della soluzione di lavoro fornita dal kit. Dopo incubazione a 37° C per 30 minuti è stata letta l'assorbanza a 550 nm utilizzando un lettore di micropiastre.

Le concentrazioni di proteina sono state calcolate utilizzando una curva di riferimento costruita con soluzioni standard di albumina (25-2000 µg/ml).

Stimolazione dei macrofagi con LPS

La stimolazione con LPS è stata scelta poiché questo risulta essere un componente della parete esterna dei batteri gram-negativi ed è considerato il più potente immunogeno naturale. E' pertanto in grado di interagire con i recettori CD14 dei monociti-macrofagi, determinando l'attivazione di questi tipi cellulari.

All'ottavo giorno dall'isolamento le cellule sono state staccate meccanicamente mediante l'utilizzo di uno scraper, contaminate con ematocitometro e piastrate in piastre da 96 pozzetti, ad una densità di 140000 cellule/pozzetto, in RPMI completo. Il giorno successivo le cellule sono state stimolate con LPS (100ng/ml) in RPMI completo. Nel gruppo di controllo le cellule sono state messe in presenza del solo terreno completo. Dopo 24 h il surnatante è stato raccolto e conservato a -80°C.

Dosaggio di TNF-α

Il rilascio di TNF-α è stato misurato sia in condizioni basali che dopo 24 h di stimolazione con LPS (100ng/ml) utilizzando un kit commerciale per dosaggio ELISA.

Ilaria Campesi.

L'assunzione di associazioni estro-progestiniche seleziona due popolazioni femminili che differiscono in molti aspetti inclusi i processi di metilazione del DNA.

Tesi di dottorato in Farmacologia di Genere, Università degli studi di Sassari.

Nel saggio si fissa al substrato un anticorpo monoclonale specifico per l'antigene che vogliamo ricercare, si inserisce quindi il campione biologico di cui vogliamo verificare la presenza o meno dell'antigene. Si forma quindi un complesso antigene-anticorpo su cui viene inserito un anticorpo monoclonale marcato. La quantificazione avviene misurando la quantità di anticorpo marcato legato, grazie all'utilizzo di substrati colorimetrici.

Ad ogni pozzetto di una piastra da 96 pozzetti sono stati aggiunti 100 µl di Capture Antibody (mouse anti-human TNF-α) alla concentrazione di 4 µg/ml in PBS. La piastra è stata lasciata in incubazione overnight a temperatura ambiente.

I pozzetti sono stati lavati per tre volte con Wash Buffer (PBS+0.05% di Tween 20), incubati per 1 h a RT con Reagent Diluent (PBS+1% BSA) per bloccare i siti antigenici e lavati per tre volte con Wash Buffer.

Successivamente sono stati aggiunti 100µl di campione (controllo e stimolato con LPS), di standard ad ogni pozzetto, in duplicato. La piastra è incubata per 2 h a temperatura ambiente. Dopo i lavaggi è stato aggiunto Detection Antibody (biotinylated goat anti-human TNF-α) 250 ng/ml ad ogni pozzetto e incubato per 2h a temperatura ambiente. I pozzetti sono stati lavati con Wash Buffer e ad ognuno è stato aggiunto 100µl di Streptavidin-HRP per 20 minuti a RT al riparo dalla luce. Sono stati ripetuti i lavaggi con Wash Buffer e ad ogni pozzetto sono stati aggiunti 100µl di Substrate Solution e incubati per 20 minuti a RT al riparo dalla luce. Infine sono stati aggiunti 50µl di Stop Solution (H₂SO₄ 2N) ed è stata effettuata la lettura a 450 nm e 550 nm come lunghezza d'onda di riferimento con un lettore di micropiastre.

Dosaggio di H₂O₂

Il dosaggio di H₂O₂ è stato effettuato con un kit commerciale. Lo Standard, fornito alla concentrazione di 100ng/ml, è stato diluito eseguendo una diluizione seriale 1:2 in PBS, in modo da ottenere concentrazioni di 3,400, 1,700, 850, 425, 212,5 e 106,5 ng/ml che corrispondono a 100 µM, 50 µM, 25 µM, 12,5 µM, 6,25µM e 3,125µM rispettivamente.

Ilaria Campesi.

L'assunzione di associazioni estro-progestiniche seleziona due popolazioni femminili che differiscono in molti aspetti inclusi i processi di metilazione del DNA.

Tesi di dottorato in Farmacologia di Genere, Università degli studi di Sassari.

Nei pozzetti sono stati dosati 50 μ l di standard e campioni, tutti in duplicato. Ad ogni pozzetto sono stati aggiunti 100 μ l di Color Reagent e incubati per 30 minuti a RT. E' stata quindi effettuata la lettura a 550 nm con un lettore di micropiastre. La concentrazione dell'H₂O₂ presente nei campioni è stata calcolata dall'equazione della curva di calibrazione costruita con gli standard a concentrazione nota.

Analisi statistica

I dati sono stati espressi come media \pm deviazione standard (SD) se la loro distribuzione risultava normale; è stato utilizzato, invece, il valore della mediana se la distribuzione dei dati non mostrava un andamento gaussiano. L'analisi statistica dei dati è stata effettuata confrontando gli uomini verso le donne, le donne non trattate verso quelle trattate con CO e i controlli verso gli stimolati attraverso il test t di Student o il test per ranghi. Per il confronto di 3 gruppi è stato utilizzato, invece, il test One Way Anova.

Ilaria Campesi.

L'assunzione di associazioni estro-progestiniche seleziona due popolazioni femminili che differiscono in molti aspetti inclusi i processi di metilazione del DNA.

Tesi di dottorato in Farmacologia di Genere, Università degli studi di Sassari.

RISULTATI E DISCUSSIONE

1. Confronto tra la popolazione femminile e la popolazione maschile

La popolazione in esame è costituita da 44 maschi di età media di 27.6 ± 5.05 anni con un body mass index (BMI) di 23 e di 59 di donne di età media di 27.6 ± 5.22 anni con BMI di 21.

La popolazione in esame risultava omogenea per età, mentre si è stata osservata una differenza significativa nel BMI ($P < 0.05$). Per tale motivo alcuni parametri sono stati corretti per questo valore in modo tale da poter valutare l'influenza della composizione corporea sulle loro concentrazioni plasmatiche.

In entrambe le coorti si è proceduto all'esame dei parametri riportati nella sezione "materiali e metodi" (Tab. 5) e sono state evidenziate le differenze riportate in Tabella 6.

Ilaria Campesi.

L'assunzione di associazioni estro-progestiniche seleziona due popolazioni femminili che differiscono in molti aspetti inclusi i processi di metilazione del DNA.

Tesi di dottorato in Farmacologia di Genere, Università degli studi di Sassari.

Parametri	Maschi (n=44)	Femmine (n=59)
Colesterolo tot (mg/dl)	176.8±30.3	190.3±33.7*
HDL-Chol (mg/dl)	55.6±11.4	66.2±13.9°
Creatinina/BMI	0.040±0.005	0.034±0.005°
Acido urico (mg/dl)	5.11±1.28	3.83±1.03°
Urea (mg/dl)	33.1±7.5	27.1±8.4°
Cortisolo (ng/ml)	223.5	246.7*
Bilirubina totale (mg/dl)	0.60	0.46°
AST/BMI	1.13	1.00°
ALT/BMI	1.38	0.84°
GGT/BMI	1.00	0.69°
Natremia (mEq/L)	142.5±2.7	140.1±2.7°
TIBC (mg/dl)	314.0	375.0°
% saturazione	30.5±9.4	24.6±10.9 *
Ferritina (ng/ml)	139.0	34.0°
Globuli rossi (10¹²/l)	5.5	4.7°
Emoglobina (g/dl)	14.5±1.1	12.5±1.1°
Ematocrito (%)	43.3±2.7	37.6±2.8°
Piastrine (10⁹/l)	261.9±45.4	294.9±51.6*
Tempo di protrombina (sec)	11.2±0.5	10.59±0.6*
Estradiolo^x (pg/ml)	9.85 (N=17)	28.51 (N=32) °
LH (mUI/ml)	4.21	5.60*
FSH (mUI/ml)	3.32	5.82°
Testosterone (ng/dl)	473.5 (N=42)	41.45 (N=45) °

Tabella 6. Differenze tra la popolazione femminile e la popolazione maschile.

I dati sono espressi come media±SD o come valore della mediana se la distribuzione non era gaussiana. * P< 0.05; ° P< 0.001. ^x sono state escluse le donne trattate con CO.

Ilaria Campesi.

L'assunzione di associazioni estro-progestiniche seleziona due popolazioni femminili che differiscono in molti aspetti inclusi i processi di metilazione del DNA.

Tesi di dottorato in Farmacologia di Genere, Università degli studi di Sassari.

Sono state osservate differenze significative nei livelli di colesterolo totale e HDL tra i maschi e le femmine considerate nella totalità. Questi dati sono in accordo con i dati della letteratura (Davis CE et al., 1996; Fan AZ and Dwyer JH, 2007). Non è stata invece raggiunta la significatività nei livelli di LDL, nonostante sia descritta la differenza tra maschi e femmine (McNamara JR et al., 1987; Elbers JM et al., 2003). Tale differenza è, però, meno marcata rispetto a quella descritta per le HDL.

Le analisi relative alla funzionalità renale ha messo in evidenza, sempre in accordo con i dati della letteratura (Nagaya N et al., 1999; Elshorbagy AK et al., 2007), che le donne hanno valori più bassi di creatinina, acido urico ed urea, differenza che per la creatinina e l'acido urico rimane dopo correzione per il BMI (Tab. 6). Le differenze di genere nei livelli di creatinina sono almeno in parte attribuibili alla differente massa muscolare presente nei due generi con i maschi che hanno una massa muscolare maggiore rispetto a quella delle femmine. L'acido urico, prodotto di scarto del metabolismo, è eliminato per via renale ed è un importante fattore di rischio per malattie cardiovascolari e renali (Persky VW et al., 1979; Wannamethee SG, 2005; Strasak A et al., 2008). D'altra parte l'acido urico è anche uno scavenger dei ROS ed essendo il controllo dello stato redox dipendente dal genere (Malorni W et al., 2007) è possibile che si abbia un diverso consumo come anche che la sua sintesi sia influenzata dal genere, visti gli effetti degli estrogeni sulla xantina-ossidasi (Malorni W et al., 2007).

Considerando che, nella nostra popolazione, l'acido urico è significativamente più basso nelle donne ci chiediamo che livelli deve raggiungere in queste per essere considerato fattore di rischio per le malattie cardiovascolari.

Dalla valutazione dei parametri epatici e biliari (ALT, AST, GGT e bilirubina) è emerso che tutte le transaminasi esaminate risultano essere più basse nelle donne, anche dopo correzione per il BMI. Differenze significative si sono osservate anche nei livelli di bilirubina totale, che risulta minore nelle donne. Probabilmente ciò dipende dalle più piccole dimensioni del fegato nel sesso femminile (Alexander C et al., 2004).

Ilaria Campesi.

L'assunzione di associazioni estro-progestiniche seleziona due popolazioni femminili che differiscono in molti aspetti inclusi i processi di metilazione del DNA.

Tesi di dottorato in Farmacologia di Genere, Università degli studi di Sassari.

I livelli di sodio risultano essere più bassi nelle donne rispetto ai maschi. In letteratura è descritto che il metabolismo del sodio è genere-dipendente (Grikiniene J et al., 2004) ed è stato riportato, ad esempio, che il genere gioca probabilmente un ruolo importante nel rischio di sviluppo di iponatriemia associata con l'esercizio fisico, con le atlete che tendono a sviluppare iponatriemia durante le gare di resistenza rispetto agli atleti di sesso maschile (Rosner MH and Kirven J, 2007).

I parametri legati al metabolismo del ferro sono diversi nei due generi in accordo con quanto già noto (Rushton DH et al., 2001). In particolare nelle donne risultano più elevati i valori della capacità ferro legante (TIBC) che si associano ad una ridotta percentuale di saturazione, ad una minore concentrazione di ferritina e di emoglobina.

L'analisi dell'emocromo rivela, come ci si aspettava (Zeng SM et al., 2001), che le donne hanno meno globuli rossi degli uomini, risultando anche ridotto il valore di ematocrito. Inoltre sono state osservate differenze significative tra maschi e femmine nel numero di piastrine e nel tempo di protrombina, come già descritto in letteratura (Butkiewicz AM et al., 2006). La maggiore conta piastrinica nelle donne potrebbe essere correlata ad un meccanismo di compensazione associato alla perdita durante la mestruazione (Kemono H et al., 1978) e Jern et al. hanno osservato che la conta piastrinica è leggermente superiore nella fase follicolare (Jern C et al., 1991).

Riguardo il tempo di protrombina, una ipercoagulabilità è attribuibile agli ormoni sessuali femminili. Gli ormoni endogeni possono, infatti, avere un ruolo nelle differenze legate al sesso nell'incidenza eventi tromboembolici. L'incidenza della malattia tromboembolica nei giovani adulti è leggermente più frequente nelle donne rispetto agli uomini (Gorton HJ et al., 2000).

Visto che lo stato redox è un fenomeno genere-dipendente esso è stato valutato nelle due coorti. Per fare ciò si è valutato, come già indicato in precedenza, l'acido urico, bilirubina totale, ed altri noti scavengers dei ROS come GSH, cisteina, glutamincisteina, taurina senza dimenticare i prodotti della lipoperossidazione lipidica come la MDA (Fig. 10).

Ilaria Campesi.

L'assunzione di associazioni estro-progestiniche seleziona due popolazioni femminili che differiscono in molti aspetti inclusi i processi di metilazione del DNA.

Tesi di dottorato in Farmacologia di Genere, Università degli studi di Sassari.

Come già riportato in precedenza, i livelli di acido urico e bilirubina totale sono significativamente più elevati nei maschi, mentre gli altri antiossidanti non risultano variati significativamente. La presenza di alti livelli di antiossidanti, nei maschi, paradossalmente si accompagna ad un'alta perossidazione lipidica (espresso come concentrazione di MDA) (Fig. 10). La perossidazione lipidica è un meccanismo consolidato di lesioni cellulari in entrambe le piante e gli animali ed è utilizzato come indicatore dello stress ossidativo nelle cellule e nei tessuti (Tappel AL, 1973; Sevanian A and Hochstein P, 1985). I perossidi lipidici, derivati da acidi grassi polinsaturi, sono instabili e si decompongono per formare una serie complessa di composti, che includono composti carbonilici reattivi, come la MDA.

Il dato ottenuto nella popolazione in esame è riportato anche in letteratura (Knight JA et al., 1987), con le donne che presentano minori livelli di MDA.

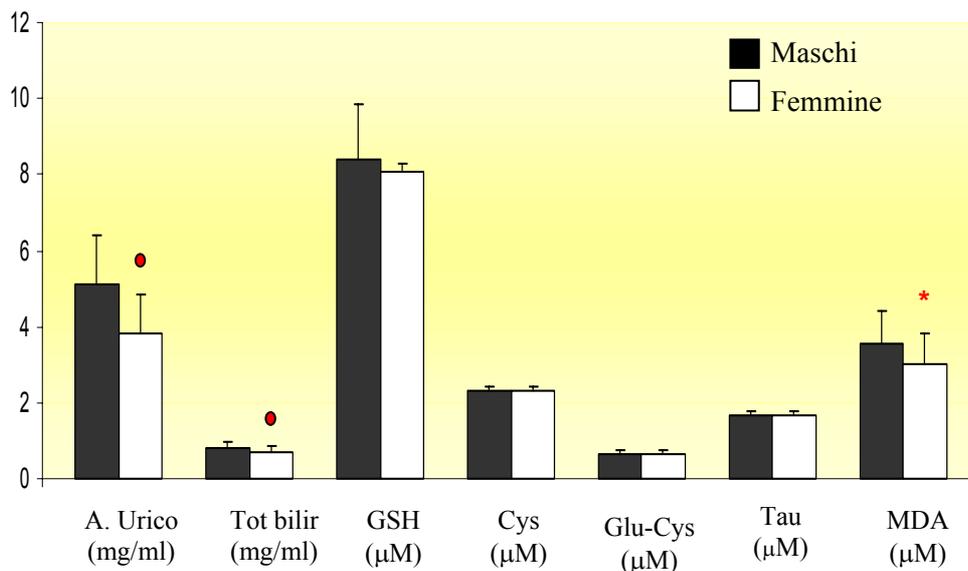


Figura 10. Valutazione dello stato redox nei maschi e nelle femmine. I dati sono espressi come media±SD * P< 0.05; ° P< 0.001.

Confrontando i maschi con le femmine prese nella loro totalità sono state osservate differenze significative in alcuni analiti che fanno parte del ciclo di

Ilaria Campesi.

L'assunzione di associazioni estro-progestiniche seleziona due popolazioni femminili che differiscono in molti aspetti inclusi i processi di metilazione del DNA.

Tesi di dottorato in Farmacologia di Genere, Università degli studi di Sassari.

metilazione (Tab. 7). Infatti le donne presentano livelli minori di SDMA rispetto ai maschi, mentre i livelli dell'ADMA non sono modificati.

Sempre nell'ambito del ciclo metionina è stata osservata una più alta concentrazione di cisteinilglicina (Cys-Gly), un catabolita del GSH, mentre la cisteina, l'omocisteina, il GSH sono non modificati. Apparentemente, se si considera che la Cys-Gly inibisce l'interazione tra l'Hcy e LDL (Zinellu A et al., 2006) potremmo avere un aumento delle LDL modificate. È noto che le LDL omocisteinilate possono essere un fattore di rischio per patologie cardiovascolari (Zinellu A et al., 2009); d'altra parte nella valutazione dello stato redox era stato osservato una maggiore perossidazione plasmatica (MDA) nell'uomo. Quindi a nostro avviso, il delicato bilancio fra LDL ossidate e LDL omocisteinilate potrebbe portare a differenze significative nelle due coorti; infatti nei maschi sembra prevalere l'ossidazione mentre nelle femmine la coniugazione con Hcy. Questo suggerisce che occorrono differenti strategie di prevenzione.

Parametri (μM)	Maschi (n=24)	Femmine (n=44)
Cys-Gly	27.84±6.23	23.44±5.87*
Omocisteina (Hcy)	9.41	9.40
Cisteina (Cys)	212.23±40.95	214.61±53.08
GSH	8.39±1.48	8.08±2.07
Glu-Cys	4.54	4.31
Arginina	77.59	74.26
ADMA	0.59±0.09	0.55±0.12
SDMA	0.47	0.40°
ADMA/Arg Ratio	0.008	0.008

Tabella 7. Differenze significative, tra maschi e femmine, in alcuni analiti che fanno parte del ciclo di metilazione.

I dati sono espressi come media±SD o come valore della mediana se la distribuzione non era gaussiana. * P< 0.05; ° P< 0.001

Ilaria Campesi.

L'assunzione di associazioni estro-progestiniche seleziona due popolazioni femminili che differiscono in molti aspetti inclusi i processi di metilazione del DNA.

Tesi di dottorato in Farmacologia di Genere, Università degli studi di Sassari.

L'arginina è stata misurata sia come componente del ciclo metilazione e sia come componente del ciclo citrullina ed essa risulta non variata tra i due generi. Infine, vista l'importanza dell'epigenetica, siamo andati a misurare una modificazione del DNA ed esattamente la sua metilazione. Non sono state riscontrate differenze significative tra maschi e femmine nei livelli di metilcitosina. (Fig. 11)

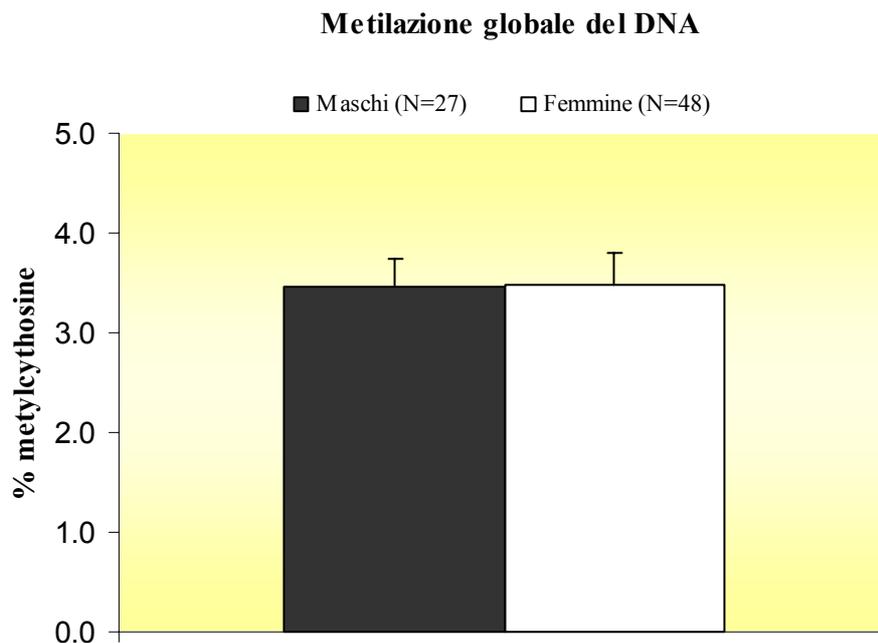


Figura 11. Metilazione globale del DNA nella popolazione femminile e la popolazione maschile.

I dati sono espressi come $media \pm SD$.

Ilaria Campesi.

L'assunzione di associazioni estro-progestiniche seleziona due popolazioni femminili che differiscono in molti aspetti inclusi i processi di metilazione del DNA.

Tesi di dottorato in Farmacologia di Genere, Università degli studi di Sassari.

2. Stratificazione della popolazione femminile in base all'assunzione di CO

Si è poi proceduto a stratificare e ad esaminare le donne in base all'assunzione di CO: le due coorti non differiscono per età e BMI.

Stratificando la popolazione femminile sono emerse le differenze riportate in tabella 8.

Parametri	Femmine (n=34)	Femmine+CO (n=26)
HDL-Chol (mg/dl)	62.7±12.3	70.4±14.6*
Trigliceridi (mg/dl)	67.00	100.00°
Cortisolo (ng/ml)	200.32	334.20°
Tempo di protrombina (sec)	10.70	10.30*
Potassemia (mEq/L)	4.1±0.3	4.3±0.3*
Bilirubina totale (mg/dl)	0.50	0.40*
TIBC (mg/dl)	330.6±60.4	411.7±53.3°
Testosterone (ng/dl)	50.60	33.34°
LH (mUI/ml)	6.54	0.18°
FSH (mUI/ml)	6.90	4.60*

Tabella 8. Differenze tra le donne non trattate e le donne che assumono CO.

I dati sono espressi come media±SD o come valore della mediana se la distribuzione non era gaussiana. * P< 0.05; ° P< 0.001

In seguito a trattamento con CO si evidenzia, come già descritto, un aumento dei TG e delle HDL. Le variazioni lipidiche non meravigliano visto l'effetto degli estrogeni sul metabolismo lipidico (Kekki M and Nikkila EA, 1971; Hoppe G, 1990). I CO possono indurre cambiamenti nel metabolismo dei lipidi e carboidrati, simili a quelli associati ad un aumentato rischio di malattie coronariche, tra cui incremento dei livelli di TG, LDL e diminuzione delle HDL (Godsland IF et al., 1990).

Ilaria Campesi.

L'assunzione di associazioni estro-progestiniche seleziona due popolazioni femminili che differiscono in molti aspetti inclusi i processi di metilazione del DNA.

Tesi di dottorato in Farmacologia di Genere, Università degli studi di Sassari.

Le donne che assumono la pillola contraccettiva presentano livelli di cortisolo significativamente maggiori rispetto alle donne non trattate. Tale dato è in linea con la letteratura (Giraldo E et al., 2008; Winkler UH and Sudik R, 2009).

L'aumento del cortisolo nelle donne che usano i CO è preoccupante perché esso, col tempo, si associa ad una serie di variazioni metaboliche quali iperglicemia, ipernatremia, variazioni del quadro lipidico (Koertge J et al., 2002; Weng YM et al., 2008), che in parte (aumento dei TG) sono già presenti e che potrebbero determinare conseguenze non benefiche per la donna (Tab. 8).

I CO determinano una diminuzione significativa del tempo di protrombina. Anche questo dato trova riscontro in letteratura, in quanto è ampiamente descritto il potenziale rischio trombo-embolico della pillola per gli effetti sulla coagulazione (Rotteveel RC et al., 1993). A questo proposito ci chiediamo se l'aumento del cortisolo, l'aumento dei TG, e la diminuzione del tempo di protrombina non partecipino ad aumentare il rischio cardiovascolare associato con la terapia ormonale sostitutiva (Mosca L et al., 2001; Tanis BC et al., 2001).

Inoltre l'aumento del cortisolo nelle donne che assumono CO è in linea con i livelli significativamente minori di testosterone rispetto alle donne non trattate. Infatti, è descritto che livelli alti di cortisolo hanno un effetto altamente negativo sulle concentrazioni di testosterone circolante (Brownlee K et al., 2005). La diminuzione dei livelli di testosterone è in accordo con i dati della letteratura, secondo cui più bassi livelli di testosterone sono stati legati all'uso dei CO nelle donne in pre-menopausa (Carr BR et al., 1995; Jernstrom HC et al., 1997).

L'uso dei CO innalza la potassemia. Questo dato non trova riscontro con i dati della letteratura, in quanto non sono descritte differenze nei livelli di potassio plasmatico in seguito ad assunzione di CO. Inoltre, considerando l'aumento dei livelli di cortisolo in questo gruppo sperimentale, ci si sarebbe aspettato una diminuzione della potassemia, in quanto è noto che il cortisolo fa aumentare l'escrezione renale di potassio.

Infine, è emerso che i CO determinano una diminuzione significativa nei livelli plasmatici di bilirubina totale e taurina, indicando pertanto un minore livello di difese antiossidanti (Fig. 12).

Ilaria Campesi.

L'assunzione di associazioni estro-progestiniche seleziona due popolazioni femminili che differiscono in molti aspetti inclusi i processi di metilazione del DNA.

Tesi di dottorato in Farmacologia di Genere, Università degli studi di Sassari.

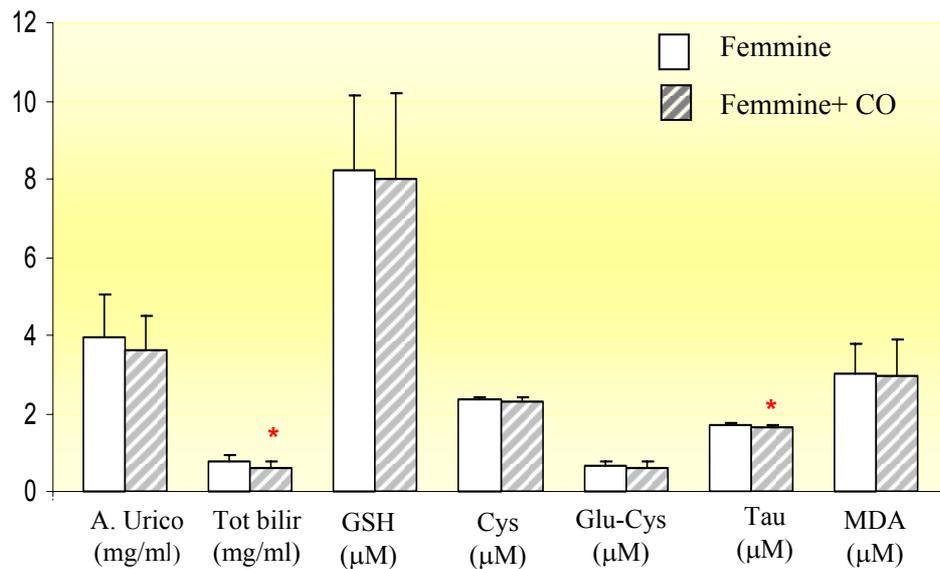


Figura 12. Valutazione dello stato redox nelle due popolazioni femminili. I dati sono espressi come media±SD * P< 0.05; ° P< 0.001.

Confrontando le due popolazioni femminili sono state osservate differenze significative in alcuni analiti che fanno parte del ciclo di metilazione (Tab. 9).

Parametri (µM)	Femmine (n=25)	Femmine+CO (n=20)
Cys-Gly	23.31±5.51	24.36±7.15
Omocisteina	10.73±3.66	9.33±3.73
Cisteina	226.35±43.66	200.41±59.84
GSH	8.21±1.94	7.98±2.23
Glu-Cys	4.48	4.23
Arginina	82.22±14.82	53.13±12.71°
ADMA	0.59±0.09	0.49±0.13*
SDMA	0.40	0.39

Tabella 9. Differenze significative, tra femmine non trattate e femmine trattate con CO, in alcuni analiti che fanno parte del ciclo di metilazione.

I dati sono espressi come media±dev std o come valore della mediana se la distribuzione non era gaussiana. * P< 0.05; ° P< 0.001.

Ilaria Campesi.

L'assunzione di associazioni estro-progestiniche seleziona due popolazioni femminili che differiscono in molti aspetti inclusi i processi di metilazione del DNA.

Tesi di dottorato in Farmacologia di Genere, Università degli studi di Sassari.

Il confronto delle due popolazioni femminili evidenzia differenze significative a livello dell'arginina, il precursore del nitrossido. Questo fatto appare di particolare rilievo perché potrebbe portare ad una diminuzione di questo fattore vaso protettivo (Ratnakumari L et al., 1996; Wu G and Morris SM, Jr., 1998) e ad un'alterazione del pathway arginina-NO che contribuisce a mantenere più funzioni fisiologiche, tra cui tono vascolare, la funzione piastrinica e la neurotrasmissione e ciò potrebbe essere alla base dell'aumento delle malattie cardiovascolari suggerito da alcuni studi clinici con terapia ormonale sostitutiva (Best PJ et al., 1998; Stramba-Badiale M, 2009).

È stato riportato che i CO alterano i livelli plasmatici di alcuni aminoacidi. Le concentrazioni plasmatiche di glutammato, glicina, tirosina, isoleucina, arginina e prolina sono stati trovati ad essere subnormali nei soggetti che assumono la pillola (Craft IL and Peters TJ, 1971). La carenza di arginina è legata ad una varietà di processi infiammatori ed ossidativi a carico dell'endotelio vascolare, e può essere cruciale nello sviluppo di aterosclerosi (Tousoulis D et al., 2007). Con livelli limitati di arginina, la NOS forma superossido (O_2^-), che provoca lesioni endoteliali vascolari e ulteriore infiammazione. Gli effetti deleteri della scarsa disponibilità di arginina possono condurre ad un ambiente pro-aterosclerotico ed a successiva malattia cardiovascolare.

Inoltre, in condizioni associate a danno ossidativo vascolare, come l'obesità o l'ipertensione, l'eccesso di formazione di ROS, può portare ad un accumulo di ADMA (Eid HM et al., 2004; Boger RH, 2006).

Questo non si verifica nel campione in esame in quanto le donne che assumono la pillola presentano livelli plasmatici di ADMA significativamente inferiori rispetto alle donne non trattate.

Particolarmente rilevante appare la differenza significativa riscontrata nei livelli percentuali di metilcitosina (Fig 13). È stato, infatti, osservato un minore grado di metilazione del DNA nei soggetti trattati con CO.

Una possibile spiegazione potrebbe essere data dal fatto che, normalmente, i CO tendono a far diminuire l'assorbimento dei folati, fonte di SAM, necessaria

Ilaria Campesi.

L'assunzione di associazioni estro-progestiniche seleziona due popolazioni femminili che differiscono in molti aspetti inclusi i processi di metilazione del DNA.

Tesi di dottorato in Farmacologia di Genere, Università degli studi di Sassari.

per la metilazione della citosina. Attualmente non è stato possibile analizzare i livelli di folati nella popolazione in esame per verificare tale associazione.

D'altra parte, se ci fosse una deplezione di folati nelle donne trattate con CO si dovrebbe osservare un contemporaneo aumento dei livelli di Hcy rispetto alle donne non trattate (vedi Fig. 4), mentre nelle femmine con terapia anticoncezionale si osserva una diminuzione, non significativa, dei livelli di Hcy.

Pertanto tale dato andrà opportunamente meglio approfondito ed indagato.

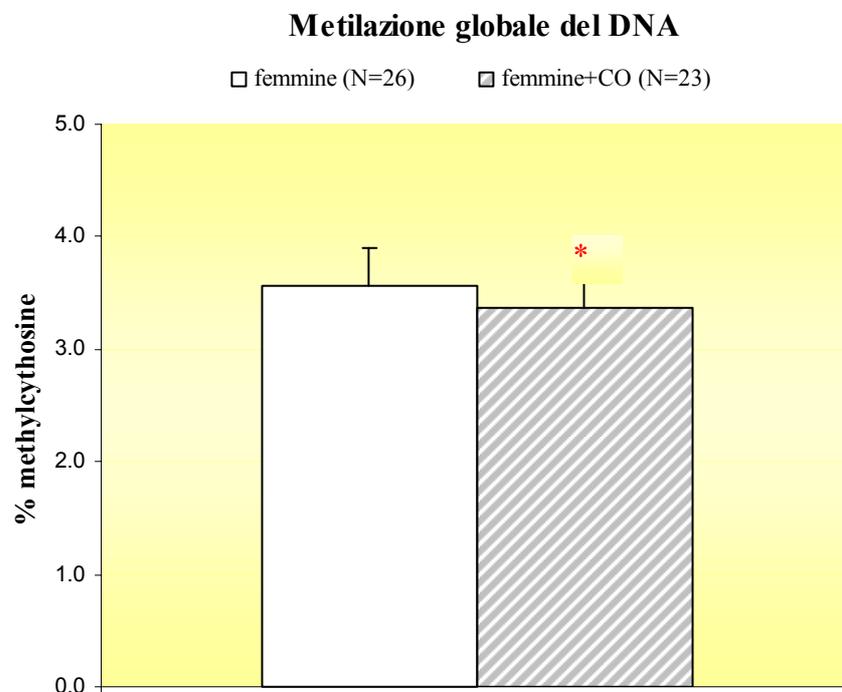


Figura 13. Metilazione globale del DNA nelle due popolazioni femminili.

I dati sono espressi come media±SD * P< 0.05.

Queste considerazioni ci hanno portato ad indagare il ruolo della componente progestinica dei CO sulla metilazione del DNA e sugli altri parametri influenzati dall'assunzione di estro-progestinici. È stata, pertanto, fatta un'ulteriore stratificazione della sottopopolazione trattata con CO in funzione

Ilaria Campesi.

L'assunzione di associazioni estro-progestiniche seleziona due popolazioni femminili che differiscono in molti aspetti inclusi i processi di metilazione del DNA.

Tesi di dottorato in Farmacologia di Genere, Università degli studi di Sassari.

della capacità androgenica/antiandrogena della pillola (vedi tabella 4 in sezione “Materiali e metodi”).

In effetti, si osserva una dipendenza dal tipo di progestinico nel grado di metilazione del DNA, con i CO a base di progestinici ad attività antiandrogena che determinano una ipometilazione significativamente minore rispetto agli altri due gruppi sperimentali (Fig. 14).

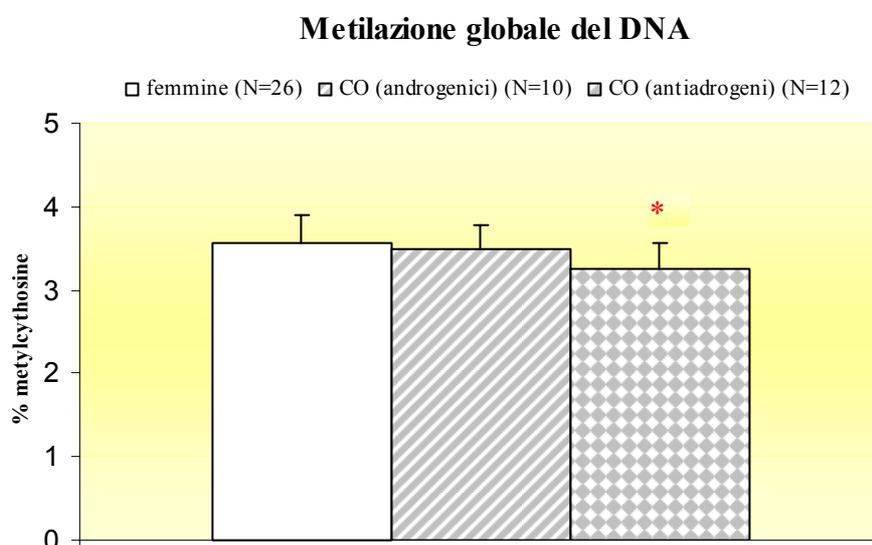


Figura 14. Effetto dell'attività del progestinico sulla metilazione globale del DNA.

I dati sono espressi come media±SD. * P<0.05 vs femmine

Il tipo di progestinico influenza i valori di HDL, potassemia, tempo di protrombina ed ADMA cambiano in funzione della composizione dei CO (Tab. 10). In particolare, la presenza di progestinici ad attività antiandrogena e antimineralcorticoide aumenta significativamente i livelli di HDL e la potassemia sia rispetto alle donne non trattate che a quelle che assumono una pillola contenente progestinici ad azione androgenica, mentre diminuisce il tempo di protrombina e i livelli di ADMA in maniera significativa rispetto alle

Ilaria Campesi.

L'assunzione di associazioni estro-progestiniche seleziona due popolazioni femminili che differiscono in molti aspetti inclusi i processi di metilazione del DNA.

Tesi di dottorato in Farmacologia di Genere, Università degli studi di Sassari.

donne che non assumono CO. Le differenze riscontrate nei livelli di TG, bilirubina totale, TIBC, testosterone, cortisolo, taurina, arginina non sembrano, invece, dipendere dal tipo di progestinico presente nella pillola.

L'effetto dei diversi progestinici sui livelli di ADMA (Fig. 15) è riportato in letteratura: è, infatti, descritto che la diminuzione dell'ADMA non è modificata se la pillola contiene un progestinico antiandrogeno (Post MS et al., 2003; Verhoeven MO et al., 2006), mentre la presenza di un progestinico ad attività androgenica non modifica l'attività inibitoria dell'estradiolo sulla concentrazione dell'ADMA (Charitidou C et al., 2008).

Tali dati evidenziano l'importanza del tipo del progesterone presente nei CO e suggeriscono, pertanto, un'adeguata scelta del tipo di pillola da assumere.

Parametri	Femmine (n=34)	Femmine+progest androgenici (n=14)	Femmine+progest antiandrogeni (n=13)
HDL-Chol (mg/dl)	62.7±12.3*	62.6±11.8°	78.8±12.9
Trigliceridi (mg/dl)	1.84±0.19	1.98±0.12	2.06±0.15
Bilirubina tot (mg/dl)	0.50	0.39	0.41
Potasseemia (mEq/L)	4.13±0.29*	4.19±0.32°	4.49±0.27
TIBC (mg/dl)	330.6±60.4	403.0±51.6	420.5±55.9
Tempo di protrombina (sec)	10.70*	10.40	10.10
Testosterone (ng/dl)	50.6±16.6	30.7±7.6	35.9±18.4
LH (mUI/ml)	200.32	306.42	362.1
Taurina (µM)	50.12±9.90	40.35±11.96	45.73±7.72
Arginina (µM)	79.72	51.91	51.75
ADMA (µM)	0.54±0.12*	0.52±0.13	0.45±0.14

Tabella 10. Parametri che risentono dell'influenza del progestinico.

I dati sono espressi come media±SD o come valore della mediana se la distribuzione non era gaussiana. * P< 0.05 Femmine vs antiandr, ° P<0.05 androg vs antiandr.

Ilaria Campesi.

L'assunzione di associazioni estro-progestiniche seleziona due popolazioni femminili che differiscono in molti aspetti inclusi i processi di metilazione del DNA.

Tesi di dottorato in Farmacologia di Genere, Università degli studi di Sassari.

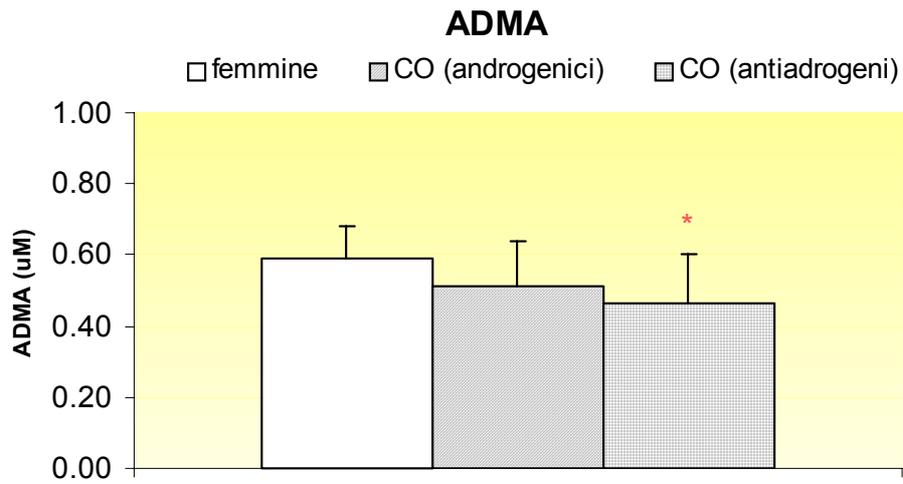


Figura 15. Effetto dei diversi progestinici sui livelli di ADMA.

I dati sono espressi come media±SD. * P<0.05 vs femmine.

Ilaria Campesi.

L'assunzione di associazioni estro-progestiniche seleziona due popolazioni femminili che differiscono in molti aspetti inclusi i processi di metilazione del DNA.

Tesi di dottorato in Farmacologia di Genere, Università degli studi di Sassari.

3. Macrofagi derivati dai monociti

Contemporaneamente è stata analizzata la risposta infiammatoria dei macrofagi. Una parte del sangue, raccolta dai donatori sani, è stata, infatti, utilizzata per ottenere macrofagi derivati dai monociti come descritto in Brunelleschi et al (Brunelleschi S et al., 2001).

La trasformazione dei monociti in macrofagi è stata evidenziata anche biochimicamente, mediante lo studio dell'uptake delle Ac-LDL che avviene solo nei macrofagi differenziati e la scomparsa del recettore CD14 che diminuisce via via che procede la trasformazione (vedi "materiali e metodi"). I dati ottenuti evidenziano che siamo di fronte ad una popolazione macrofagica in accordo a quanto precedentemente descritto (Brunelleschi S et al., 2007). Da notare che i tempi di differenziamento non differiscono nella popolazione in esame (Fig. 16), per cui è stato possibile adottare, per tutti i gruppi, lo stesso tipo di preparazione e le stesse condizioni sperimentali.

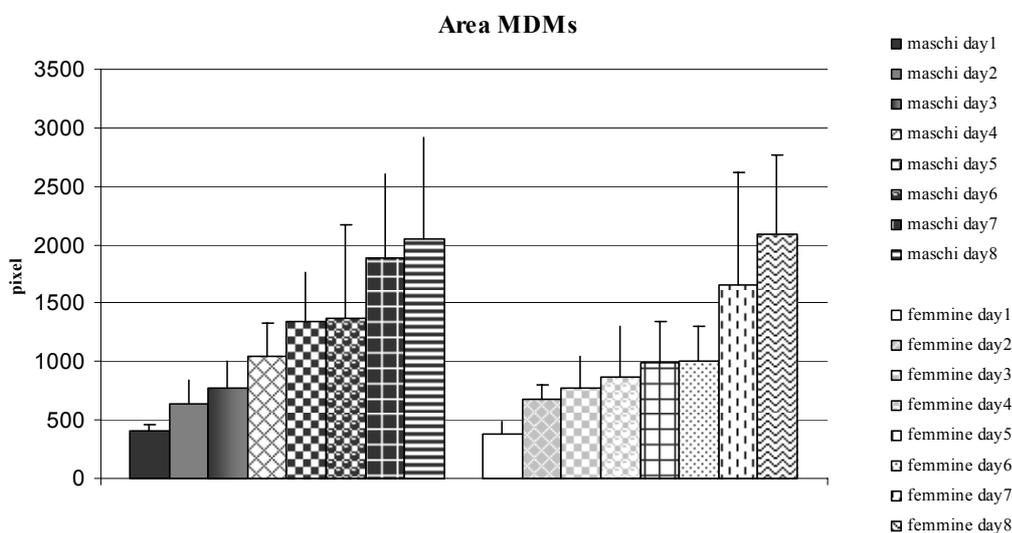


Figura 16. Analisi delle dimensioni cellulari nei diversi giorni di coltura nei monociti di maschi e femmine.

I dati sono espressi come media±SD. * P<0.05 vs femmine

Ilaria Campesi.

L'assunzione di associazioni estro-progestiniche seleziona due popolazioni femminili che differiscono in molti aspetti inclusi i processi di metilazione del DNA.

Tesi di dottorato in Farmacologia di Genere, Università degli studi di Sassari.

Tale dato è stato inoltre confermato dall'analisi delle rette di regressione (Fig.17).

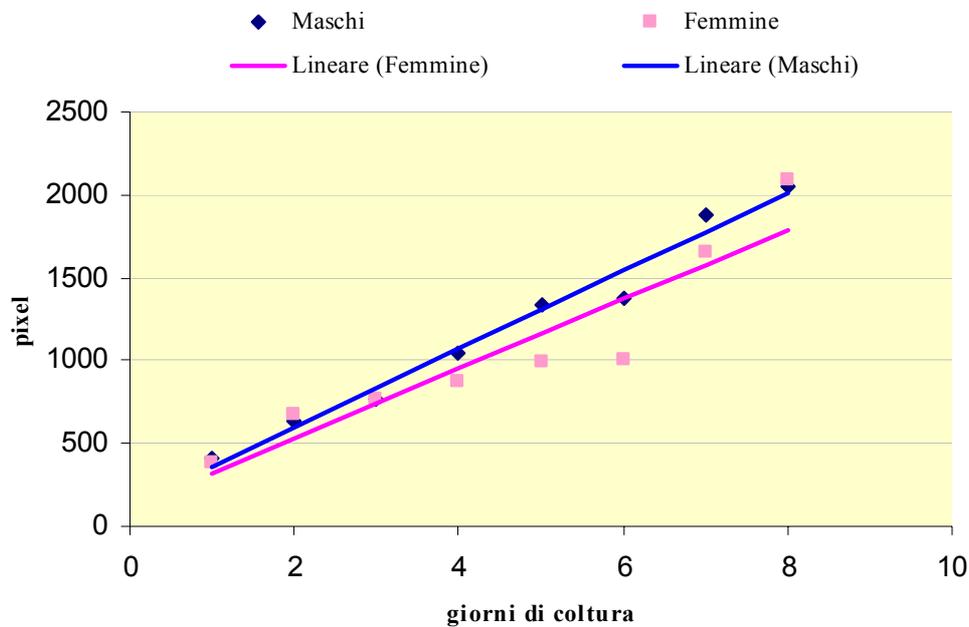


Figura 17. Rette di regressione per l'analisi del differenziamento in funzione del tempo dei monociti ottenuti dai maschi e dalle femmine.

Le rette ottenute sono state confrontate attraverso il test globale di coincidenza, vale a dire confrontando tra loro sia i coefficienti angolari che le intercette, e da tale analisi non è emersa nessuna differenza nello stato di differenziamento.

Lo stesso risultato è emerso anche analizzando il differenziamento delle cellule ottenute dalle due popolazioni femminili separatamente (Fig. 18 e Fig. 19)

Ilaria Campesi.

L'assunzione di associazioni estro-progestiniche seleziona due popolazioni femminili che differiscono in molti aspetti inclusi i processi di metilazione del DNA.

Tesi di dottorato in Farmacologia di Genere, Università degli studi di Sassari.

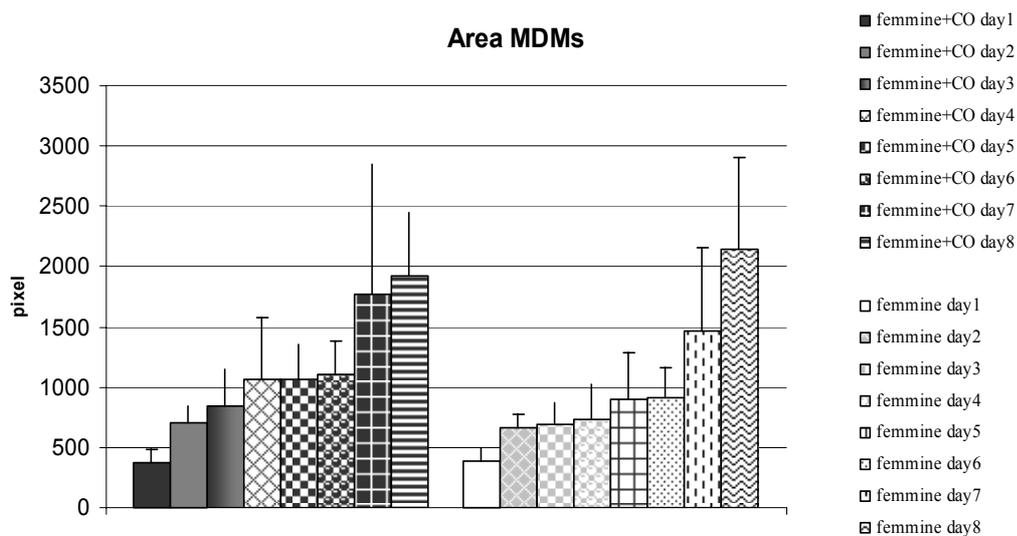


Figura 18. Analisi delle dimensioni cellulari nei diversi giorni di coltura nei monociti isolati dalle due popolazioni femminili.

I dati sono espressi come media±SD. * P<0.05 vs femmine

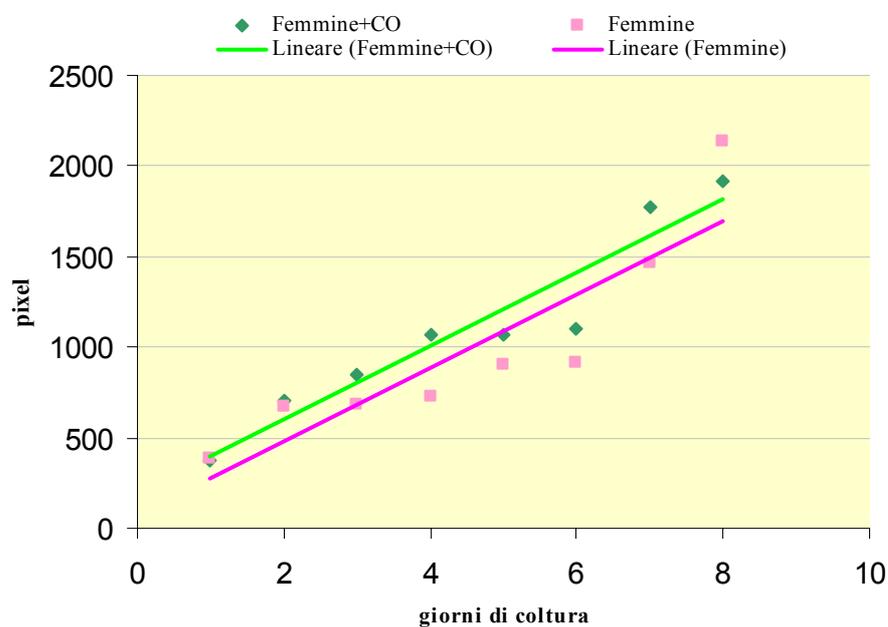


Figura 19. Rette di regressione per l'analisi del differenziamento in funzione del tempo dei monociti ottenuti dalle femmine trattate e dalle femmine non trattate con CO.

Ilaria Campesi.

L'assunzione di associazioni estro-progestiniche seleziona due popolazioni femminili che differiscono in molti aspetti inclusi i processi di metilazione del DNA.

Tesi di dottorato in Farmacologia di Genere, Università degli studi di Sassari.

I macrofagi così ottenuti sono stati studiati sia in condizioni basali che dopo stimolazione con lipopolisaccaride (LPS); in particolare sono stati misurati la liberazione di TNF- α e la produzione di perossido d'idrogeno (H₂O₂).

Non sono state osservate differenze significative nel rilascio di TNF- α (Fig. 20) e nella produzione di H₂O₂ (Fig. 21) sia in condizioni basali che in seguito a stimolazione con LPS, quando sono stati confrontati i maschi con le femmine totali.

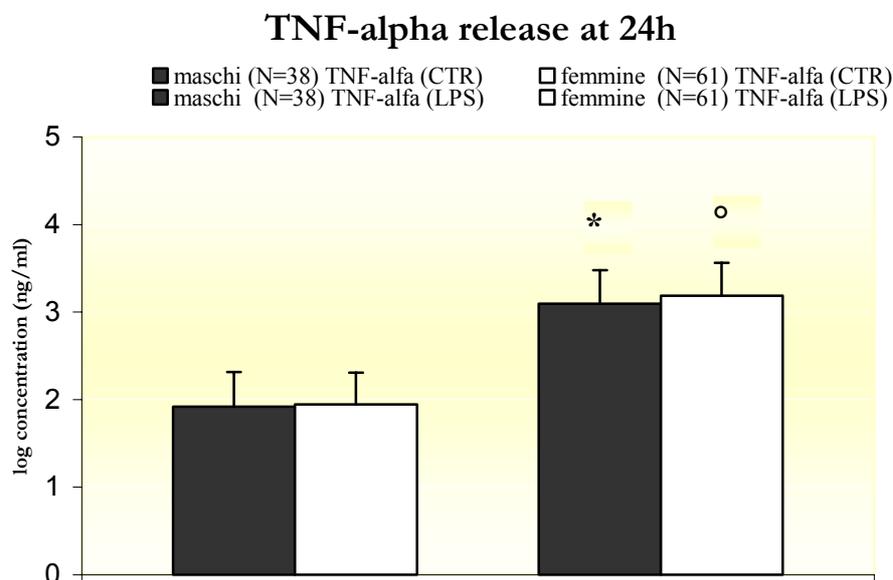


Fig. 20. Liberazione di TNF- α in condizioni basali ed in seguito a stimolazione con LPS. I dati sono espressi come media \pm SD. *, ° indicano un P<0,05 degli stimolati verso il rispettivo gruppo di controllo.

Ilaria Campesi.

L'assunzione di associazioni estro-progestiniche seleziona due popolazioni femminili che differiscono in molti aspetti inclusi i processi di metilazione del DNA.

Tesi di dottorato in Farmacologia di Genere, Università degli studi di Sassari.

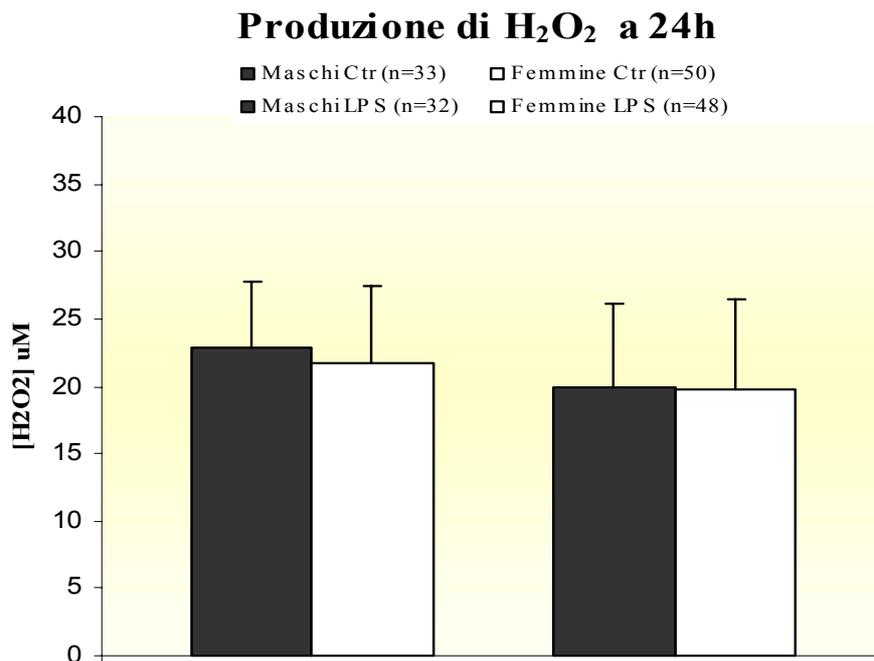


Fig. 21. Produzione di H₂O₂ in condizioni basali ed in seguito a stimolazione con LPS. I dati sono espressi come media±SD.

Stratificando la popolazione femminile sulla base dell'assunzione dei CO non sono state osservate differenze significative nel rilascio di TNF- α in condizioni basali (Fig. 22), mentre in seguito a stimolazione con LPS è stata riscontrata una differenza significativa nel rilascio di questa citochina. Infatti, calcolando l'incremento percentuale dello stimolato rispetto al basale si osserva che i macrofagi ottenuti dalle donne trattate con CO mostrano un minore incremento rispetto al controllo (Fig. 23). Questo dato appare particolarmente significativo per le sue possibili conseguenze poiché proietta la possibilità che la risposta infiammatoria possa essere variata dai CO e indica che la funzionalità di base per quanto riguarda la risposta infiammatoria sembra dipendere dall'assunzione della pillola.

Ilaria Campesi.

L'assunzione di associazioni estro-progestiniche seleziona due popolazioni femminili che differiscono in molti aspetti inclusi i processi di metilazione del DNA.

Tesi di dottorato in Farmacologia di Genere, Università degli studi di Sassari.

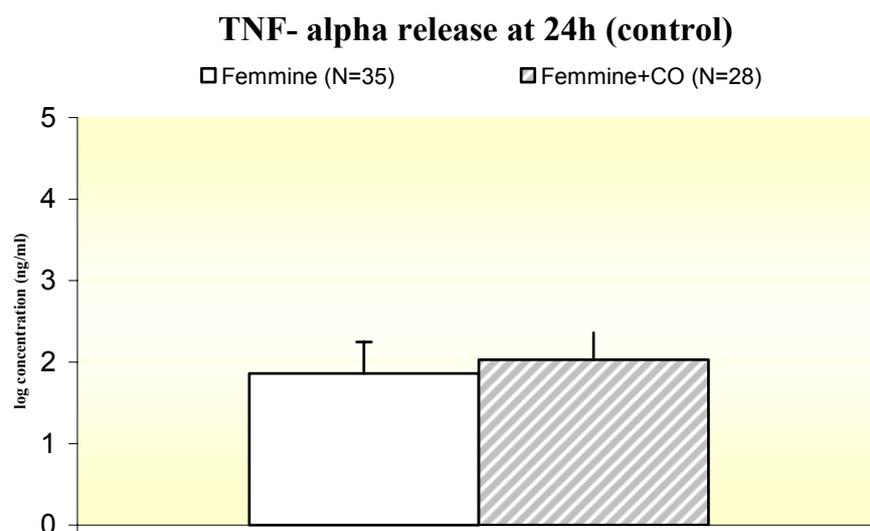


Fig. 22. Liberazione di TNF- α in condizioni basali. I dati sono espressi come media \pm SD

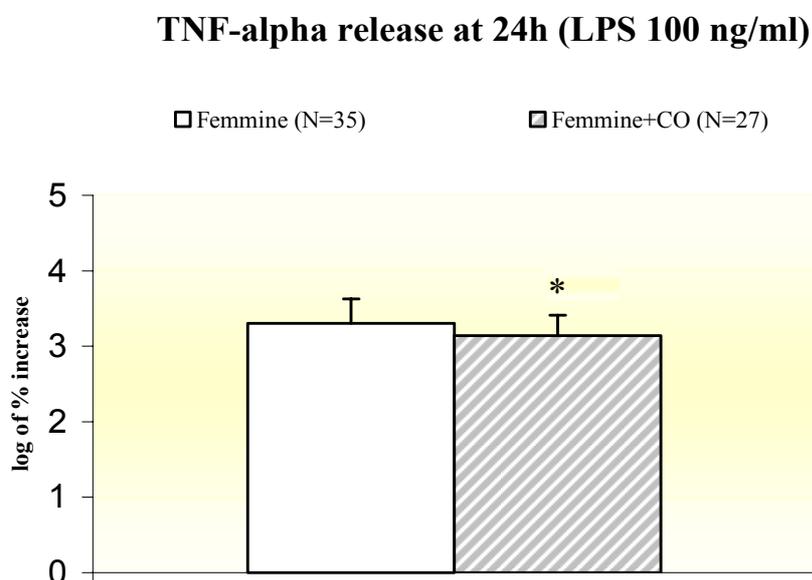


Fig. 23. Liberazione di TNF- α in seguito a stimolazione con LPS. I dati sono espressi come media \pm SD. * indica un P<0.05.

Ilaria Campesi.

L'assunzione di associazioni estro-progestiniche seleziona due popolazioni femminili che differiscono in molti aspetti inclusi i processi di metilazione del DNA.

Tesi di dottorato in Farmacologia di Genere, Università degli studi di Sassari.

Questi piccole variazioni nella liberazione di citochine, in corso di trattamento con CO fa riflettere in quanto ciò può significare una maggiore flogosi e questo può rappresentare un fattore di rischio per molte malattie, ivi inclusa l'aterosclerosi. Ciò avviene proprio in quella popolazione che già in seguito al trattamento presentava più alti livelli di TG e cortisolo.

Il tipo di progestinico non influenza i livelli di TNF- α in seguito a stimolazione con LPS (dato non mostrato).

Ilaria Campesi.

L'assunzione di associazioni estro-progestiniche seleziona due popolazioni femminili che differiscono in molti aspetti inclusi i processi di metilazione del DNA.

Tesi di dottorato in Farmacologia di Genere, Università degli studi di Sassari.

CONCLUSIONI

Una limitazione del presente studio potrebbe essere quella relativa alla numerosità campionaria. Infatti, non è stata riscontrata una differenza nota come quella a carico delle LDL. D'altra parte, essendo questa differenza meno marcata rispetto a quella descritta per le HDL, il campione in esame non è del tutto sottostimato.

Ovviamente la stratificazione sia della popolazione femminile in base all'assunzione dei CO, sia quella relativa al tipo di progestinico presente nelle varie pillole complica ulteriormente il problema relativo alla numerosità. Nonostante questi limiti il presente lavoro risulta comunque suggestivo, in quanto indica che le donne trattate con CO e non devono essere considerate due popolazioni diverse. Differenze sono state, infatti, viste sia sui test clinici di laboratorio che sui macrofagi. In particolare la minore metilazione del DNA nelle donne trattate con CO può comportare la loro maggiore suscettibilità ad alcune malattie come il cancro e malattie cardiovascolari, anche se il dato è da indagare più approfonditamente.

Inoltre lo studio evidenzia, su un discreto numero di soggetti, che differenze importanti possono essere determinate dall'attività del progestinico contenuto nella formulazione dell'antifecondativo orale.

Tutto ciò pone in risalto come, negli studi clinici d'intervento, randomizzati e controllati, sia necessario considerare diverse popolazioni femminili, anche in età giovanile e in funzione dei CO, anche in considerazione del fatto che 1/3 delle donne li assume.

Questo richiede un appropriato disegno sperimentale, pur sapendo di complicare in questo modo le tappe della sperimentazione, ma nella consapevolezza di rispettare la complessità della dimensione genere in accordo alle raccomandazioni dell'OMS e dell'European Commission (Gender mainstreaming: conceptual framework methodology and presentation of good practice) (WHO CoSDoH, 2007; WHO CoSDoH, 2008).

Ilaria Campesi.

L'assunzione di associazioni estro-progestiniche seleziona due popolazioni femminili che differiscono in molti aspetti inclusi i processi di metilazione del DNA.

Tesi di dottorato in Farmacologia di Genere, Università degli studi di Sassari.

BIBLIOGRAFIA

1. Adams, M. R., T. B. Clarkson, et al. (1990). "Oral contraceptives, lipoproteins, and atherosclerosis." Am J Obstet Gynecol 163(4 Pt 2): 1388-93.
2. Alexander, C., M. André, et al. (2004). "Estimation of liver size for liver transplantation: The impact of age and gender." Liver Transplantation 10(5): 678-685.
3. Asensi, M., A. Garcia-Espana, et al. (1996). "Effect of nonprotein thiols on protein synthesis in isolated rat hepatocytes." Experientia 52(2): 111-4.
4. Back, D. J. and M. L. Orme (1990). "Pharmacokinetic drug interactions with oral contraceptives." Clin Pharmacokinet 18(6): 472-84.
5. Balkan, J., F. H. Parldar, et al. (2005). "The effect of taurine or betaine pretreatment on hepatotoxicity and prooxidant status induced by lipopolysaccharide treatment in the liver of rats." Eur J Gastroenterol Hepatol 17(9): 917-21.
6. Best, P. J., P. B. Berger, et al. (1998). "The effect of estrogen replacement therapy on plasma nitric oxide and endothelin-1 levels in postmenopausal women." Ann Intern Med 128(4): 285-8.
7. Boger, R. H. (2006). "Asymmetric dimethylarginine (ADMA): a novel risk marker in cardiovascular medicine and beyond." Ann Med 38(2): 126-36.
8. Boger, R. H., S. M. Bode-Boger, et al. (2000). "Plasma concentration of asymmetric dimethylarginine, an endogenous inhibitor of nitric oxide synthase, is elevated in monkeys with hyperhomocyst(e)inemia or hypercholesterolemia." Arterioscler Thromb Vasc Biol 20(6): 1557-64.
9. Boger, R. H., S. M. Bode-Boger, et al. (2000). "An endogenous inhibitor of nitric oxide synthase regulates endothelial adhesiveness for monocytes." J Am Coll Cardiol 36(7): 2287-95.
10. Boger, R. H., S. R. Lentz, et al. (2001). "Elevation of asymmetrical dimethylarginine may mediate endothelial dysfunction during

Ilaria Campesi.

L'assunzione di associazioni estro-progestiniche seleziona due popolazioni femminili che differiscono in molti aspetti inclusi i processi di metilazione del DNA.

Tesi di dottorato in Farmacologia di Genere, Università degli studi di Sassari.

- experimental hyperhomocyst(e)inaemia in humans." Clin Sci (Lond) 100(2): 161-7.
11. Brownlee, K., A. Moore, et al. (2005). "Relationship between circulating cortisol and testosterone: influence of physical exercise." Journal of Sports Science and Medicine 4: 76-85.
 12. Brunelleschi, S., C. Bardelli, et al. (2007). "Minor polar compounds extra-virgin olive oil extract (MPC-OOE) inhibits NF-kappa B translocation in human monocyte/macrophages." Pharmacol Res 56(6): 542-9.
 13. Brunelleschi, S., L. Penengo, et al. (2001). "Macrophage stimulating protein (MSP) evokes superoxide anion production by human macrophages of different origin." Br J Pharmacol 134(6): 1285-95.
 14. Buiting, K., B. Dittrich, et al. (1994). "Detection of aberrant DNA methylation in unique Prader-Willi syndrome patients and its diagnostic implications." Hum Mol Genet 3(6): 893-5.
 15. Butkiewicz, A. M., H. Kemono, et al. (2006). "Platelet count, mean platelet volume and thrombocytopoietic indices in healthy women and men." Thromb Res 118(2): 199-204.
 16. Carr, B. R., N. A. Breslau, et al. (1995). "Oral contraceptive pills, gonadotropin-releasing hormone agonists, or use in combination for treatment of hirsutism: a clinical research center study." J Clin Endocrinol Metab 80(4): 1169-78.
 17. Cayatte, A. J., J. J. Palacino, et al. (1994). "Chronic inhibition of nitric oxide production accelerates neointima formation and impairs endothelial function in hypercholesterolemic rabbits." Arterioscler Thromb 14(5): 753-9.
 18. Charitidou, C., D. Farmakiotis, et al. (2008). "The administration of estrogens, combined with anti-androgens, has beneficial effects on the hormonal features and asymmetric dimethyl-arginine levels, in women with the polycystic ovary syndrome." Atherosclerosis 196(2): 958-65.
 19. Chen, M. L., S. C. Lee, et al. (2000). "Pharmacokinetic analysis of bioequivalence trials: implications for sex-related issues in clinical

Ilaria Campesi.

L'assunzione di associazioni estro-progestiniche seleziona due popolazioni femminili che differiscono in molti aspetti inclusi i processi di metilazione del DNA.

Tesi di dottorato in Farmacologia di Genere, Università degli studi di Sassari.

- pharmacology and biopharmaceutics." Clin Pharmacol Ther 68(5): 510-21.
20. Craft, I. L. and T. J. Peters (1971). "Quantitative changes in plasma amino acids induced by oral contraceptives." Clin Sci 41(4): 301-7.
 21. Davis, C. E., D. H. Williams, et al. (1996). "Sex difference in high density lipoprotein cholesterol in six countries." Am J Epidemiol 143(11): 1100-6.
 22. de Capoa, A., A. Musolino, et al. (2003). "DNA demethylation is directly related to tumour progression: evidence in normal, pre-malignant and malignant cells from uterine cervix samples." Oncol Rep 10(3): 545-9.
 23. Di Girolamo, N., K. Visvanathan, et al. (1997). "Expression of TNF-alpha by human plasma cells in chronic inflammation." J Leukoc Biol 61(6): 667-78.
 24. Dong, C., W. Yoon, et al. (2002). "DNA methylation and atherosclerosis." J Nutr 132(8 Suppl): 2406S-2409S.
 25. Dudman, N. P., C. Hicks, et al. (1991). "Human arterial endothelial cell detachment in vitro: its promotion by homocysteine and cysteine." Atherosclerosis 91(1-2): 77-83.
 26. Eid, H. M., H. Arnesen, et al. (2004). "Relationship between obesity, smoking, and the endogenous nitric oxide synthase inhibitor, asymmetric dimethylarginine." Metabolism 53(12): 1574-9.
 27. El-Khairi, L., P. M. Ueland, et al. (2001). "Plasma total cysteine as a risk factor for vascular disease: The European Concerted Action Project." Circulation 103(21): 2544-9.
 28. Elbers, J. M., E. J. Giltay, et al. (2003). "Effects of sex steroids on components of the insulin resistance syndrome in transsexual subjects." Clin Endocrinol (Oxf) 58(5): 562-71.
 29. Elshorbagy, A. K., A. Oulhaj, et al. (2007). "Plasma creatinine as a determinant of plasma total homocysteine concentrations in the Hordaland Homocysteine Study: use of statistical modeling to determine reference limits." Clin Biochem 40(16-17): 1209-18.

Ilaria Campesi.

L'assunzione di associazioni estro-progestiniche seleziona due popolazioni femminili che differiscono in molti aspetti inclusi i processi di metilazione del DNA.

Tesi di dottorato in Farmacologia di Genere, Università degli studi di Sassari.

30. Erman, F., J. Balkan, et al. (2004). "Betaine or taurine administration prevents fibrosis and lipid peroxidation induced by rat liver by ethanol plus carbon tetrachloride intoxication." Amino Acids 27(2): 199-205.
31. Fairweather, D. and S. Frisancho-Kiss (2008). "Mast cells and inflammatory heart disease: potential drug targets." Cardiovasc Hematol Disord Drug Targets 8(1): 80-90.
32. Fan, A. Z. and J. H. Dwyer (2007). "Sex differences in the relation of HDL cholesterol to progression of carotid intima-media thickness: the Los Angeles Atherosclerosis Study." Atherosclerosis 195(1): e191-6.
33. Foos, T. M. and J. Y. Wu (2002). "The role of taurine in the central nervous system and the modulation of intracellular calcium homeostasis." Neurochem Res 27(1-2): 21-6.
34. Franconi, F., S. Brunelleschi, et al. (2007). "Gender differences in drug responses." Pharmacol Res 55(2): 81-95.
35. Franconi, F., M. A. Di Leo, et al. (2004). "Is taurine beneficial in reducing risk factors for diabetes mellitus?" Neurochem Res 29(1): 143-50.
36. Franconi, F., A. Loizzo, et al. (2006). "Taurine supplementation and diabetes mellitus." Curr Opin Clin Nutr Metab Care 9(1): 32-6.
37. Frye, C. A. (2006). "An overview of oral contraceptives: mechanism of action and clinical use." Neurology 66(6 Suppl 3): S29-36.
38. Ghibelli, L., C. Fanelli, et al. (1998). "Rescue of cells from apoptosis by inhibition of active GSH extrusion." Faseb J 12(6): 479-86.
39. Giraldo, E., M. D. Hinchado, et al. (2008). "Influence of gender and oral contraceptives intake on innate and inflammatory response. Role of neuroendocrine factors." Mol Cell Biochem 313(1-2): 147-53.
40. Glenn, C. C., R. D. Nicholls, et al. (1993). "Modification of 15q11-q13 DNA methylation imprints in unique Angelman and Prader-Willi patients." Hum Mol Genet 2(9): 1377-82.
41. Godsland, I. F., D. Crook, et al. (1990). "The effects of different formulations of oral contraceptive agents on lipid and carbohydrate metabolism." N Engl J Med 323(20): 1375-81.

Ilaria Campesi.

L'assunzione di associazioni estro-progestiniche seleziona due popolazioni femminili che differiscono in molti aspetti inclusi i processi di metilazione del DNA.

Tesi di dottorato in Farmacologia di Genere, Università degli studi di Sassari.

42. Gorton, H. J., E. R. Warren, et al. (2000). "Thromboelastography identifies sex-related differences in coagulation." Anesth Analg 91(5): 1279-81.
43. Grikiniene, J., V. Volbekas, et al. (2004). "Gender differences of sodium metabolism and hyponatremia as an adverse drug effect." Medicina (Kaunas) 40(10): 935-42.
44. Grossman, C. (1989). "Possible underlying mechanisms of sexual dimorphism in the immune response, fact and hypothesis." J Steroid Biochem 34(1-6): 241-51.
45. Gruenert, D. C. and A. L. Cozens (1991). "Inheritance of phenotype in mammalian cells: genetic vs. epigenetic mechanisms." Am J Physiol 260(6 Pt 1): L386-94.
46. Hamilos, D. L., P. Zelarney, et al. (1989). "Lymphocyte proliferation in glutathione-depleted lymphocytes: direct relationship between glutathione availability and the proliferative response." Immunopharmacology 18(3): 223-35.
47. Hansen, S. H. (2001). "The role of taurine in diabetes and the development of diabetic complications." Diabetes Metab Res Rev 17(5): 330-46.
48. Harris, D. J. and P. S. Douglas (2000). "Enrollment of women in cardiovascular clinical trials funded by the National Heart, Lung, and Blood Institute." N Engl J Med 343(7): 475-80.
49. Harrison, D., K. K. Griendling, et al. (2003). "Role of oxidative stress in atherosclerosis." Am J Cardiol 91(3A): 7A-11A.
50. Hasty, P., J. Campisi, et al. (2003). "Aging and genome maintenance: lessons from the mouse?" Science 299(5611): 1355-9.
51. Hirakawa, Y., Y. Masuda, et al. (2007). "Impact of gender on in-hospital mortality of patients with acute myocardial infarction undergoing percutaneous coronary intervention: an evaluation of the TAMIS-II data." Intern Med 46(7): 363-6.

Ilaria Campesi.

L'assunzione di associazioni estro-progestiniche seleziona due popolazioni femminili che differiscono in molti aspetti inclusi i processi di metilazione del DNA.

Tesi di dottorato in Farmacologia di Genere, Università degli studi di Sassari.

52. Hoppe, G. (1990). "The clinical relevance of oral contraceptive pill-induced plasma lipid changes: facts and fiction." Am J Obstet Gynecol 163(1 Pt 2): 388-91.
53. Hutson, W. R., R. L. Roehrkasse, et al. (1989). "Influence of gender and menopause on gastric emptying and motility." Gastroenterology 96(1): 11-7.
54. Jacob, N., E. Bruckert, et al. (1999). "Cysteine is a cardiovascular risk factor in hyperlipidemic patients." Atherosclerosis 146(1): 53-9.
55. Jang, T. J., D. I. Kim, et al. (2001). "p16(INK4a) Promoter hypermethylation of non-tumorous tissue adjacent to gastric cancer is correlated with glandular atrophy and chronic inflammation." Int J Cancer 93(5): 629-34.
56. Jern, C., K. Manhem, et al. (1991). "Hemostatic responses to mental stress during the menstrual cycle." Thromb Haemost 66(5): 614-8.
57. Jernstrom, H. C., H. Olsson, et al. (1997). "Reduced testosterone, 17 beta-oestradiol and sexual hormone binding globulin, and increased insulin-like growth factor-1 concentrations, in healthy nulligravid women aged 19-25 years who were first and/or second degree relatives to breast cancer patients." Eur J Cancer Prev 6(4): 330-40.
58. Jo, D., D. Liu, et al. (2005). "Intracellular protein therapy with SOCS3 inhibits inflammation and apoptosis." Nat Med 11(8): 892-8.
59. Kang, G. H., H. J. Lee, et al. (2003). "Aberrant CpG island hypermethylation of chronic gastritis, in relation to aging, gender, intestinal metaplasia, and chronic inflammation." Am J Pathol 163(4): 1551-6.
60. Kashuba, A. D. and A. N. Nafziger (1998). "Physiological changes during the menstrual cycle and their effects on the pharmacokinetics and pharmacodynamics of drugs." Clin Pharmacokinet 34(3): 203-18.
61. Kekki, M. and E. A. Nikkila (1971). "Plasma triglyceride turnover during use of oral contraceptives." Metabolism 20(9): 878-89.
62. Kemono, H., J. Prokopowicz, et al. (1978). "The count of blood platelets and sex in humans." Experientia 34(2): 257.

Ilaria Campesi.

L'assunzione di associazioni estro-progestiniche seleziona due popolazioni femminili che differiscono in molti aspetti inclusi i processi di metilazione del DNA.

Tesi di dottorato in Farmacologia di Genere, Università degli studi di Sassari.

63. Knight, J. A., S. E. Smith, et al. (1987). "Reference intervals for plasma lipoperoxides: age-, sex-, and specimen-related variations." Clin Chem 33(12): 2289-91.
64. Koertge, J., F. Al-Khalili, et al. (2002). "Cortisol and vital exhaustion in relation to significant coronary artery stenosis in middle-aged women with acute coronary syndrome." Psychoneuroendocrinology 27(8): 893-906.
65. Koren, G. (2006). "Changes in drug handling during pregnancy: what it might mean for your patients." Can Fam Physician 52(10): 1214-5.
66. Kuiper, J., G. H. van Puijvelde, et al. (2007). "Immunomodulation of the inflammatory response in atherosclerosis." Curr Opin Lipidol 18(5): 521-6.
67. Lee, D. H., M. D. Gross, et al. (2008). "Is serum gamma-glutamyltransferase a biomarker of xenobiotics, which are conjugated by glutathione?" Arterioscler Thromb Vasc Biol 28(4): e26-8; author reply e29.
68. Legato, M. J. (2004). "Gender-specific medicine: the view from Salzburg." Gend Med 1(2): 61-3.
69. MacAllister, R. and P. Vallance (1994). "Nitric oxide in essential and renal hypertension." J Am Soc Nephrol 5(4): 1057-65.
70. Mailliard, M. E. (1993). "Amino acid transport and glutathione homeostasis: what is the mechanism for cysteine uptake from bile?" Hepatology 18(3): 700-2.
71. Malorni, W., I. Campesi, et al. (2007). "Redox features of the cell: a gender perspective." Antioxid Redox Signal 9(11): 1779-801.
72. Mann, C. (1995). "Women's health research blossoms." Science 269(5225): 766-70.
73. McCully, K. (1998). "Homocysteine, vitamin deficiency and prevention of arteriosclerosis." Integrative Medicine 1: 3-9.
74. McNamara, J. R., H. Campos, et al. (1987). "Effect of gender, age, and lipid status on low density lipoprotein subfraction distribution. Results from the Framingham Offspring Study." Arteriosclerosis 7(5): 483-90.

Ilaria Campesi.

L'assunzione di associazioni estro-progestiniche seleziona due popolazioni femminili che differiscono in molti aspetti inclusi i processi di metilazione del DNA.

Tesi di dottorato in Farmacologia di Genere, Università degli studi di Sassari.

75. Mendelsohn, M. E. and R. H. Karas (2005). "Molecular and cellular basis of cardiovascular gender differences." Science 308(5728): 1583-7.
76. Molchanova, S. M., S. S. Oja, et al. (2007). "Effect of taurine on the concentrations of glutamate, GABA, glutamine and alanine in the rat striatum and hippocampus." Proc West Pharmacol Soc 50: 95-7.
77. Mosca, L., P. Collins, et al. (2001). "Hormone replacement therapy and cardiovascular disease: a statement for healthcare professionals from the American Heart Association." Circulation 104(4): 499-503.
78. Moxley, G., D. Posthuma, et al. (2002). "Sexual dimorphism in innate immunity." Arthritis Rheum 46(1): 250-8.
79. Nagaya, N., M. Uematsu, et al. (1999). "Serum uric acid levels correlate with the severity and the mortality of primary pulmonary hypertension." Am J Respir Crit Care Med 160(2): 487-92.
80. Nath, K. A. and A. K. Salahudeen (1993). "Autoxidation of cysteine generates hydrogen peroxide: cytotoxicity and attenuation by pyruvate." Am J Physiol 264(2 Pt 2): F306-14.
81. Obiany, O., T. C. Osborne, et al. (2008). "Kinetic mechanism of protein arginine methyltransferase 1." Biochemistry 47(39): 10420-7.
82. Oja, S. S. and P. Saransaari (2007). "Pharmacology of taurine." Proc West Pharmacol Soc 50: 8-15.
83. Paravicini, T. M. and R. M. Touyz (2006). "Redox signaling in hypertension." Cardiovasc Res 71(2): 247-58.
84. Park, H. S., J. Y. Park, et al. (2005). "Relationship of obesity and visceral adiposity with serum concentrations of CRP, TNF-alpha and IL-6." Diabetes Res Clin Pract 69(1): 29-35.
85. Pasqui, A. L., G. Bova, et al. (2005). "[Immune factors in atherosclerosis]." Ann Ital Med Int 20(2): 81-9.
86. Patra, S. K. and S. Bettuzzi (2009). "Epigenetic DNA-(cytosine-5-carbon) modifications: 5-aza-2'-deoxycytidine and DNA-demethylation." Biochemistry (Mosc) 74(6): 613-9.
87. Pejaver, R. K. and A. H. Watson (1994). "High-dose vitamin E therapy in glutathione synthetase deficiency." J Inherit Metab Dis 17(6): 749-50.

Ilaria Campesi.

L'assunzione di associazioni estro-progestiniche seleziona due popolazioni femminili che differiscono in molti aspetti inclusi i processi di metilazione del DNA.

Tesi di dottorato in Farmacologia di Genere, Università degli studi di Sassari.

88. Persky, V. W., A. R. Dyer, et al. (1979). "Uric acid: a risk factor for coronary heart disease?" Circulation 59(5): 969-77.
89. Pilote, L., K. Dasgupta, et al. (2007). "A comprehensive view of sex-specific issues related to cardiovascular disease." Cmaj 176(6): S1-44.
90. Post, M. S., M. O. Verhoeven, et al. (2003). "Effect of hormone replacement therapy on plasma levels of the cardiovascular risk factor asymmetric dimethylarginine: a randomized, placebo-controlled 12-week study in healthy early postmenopausal women." J Clin Endocrinol Metab 88(9): 4221-6.
91. Post, W. S., P. J. Goldschmidt-Clermont, et al. (1999). "Methylation of the estrogen receptor gene is associated with aging and atherosclerosis in the cardiovascular system." Cardiovasc Res 43(4): 985-91.
92. Ratnakumari, L., I. A. Qureshi, et al. (1996). "Arginine-related guanidino compounds and nitric oxide synthase in the brain of ornithine transcarbamylase deficient spf mutant mouse: effect of metabolic arginine deficiency." Neurosci Lett 215(3): 153-6.
93. Regitz-Zagrosek, V. (2006). "Therapeutic implications of the gender-specific aspects of cardiovascular disease." Nat Rev Drug Discov 5(5): 425-38.
94. Rosner, M. H. and J. Kirven (2007). "Exercise-associated hyponatremia." Clin J Am Soc Nephrol 2(1): 151-61.
95. Ross, R. (1993). "The pathogenesis of atherosclerosis: a perspective for the 1990s." Nature 362(6423): 801-9.
96. Rotteveel, R. C., K. J. Roozendaal, et al. (1993). "The influence of oral contraceptives on the time-integral of thrombin generation (thrombin potential)." Thromb Haemost 70(6): 959-62.
97. Rushton, D. H., R. Dover, et al. (2001). "Why should women have lower reference limits for haemoglobin and ferritin concentrations than men?" Bmj 322(7298): 1355-7.
98. Savvidou, M. D., A. D. Hingorani, et al. (2003). "Endothelial dysfunction and raised plasma concentrations of asymmetric dimethylarginine in

Ilaria Campesi.

L'assunzione di associazioni estro-progestiniche seleziona due popolazioni femminili che differiscono in molti aspetti inclusi i processi di metilazione del DNA.

Tesi di dottorato in Farmacologia di Genere, Università degli studi di Sassari.

- pregnant women who subsequently develop pre-eclampsia." Lancet 361(9368): 1511-7.
99. Schaffer, S., J. Azuma, et al. (2003). "Why is taurine cytoprotective?" Adv Exp Med Biol 526: 307-21.
100. Schmitz, G. and M. Grandl (2007). "Role of redox regulation and lipid rafts in macrophages during Ox-LDL-mediated foam cell formation." Antioxid Redox Signal 9(9): 1499-518.
101. Schwammenthal, Y. and D. Tanne (2004). "Homocysteine, B-vitamin supplementation, and stroke prevention: from observational to interventional trials." Lancet Neurol 3(8): 493-5.
102. Selhub, J. (1999). "Homocysteine metabolism." Annu Rev Nutr 19: 217-46.
103. Sevanian, A. and P. Hochstein (1985). "Mechanisms and consequences of lipid peroxidation in biological systems." Annu Rev Nutr 5: 365-90.
104. Shen, H. M. and S. Pervaiz (2006). "TNF receptor superfamily-induced cell death: redox-dependent execution." Faseb J 20(10): 1589-98.
105. Skouby, S. O. (2004). "Contraceptive use and behavior in the 21st century: a comprehensive study across five European countries." Eur J Contracept Reprod Health Care 9(2): 57-68.
106. Sondheimer, S. J. (2008). "Oral contraceptives: mechanism of action, dosing, safety, and efficacy." Cutis 81(1 Suppl): 19-22.
107. Sotgia, S., C. Carru, et al. (2008). "Rapid quantification of total genomic DNA methylation degree by short-end injection capillary zone electrophoresis." J Chromatogr A 1185(1): 145-50.
108. Stenvinkel, P., M. Karimi, et al. (2007). "Impact of inflammation on epigenetic DNA methylation - a novel risk factor for cardiovascular disease?" J Intern Med 261(5): 488-99.
109. Stramba-Badiale, M. (2009). "Postmenopausal hormone therapy and the risk of cardiovascular disease." J Cardiovasc Med (Hagerstown) 10(4): 303-9.

Ilaria Campesi.

L'assunzione di associazioni estro-progestiniche seleziona due popolazioni femminili che differiscono in molti aspetti inclusi i processi di metilazione del DNA.

Tesi di dottorato in Farmacologia di Genere, Università degli studi di Sassari.

110. Strasak, A., E. Ruttmann, et al. (2008). "Serum uric acid and risk of cardiovascular mortality: a prospective long-term study of 83,683 Austrian men." Clin Chem 54(2): 273-84.
111. Strassburg, A., C. Krems, et al. (2004). "Effect of age on plasma homocysteine concentrations in young and elderly subjects considering serum vitamin concentrations and different lifestyle factors." Int J Vitam Nutr Res 74(2): 129-36.
112. Stuhlinger, M. C., P. S. Tsao, et al. (2001). "Homocysteine impairs the nitric oxide synthase pathway: role of asymmetric dimethylarginine." Circulation 104(21): 2569-75.
113. Tabas, I. (1995). "The stimulation of the cholesterol esterification pathway by atherogenic lipoproteins in macrophages." Curr Opin Lipidol 6(5): 260-8.
114. Tanis, B. C., M. A. van den Bosch, et al. (2001). "Oral contraceptives and the risk of myocardial infarction." N Engl J Med 345(25): 1787-93.
115. Tappel, A. L. (1973). "Lipid peroxidation damage to cell components." Fed Proc 32(8): 1870-4.
116. Terwecoren, A., E. Steen, et al. (2009). "Ischemic stroke and hyperhomocysteinemia: truth or myth?" Acta Neurol Belg 109(3): 181-8.
117. Tousoulis, D., R. H. Boger, et al. (2007). "Mechanisms of disease: L-arginine in coronary atherosclerosis--a clinical perspective." Nat Clin Pract Cardiovasc Med 4(5): 274-83.
118. Tracy, T. S., R. Venkataramanan, et al. (2005). "Temporal changes in drug metabolism (CYP1A2, CYP2D6 and CYP3A Activity) during pregnancy." Am J Obstet Gynecol 192(2): 633-9.
119. Vallance, P., A. Leone, et al. (1992). "Accumulation of an endogenous inhibitor of nitric oxide synthesis in chronic renal failure." Lancet 339(8793): 572-5.
120. van Guldener, C. and K. Robinson (2000). "Homocysteine and renal disease." Semin Thromb Hemost 26(3): 313-24.

Ilaria Campesi.

L'assunzione di associazioni estro-progestiniche seleziona due popolazioni femminili che differiscono in molti aspetti inclusi i processi di metilazione del DNA.

Tesi di dottorato in Farmacologia di Genere, Università degli studi di Sassari.

121. Van Vliet, H. A., D. A. Grimes, et al. (2002). "Biphasic versus monophasic oral contraceptives for contraception: a Cochrane review." Hum Reprod 17(4): 870-3.
122. van Vliet, H. A., D. A. Grimes, et al. (2002). "Biphasic versus triphasic oral contraceptives for contraception." Contraception 65(5): 321-4.
123. Verhoeven, M. O., M. Hemelaar, et al. (2006). "Oral, more than transdermal, oestrogen therapy lowers asymmetric dimethylarginine in healthy postmenopausal women: a randomized, placebo-controlled study." J Intern Med 259(2): 199-208.
124. Vina, J., M. Vento, et al. (1995). "L-cysteine and glutathione metabolism are impaired in premature infants due to cystathionase deficiency." Am J Clin Nutr 61(5): 1067-9.
125. Wang, M., L. Baker, et al. (2005). "Sex differences in the myocardial inflammatory response to ischemia-reperfusion injury." Am J Physiol Endocrinol Metab 288(2): E321-6.
126. Wang, M., B. M. Tsai, et al. (2006). "Tumor necrosis factor receptor 1 signaling resistance in the female myocardium during ischemia." Circulation 114(1 Suppl): I282-9.
127. Wannamethee, S. G. (2005). "Serum uric acid and risk of coronary heart disease." Curr Pharm Des 11(32): 4125-32.
128. Watanabe, R. M., C. G. Azen, et al. (1994). "Defects in carbohydrate metabolism in oral contraceptive users without apparent metabolic risk factors." J Clin Endocrinol Metab 79(5): 1277-83.
129. Weng, Y. M., M. W. Chang, et al. (2008). "Pituitary apoplexy associated with cortisol-induced hyperglycemia and acute delirium." Am J Emerg Med 26(9): 1068 e1-3.
130. WHO, C. o. S. D. o. H. (2007). "Engaging men and boys in changing gender-based inequity."
131. WHO, C. o. S. D. o. H. (2008). "Global Health Inequity—The Need for Action." Closing the Gap in a Generation: Healthy Equity through Action on the Social Determinants of Health.

Ilaria Campesi.

L'assunzione di associazioni estro-progestiniche seleziona due popolazioni femminili che differiscono in molti aspetti inclusi i processi di metilazione del DNA.

Tesi di dottorato in Farmacologia di Genere, Università degli studi di Sassari.

132. Winkler, U. H. and R. Sudik (2009). "The effects of two monophasic oral contraceptives containing 30 mcg of ethinyl estradiol and either 2 mg of chlormadinone acetate or 0.15 mg of desogestrel on lipid, hormone and metabolic parameters." Contraception 79(1): 15-23.
133. Wu, G. and S. M. Morris, Jr. (1998). "Arginine metabolism: nitric oxide and beyond." Biochem J 336 (Pt 1): 1-17.
134. Wu, H., Y. Jin, et al. (2005). "Mode of action of taurine as a neuroprotector." Brain Res 1038(2): 123-31.
135. Zeng, S. M., J. Yankowitz, et al. (2001). "Etiology of differences in hematocrit between males and females: sequence-based polymorphisms in erythropoietin and its receptor." J Gend Specif Med 4(1): 35-40.
136. Zinellu, A., C. Carru, et al. (2003). "N-methyl-D-glucamine improves the laser-induced fluorescence capillary electrophoresis performance in the total plasma thiols measurement." Electrophoresis 24(16): 2796-804.
137. Zinellu, A., S. Sotgia, et al. (2009). "Taurine determination by capillary electrophoresis with laser-induced fluorescence detection: from clinical field to quality food applications." Amino Acids 36(1): 35-41.
138. Zinellu, A., S. Sotgia, et al. (2009). "S-homocysteinylated LDL apolipoprotein B adversely affects human endothelial cells in vitro." Atherosclerosis 206(1): 40-6.
139. Zinellu, A., S. Sotgia, et al. (2007). "High-throughput CZE-UV determination of arginine and dimethylated arginines in human plasma." Electrophoresis 28(12): 1942-8.
140. Zinellu, A., E. Zinellu, et al. (2006). "Factors affecting S-homocysteinylated LDL apoprotein B." Clin Chem 52(11): 2054-9.

Ilaria Campesi.

L'assunzione di associazioni estro-progestiniche seleziona due popolazioni femminili che differiscono in molti aspetti inclusi i processi di metilazione del DNA.

Tesi di dottorato in Farmacologia di Genere, Università degli studi di Sassari.

RINGRAZIAMENTI

Ringrazio la Prof. F. Franconi per avermi dato la possibilità di acquisire nuove conoscenze nel campo della Farmacologia di genere.

Ringrazio il Dott. M. Palermo per la preziosa collaborazione nel reclutamento dei volontari e per le analisi ematiche effettuate.

Un ringraziamento al Dott. A. Zinellu e il Prof. C. Carru per le analisi in elettroforesi capillare.

Un ringraziamento al Dott. P. Occhialini e al personale INBB per avermi dato la possibilità di usufruire del Laboratorio Nazionale di Osilo per lo sviluppo del progetto.

Ringrazio Silvia per l'amicizia e il sostegno reciproco in questi 3 anni di dottorato.

Un ringraziamento, ovviamente, a Bastiano e tutta la mia famiglia, per essere sempre presenti nelle esperienze importanti.

Ilaria Campesi.

L'assunzione di associazioni estro-progestiniche seleziona due popolazioni femminili che differiscono in molti aspetti inclusi i processi di metilazione del DNA.

Tesi di dottorato in Farmacologia di Genere, Università degli studi di Sassari.