



A.D. MDLXII

UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI SASSARI

**SCUOLA DI DOTTORATO IN SCIENZE BIOMEDICHE**  
**INDIRIZZO IN FARMACOLOGIA DI GENERE**  
(XXIII Ciclo)

“Giovani donne in età fertile (trattate e non trattate con contraccettivi orali) differiscono in alcuni parametri ematoclinici e hanno anche una differente funzionalità macrofagica”

Coordinatore: Prof. EUSEBIO TOLU

Tutore: Dott.ssa ANTONELLA MATTANA

Responsabile di indirizzo: Prof.ssa FLAVIA FRANCONI

Tesi di Dottorato di: Dr.ssa MANUELA SANNA

ANNO ACCADEMICO 2009-2010

## SOMMARIO

<b>SCOPO DEL LAVORO</b>	<b>pag. 3</b>
<b>INTRODUZIONE</b>	<b>pag. 5</b>
<b>MATERIALI E METODI</b>	<b>pag. 21</b>
Esami biochimici ed ematologici	<b>pag. 22</b>
Esami parametri ormonali	<b>pag. 22</b>
Tioli plasmatici	<b>pag. 23</b>
Taurina	<b>pag. 24</b>
MDA	<b>pag. 25</b>
Arginina-ADMA-SDMA	<b>pag. 25</b>
Metilazione del DNA	<b>pag. 26</b>
Isolamento dei monociti	<b>pag. 27</b>
Caratterizzazione dei macrofagi	<b>pag. 32</b>
Espressione e attivazione di ER $\alpha$ , ER $\beta$ e AR in MDMs derivati da differenti popolazioni femminili	<b>pag. 32</b>
Dosaggio di TNF-alfa	<b>pag. 32</b>
Analisi statistica	<b>pag. 34</b>
<b>RISULTATI</b>	<b>pag. 35</b>
Dati demografici delle popolazioni studiate	<b>pag. 35</b>
Valutazione degli effetti dei CO nei parametri biochimici ed ematologici	<b>pag. 36</b>
Valutazione degli effetti dei CO nei parametri ormonali	<b>pag. 42</b>

Valutazione degli effetti dei CO nella perossidazione lipidica, tioli e taurina	<b>pag. 43</b>
Valutazione degli effetti dei CO sulla metilazione del DNA e sulle arginine metilate	<b>pag. 45</b>
Espressione e attività di ER e AR in MDMs ottenuti da differenti popolazioni femminili	<b>pag. 47</b>
Misurazione del TNF-alfa	<b>pag. 49</b>
<b>DISCUSSIONE</b>	<b>pag. 51</b>
<b>CONCLUSIONI</b>	<b>pag. 57</b>
<b>RINGRAZIAMENTI</b>	<b>pag. 58</b>
<b>BIBLIOGRAFIA</b>	<b>pag. 59</b>

## SCOPO DEL LAVORO

In questo lavoro abbiamo voluto evidenziare la necessità di impiegare nei trials clinici le giovani donne che fanno uso di contraccettivi orali (CO) in considerazione del fatto che essi sono il metodo di controllo delle nascite più comunemente utilizzato in tutto il mondo [1], e che le fluttuazioni ormonali che caratterizzano la vita della donna (ciclo mestruale, gravidanza, allattamento, menopausa) e l'uso che molte donne fanno delle associazioni estro progestiniche per lunghi periodi della loro vita possono selezionare diverse sottopopolazioni di donne. Infatti, alcuni aspetti non sembrano essere stati sufficientemente considerati, compreso il fatto che la contraccettazione ormonale può interferire con la farmacocinetica e la farmacodinamica [2]. In questo contesto è importante ricordare che i CO modificano il sistema endogeno attraverso variazioni nel sistema ipotalamo-ipofisi-ovarico.

Inoltre OC sono in grado di indurre alterazioni nel metabolismo dei carboidrati [3, 4] e nel metabolismo lipidico [4].

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, nella popolazione femminile in base all'assunzione o meno di contraccettivi orali (CO), e in seguito a stratificazione in base al tipo di progestinico androgenico (FOCA+) e antiandrogenico (FOCA-) presente nella formulazione.

Abbiamo analizzato i livelli della dimetilarginina asimmetrica (ADMA), e della dimetilarginina simmetrica, (SDMA), in quanto, uno studio dimostra che i CO diminuiscono questo indice della disfunzione endoteliale [5]. Le variazioni indotte dai CO possono aumentare il rischio di trombo embolia venosa [6, 7] ed aumentare la prevalenza dell'aterosclerosi in giovani donne apparentemente sane.

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.

In questo studio abbiamo focalizzato la nostra attenzione sui macrofagi derivati da monociti (MDMs) per la loro implicazione nei processi infiammatori e nell'aterosclerosi [7], al fine di valutare se la funzionalità di cellule infiammatorie possa essere influenzata dall'assunzione di CO anche in base al potenziale androgenomimetico del progestinico presente nella formulazione. Inoltre, di grande rilevanza il fatto che MDMs, esprimono sia i recettori degli estrogeni (ER) che i recettori degli androgeni (AR) [8] Questo ci ha portato a valutare l'espressione e l'attività di ER e AR insieme ad una funzione tipica dei macrofagi, ossia il rilascio del Tumor necrosis factor-alfa (TNF-alfa).

## INTRODUZIONE

Gli ormoni come possibilità anticoncezionale furono proposti in medicina per la prima volta nel 1931 dal ginecologo austriaco Haberlandt, ma l'idea fu completamente ignorata. Soltanto nel 1958 tre medici (Garcia, Rock e Pincus) sperimentarono con successo il primo CO che fu commercializzato negli USA due anni dopo, con il nome di Enovid (mestranolo e noretinodrel) che rappresentò il primo antifecondativo orale, approvato dalla Food & Drug Administration (FDA) americana [9], sulla base di studi clinici che comprendevano solo 132 donne portoricane che avevano assunto il contraccettivo per oltre un anno. Cinque donne morirono nel corso dello studio, ma non si fece alcuno sforzo per determinarne la causa. In Europa il contraccettivo orale arrivò nel 1961 sotto un altro nome e un'altra composizione: Anovlar (etinil-estradiolo e noretisterone acetato) [9].

Attualmente i CO sono utilizzati da più di 100 milioni di donne nel mondo. L'utilizzo varia molto in base all'età, all'educazione, allo stato civile e allo stato di appartenenza: Un quarto delle donne tra i 16 e i 49 anni nel Regno Unito usa correntemente i CO, mentre in Giappone solo l'1%. In Italia, poco meno del 20% delle donne tra i 15 e i 44 anni utilizza CO (14° posto in Europa, davanti solo a Spagna, Slovacchia, Polonia e Grecia).

Questi agiscono grazie alla combinazione di piccole quantità di un estrogeno (generalmente etinilestradiolo) e di un progestinico. E la loro assunzione quotidiana inibisce gli eventi ormonali che inducono l'ovulazione.

Il meccanismo dell'ovulazione è controllato da un complesso sistema ormonale a tre livelli. Nel sistema nervoso centrale l'ipotalamo produce, con una modalità pulsatoria, un ormone detto GnRH (ormone di rilascio delle gonadotropine); questo agisce sull'ipofisi anteriore inducendo la

produzione di due ormoni, FSH (ormone follicolo-stimolante) e LH (ormone luteinizzante), che agiscono sull'ovaio determinando gli eventi che portano alla maturazione del follicolo e all'ovulazione.

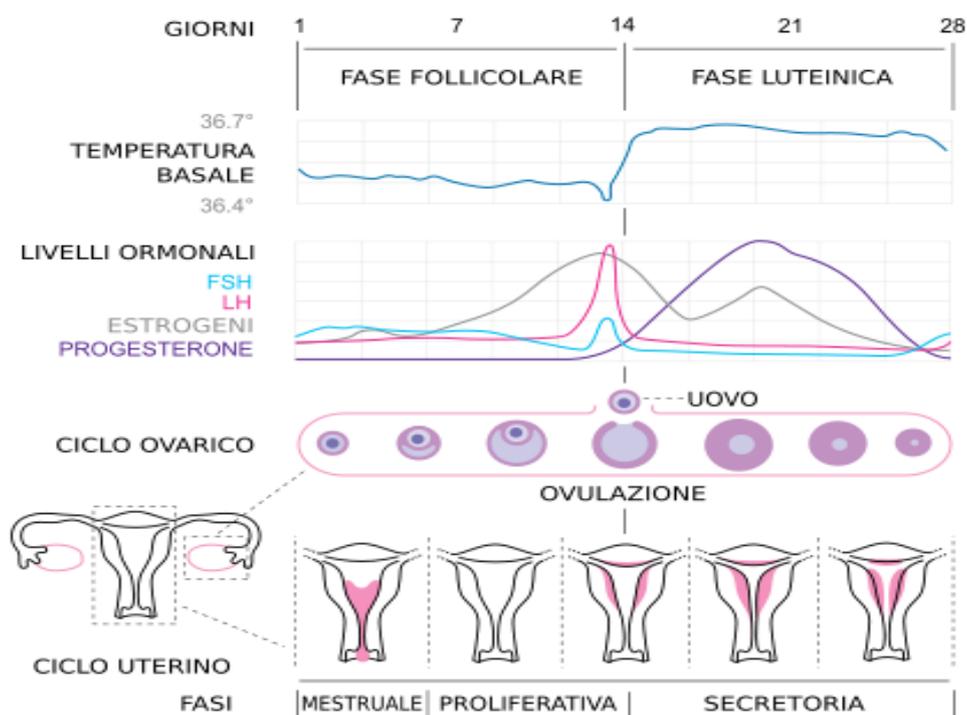
All'inizio del ciclo mestruale, nella fase follicolare, i livelli di FSH aumentano, favorendo lo sviluppo del follicolo ovarico e stimolando la produzione di estrogeni nell'ovaio. Già verso il termine della fase follicolare i livelli di FSH prodotto iniziano a diminuire, mentre aumentano quelli dell'LH: quest'ultimo raggiunge un picco intorno al 14° giorno del ciclo, provocando l'ovulazione.

La secrezione degli ormoni FSH e LH nell'ipofisi è soggetta ad un meccanismo di controllo da parte dell'estradiolo prodotto dall'ovaio: infatti ad un aumento della produzione di estradiolo corrisponde una riduzione nella secrezione di FSH e LH, probabilmente dovuta ad una ridotta sensibilità delle cellule ipofisarie all'ormone stimolante (GnRH).

Questo meccanismo di controllo è detto *feedback negativo*. Anche il progesterone prodotto dall'ovaio inibisce il rilascio di LH. L'estrogeno ed il progestinico contenuti nei CO, simulando gli ormoni naturali, sfruttano il feedback negativo, portando così ad una ridotta secrezione di FSH e soprattutto di LH da parte dell'ipofisi.

La riduzione dei livelli plasmatici di FSH inibisce lo sviluppo del follicolo, impedendo così il normale aumento dei livelli di estradiolo.

Il feedback negativo del progestinico impedisce il picco di LH a metà ciclo: questo fatto, insieme all'arresto dello sviluppo follicolare, previene l'ovulazione.



**Figura 1. Ciclo mestruale**

Esistono diversi tipi di CO, classificabili in base al contenuto ormonale (progestinico e/o estrogeno) e, nel caso di una associazione estrogeno + progestinico, in base al dosaggio delle due sostanze. Tale dosaggio può essere fisso per l'intero ciclo (in tal caso tutte le compresse contenute nella confezione avranno identica composizione) oppure variare di settimana in settimana. Nel primo caso si parla di associazione monofasica; diversamente si possono avere associazioni bifasiche o trifasiche .

Nell'associazione monofasica il dosaggio ormonale rimane inalterato per tutta la durata del ciclo.

Nell' associazione 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.

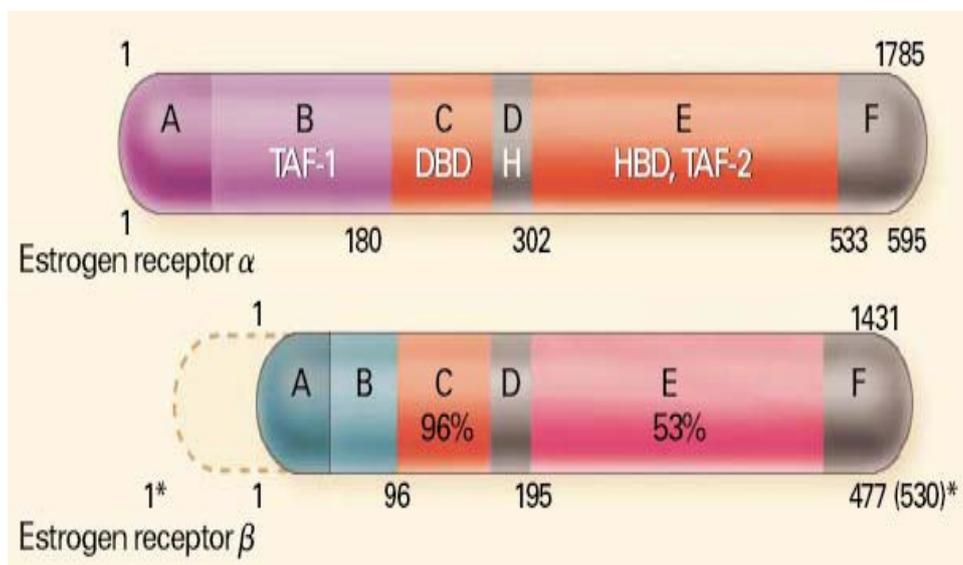
In questo modo si è cercato di mimare l'andamento del ciclo mestruale, con l'obiettivo, non sempre raggiunto, di ottenere una migliore tollerabilità e un miglior controllo del ciclo.

Con l'associazione 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.

In questo contesto è importante ricordare che i CO inducono alterazioni nel metabolismo glucidico [3, 10, 11] inducendo 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 [12-15]. Gli effetti pleiotropici e tessuto-specifici degli estrogeni sono mediati da due diversi recettori nucleari, ER $\alpha$  e ER $\beta$  [14, 16, 17]. Questi, attivati dal legame con l'ormone, formano omodimeri o eterodimeri e agiscono da fattori trascrizionali [18] nella regolazione dell'espressione di geni E2-responsivi, legandosi direttamente al DNA (azione genomica degli estrogeni). Oltre a questo classico meccanismo d'azione recettoriale è nota, in alcuni tipi cellulari, una via alternativa di trasduzione del segnale che prevede l'interazione a livello citoplasmatico del complesso recettore-ormone con effettori di diversi *pathway* di trasduzione (via "non genomica" d'azione degli estrogeni), in grado di indurre rapide e transitorie risposte cellulari.

Nella donna gli estrogeni sono prodotti dalle ovaie, dalla placenta, dal corpo luteo durante la gravidanza e una piccola quota anche dal surrene e dal tessuto adiposo. Hanno un ruolo importante nel sistema nervoso centrale e nell'apparato scheletrico e cardiovascolare [19]. Il 17 $\beta$  estradiolo, il principale estrogeno femminile, ricopre il ruolo di modulatore di importanti processi fisiologici non solo a livello dell'apparato riproduttivo, ma anche in tessuti non riproduttivi, quali l'osso, il sistema nervoso centrale e il sistema cardiovascolare [13, 20, 21].

In riferimento al sistema cardiovascolare, ER $\alpha$  ed ER $\beta$  sono stati identificati nei cardiomiociti [22], nei macrofagi [23], nelle cellule endoteliali [24, 25] e nelle cellule muscolari lisce di ratto [26] e umane [27].



**Figura 2. Struttura dei recettori  $\alpha$  e  $\beta$  degli estrogeni nell'uomo.**

Attualmente sono state identificate quattro distinte vie molecolari con cui gli estrogeni ed i ER possono disciplinare i processi biologici [28].

*Meccanismo classico.*

Nello stato di riposo, il recettore, in equilibrio tra citoplasma e nucleo, è legato a proteine che lo mantengono in uno stato inattivo e ne mascherano il sito di legame con il DNA (*heat shock proteins* o hsp). L'interazione del *ligand binding domain* con un agonista induce un cambiamento conformazionale del recettore che porta alla dissociazione dalle proteine inibitorie hsp e all'esposizione dei siti di dimerizzazione e di legame con il DNA. Gli omodimeri e gli eterodimeri traslocano nel nucleo attraverso un meccanismo non ancora completamente chiarito, ma che coinvolge

l'interazione diretta con la caveolina-1. Una volta nel nucleo, i dimeri si legano agli ERE localizzati nella regione dei promotori di geni bersaglio e modulano la trascrizione con il contributo di coattivatori e corepressori, che vengono reclutati in modo diverso dalle due isoforme recettoriali (figura 3A). Questa regolazione dell'espressione genica è caratteristica dei recettori nucleari e rappresenta il meccanismo d'azione classico degli estrogeni [29]. In aggiunta a questa, sono note anche altre modalità di attivazione dei recettori degli estrogeni [29].

#### *Meccanismo ERE-indipendente.*

La modulazione dell'espressione genica può avvenire anche in modo ERE-indipendente, attraverso l'interazione con altri fattori di trascrizione che regolano geni privi di ERE nella zona dei propri promotori (figura 3B). Per esempio, sia ER $\alpha$  che ER $\beta$  possono legare il fattore di trascrizione nucleare AP-1 (*activating protein-1*), attivando la trascrizione dei suoi geni bersaglio [30]. Inoltre, ER $\alpha$  è in grado di bloccare l'espressione di interleuchina-6 (IL-6), legando il fattore di trascrizione NF-kB e impedendone l'interazione con i *responsive elements* sul gene di IL-6 [31].

#### *Meccanismo ligando-indipendente.*

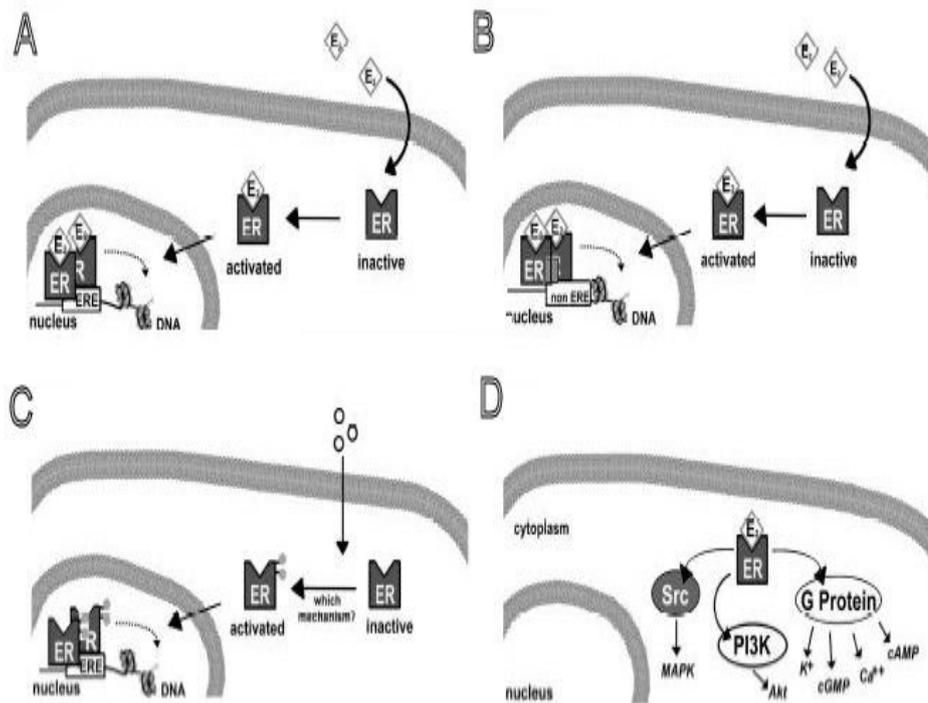
La regolazione della trascrizione mediata dai recettori degli estrogeni non è limitata alla sola interazione con ligandi specifici. Per esempio, questi recettori possono venire attivati in seguito alla fosforilazione da parte di protein-chinasi, in risposta all'attivazione dei recettori di fattori di crescita (figura 3C).

L'esistenza di tale *cross-talk* è stata dimostrata nel caso dell'attivazione ligando indipendente dei recettori degli estrogeni da parte dell'insulina, dell'EGF (*epidermal growth factor*) e del TGF- $\alpha$  (*transforming growth factor- $\alpha$* ).

#### *Meccanismo non genomico.*

Gli estrogeni hanno anche effetti che non possono essere attribuiti alla modulazione della trascrizione genica a causa della loro rapida insorgenza. Infatti, questi effetti non genomici si verificano nel giro di secondi o minuti

dall'esposizione all'estradiolo e sono mediati dall'attivazione di diversi sistemi di trasduzione del segnale, quali la via delle protein chinasi PKA, PKB, PKC, delle MAPK (*mitogen-activated protein kinase*) e della PI3K (*phosphatidylinositol 3-OH kinase*); inoltre, in seguito all'attivazione di ER vengono prodotti secondi messaggeri, quali Ca<sup>2+</sup>, cAMP e cGMP [32] (Figura 4C). L'attivazione di meccanismi non genomici può influenzare anche l'espressione genica; ciò implica che le azioni nucleari e quelle non nucleari degli estrogeni siano integrate [33]. Gli effetti non genomici degli estrogeni sono molteplici, ma hanno alcune caratteristiche comuni: sono troppo rapidi per essere compatibili con la sintesi di mRNA e proteine, non vengono bloccati da inibitori della trascrizione o della sintesi proteica e sono indotti anche da molecole che non attraversano la membrana cellulare, quali l'estradiolo complessato con albumina [34]. Questi effetti sembrano essere mediati da recettori degli estrogeni localizzati sulla membrana cellulare. Sebbene non siano ancora stati clonati, i recettori in grado di mediare gli effetti rapidi degli estrogeni potrebbero essere: (a) gli stessi recettori nucleari che traslocano sulla membrana [35]; (b) forme troncate del recettore ER $\alpha$  che localizzano di preferenza sulla membrana [36]; (c) recettori per neurotrasmettitori o ormoni peptidici modulati allostericamente dagli estrogeni [37]; (d) nuovi componenti della famiglia dei recettori degli estrogeni [38]. In particolare, è stato recentemente descritto un recettore accoppiato a proteina G, GPCR30, in grado non solo di legare gli estrogeni ma anche di attivare rapidamente la via della PI3K [39].



**Figura 3 Meccanismo d'azione dei recettori degli estrogeni** (A) meccanismo classico, ligando- e ERE-dipendente, (B) meccanismo ERE-indipendente, (C) meccanismo ligando-indipendente, (D) meccanismo non genomico.

Dato il ruolo cruciale che rivestono nell'aterosclerosi e nell'immunità [40], abbiamo focalizzato la nostra attenzione sui macrofagi derivati da monociti (MDMs) con lo scopo di valutare l'espressione e l'attività di ER e AR insieme ad una funzione tipica dei macrofagi, ossia il rilascio di citochine proinfiammatorie.

I monociti (fagociti mononucleati del sangue) e i macrofagi [dal greco macro- (lungo, esteso) e -fago (mangiatore) (fagociti mononucleati dei tessuti)] hanno una parte centrale nella resistenza alle infezioni e nell'infiammazione. Queste cellule assumono un'importanza fondamentale nell'immunità specifica attraverso una stretta associazione funzionale con i linfociti, soprattutto quelli della classe T. I macrofagi derivano dalle cellule staminali emopoietiche del midollo osseo che, attraverso lo stadio di monoblasti e promonociti, si differenziano in monociti e come tali entrano

in circolo. Da qui, dopo poco tempo (36-104 ore), i monociti migrano nei tessuti e nelle cavità sierose in cui si differenziano a macrofagi.

Sotto la denominazione di macrofagi vengono comprese cellule capaci di svolgere un'intensa attività fagocitaria, anche verso elementi estranei di dimensioni relativamente grandi, come batteri ed anche cellule intere. La captazione del materiale da fagocitare può avvenire in due modi:

- a) attraverso la chemiotassi, con la migrazione dei fagociti mediante movimenti ameboidi verso le particelle da fagocitare, come avviene molto attivamente nei focolai infiammatori;
- b) attraverso il contatto casuale dei macrofagi con particelle da fagocitare presenti nel circolo sanguigno e linfatico.

L'endocitosi del materiale da fagocitare avviene attraverso una trasformazione della membrana esterna del fagocita: vengono emesse delle propaggini digitiformi tentacolari (pseudopodi), che prima circondano il materiale da fagocitare e poi si fondono perifericamente formando vescicole (vacuoli citotici o fagosomi) entro cui viene a trovarsi imprigionata la particella estranea. A questo punto i granuli (lisosomi) convergono sul fagosoma in formazione, si fondono con esso, e scaricano il loro contenuto enzimatico nel lume del vacuolo attorno alla particella estranea. Questo processo porta alla scomparsa dei granuli e si chiama degranulazione. Le idrolasi acide derivanti dai lisosomi (proteasi, fosfatasi, nucleasi, glucuronidasi, solfatasi e lipasi) degradano il materiale digeribile all'interno dei vacuoli fagosomi; inoltre, questi enzimi intervengono nella digestione di batteri già uccisi precedentemente da vari altri fattori antimicrobici. Durante la fagocitosi i macrofagi vanno incontro a un fortissimo aumento dell'attività metabolica. Il consumo di ossigeno si raddoppia o si triplica, aumenta la formazione di ossigeno in forma anionica ( $O_2^-$ ) e di perossido di idrogeno ( $H_2O_2$ ). Altri prodotti reattivi che si possono formare sono il radicale idrossilico libero ( $OH\cdot$ ) ed ossigeno singoletto. Il principale effetto benefico è di fornire alla cellula un potente sistema microbicida, che si va ad aggiungere a quello rappresentato dal

versamento di enzimi idrolitici e di altri fattori nel fagosoma. Oltre alle funzioni di fagocitosi, i macrofagi secernono fattori che regolano l'attività di altre cellule, come le citochine, tra cui il TNF-alfa che gioca un importante ruolo nell'infiammazione [41]. 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 [18]. La sua secrezione può essere indotta in vitro dagli esteri del forbolo, come il forbolo acetato miristato (PMA), o dal lipopolisaccaride (LPS) [42]. Fra le varie citochine che svolgono importanti azioni autocrine e paracrine che sono alla base dei processi infiammatori [43], il TNF-alfa appare di particolare interesse perché porta alla produzione di ROS [44] e perché sembra essere uno dei link che collega l'obesità al diabete e alle malattie cardiovascolari [45].

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 [46]. L'infiammazione cronica è stata riportata come uno dei fattori associati ad un aumento della metilazione del DNA sia nella gastrite cronica [47] che nel cancro allo stomaco [48].

Modificazioni epigenetiche potrebbero essere più importanti dei polimorfismi genetici nella patogenesi dell'aterosclerosi [49].

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). La metilazione che contribuisce all'eredità epigenetica può avvenire attraverso la metilazione del DNA o delle proteine [50].

La metilazione del DNA è una delle più importanti modificazioni post-replicative del genoma. 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 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.

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) [51] ed Angelman (malattia genetica dovuta a un difetto nella duplicazione cromosomica da imprinting genetico) [52] 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 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 quelle regioni isola CpG - localizzate essenzialmente a monte di geni costitutivi e caratterizzate da un quadro non metilato diventano metilate con perdita d’ espressione di geni oncosoppressori [53]. 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. 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  $\alpha$  degli estrogeni, svolge un ruolo nell'aterogenesi e nell'invecchiamento del sistema vascolare [54]. L’omocisteina (Hcy) il glutatione (GSH) e la cisteina (Cys) sono i più comuni amminotoli plasmatici, coinvolti in numerose funzioni. Diversi studi clinici hanno dimostrato che un moderato aumento dei livelli plasmatici di Hcy è associato all’insorgenza di patologie quali l’aterosclerosi, malattie cardiovascolari, ictus [55]. Inoltre, la loro quantificazione nei fluidi biologici è importante per la diagnosi di alcune gravi patologie come il diabete e il cancro [56].

**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 [57]:

- 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 [58], ma può essere causato anche da mutazioni genetiche, deficit vitaminici, in particolare B12 e B6 [59] malattia renali [60] ed altre malattie e da numerosi farmaci.

**Il Glutathione**, Il Glutathione, 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. È il principale antiossidante endogeno prodotto dalle cellule, che partecipano direttamente nella neutralizzazione dei radicali liberi e di composti reattivi dell'ossigeno [61].

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 [62].

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 [63, 64].

**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 [65]. Possiede anche proprietà auto-ossidative in presenza di ioni metallici, con conseguente generazione di radicali liberi e perossido di idrogeno [66]. Questo amminotioolo 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 [67]. Inoltre, la Cys forma un addotto con NO e potrebbe dunque compromettere la funzione endoteliale [68]. Rappresenta pertanto un potenziale fattore di rischio per patologie a livello cardiovascolare.

La Taurina è implicata in un grande numero di vari fenomeni fisiologici inclusa l'inibizione della neurotrasmissione, il potenziamento a lungo termine dello striato/ippocampo [69] l'inibizione feedback dei burst respiratori di neutrofili/macrofagi, e l'omeostasi del calcio [70]. I cambiamenti dei livelli di Taurina nei fluidi biologici sono in stretto rapporto con l'insorgenza di numerose patologie, quali malattie cardiovascolari e diabete mellito [55]. La via metabolica primaria per la sintesi di taurina nei mammiferi avviene nel fegato nella via dell'acido sulfonico della cisteina. In questa via, il gruppo sulfidrilico della Cys è all'inizio ossidato a cisteina-acido sulfonico dall'enzima cisteina deossigenasi. La cisteina acido sulfonico, in seguito, è decarbossilata dalla cisteina-acido sulfonico 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:

1. Per molti animali/metazoi, la taurina è tra i principali osmoliti intracellulari ed è quindi un contributo importante alla regolazione del volume cellulare [71].

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 potrebbe prevenire l'insorgenza del diabete mellito nei topi NOD e modificare le curve da carico di glucosio negli adulti [72]. La taurina come antiossidante ha proprietà epatoprotettive [73, 74] e neuroprotettive, 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 stabilizzare delle membrane [75, 76]. 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 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. Uno studio dimostra che i CO diminuiscono i livelli di dimetilarginina simmetrica (SDMA) e dimetilarginina asimmetrica (ADMA) [5] un indice di disfunzione endoteliale.

L' 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 [77]. 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 [78]. 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 [79]. Un'esposizione a lungo termine all'ADMA può causare aterogenesi, ipertensione con danno ai reni e insufficienza cardiaca [80, 81]. Pertanto può essere considerato come un marker predittivo di disfunzione endoteliale in caso di ipercolesterolemia [80], ipertensione, diabete di tipo 2, insulino-resistenza, iperomocisteinemia [82, 83], aterosclerosi, insufficienza renale [84].

## MATERIALI E METODI

Lo studio ha coinvolto 125 donne volontarie sane, di razza caucasica, con cicli mestruali regolari (28 giorni), con un'età media di 27 anni (range 18-39 anni). Per ogni soggetto reclutato è stato calcolato l'indice di massa corporea (BMI) come peso in Kg diviso il quadrato dell'altezza (espressa in metri). Effettuando un'analisi sulle varie informazioni reperite dal questionario compilato dopo ogni prelievo risulta inoltre che la popolazione è omogenea per il livello di istruzione (diploma di scuola superiore). Sono stati esclusi soggetti con patologie renali, epatiche, cardiache, soggetti che fanno uso di farmaci che modificano il metabolismo lipidico ed energetico e di farmaci anoressizzanti ad eccezione dei CO. Sono state ammesse soggetti con valori di colesterolemia inferiori a 250mg/ml e di trigliceridemia inferiori a 200 mg/ml. Le donne sono state esaminate nella fase follicolare del ciclo mestruale e sono state divise in due gruppi in base all'assunzione o meno di CO. Particolare attenzione è stata rivolta alle donne che fanno uso di contraccettivi orali; è stato chiesto loro di indicare il nome commerciale della pillola e il tempo di assunzione. La popolazione facente uso di CO è risultata seguire il trattamento da più di tre mesi. Si è poi proceduto ad una dettagliata classificazione dei CO contenenti etinilestradiolo (15-30 mg) e progestinico sintetico classificati secondo le loro proprietà androgeniche e antiandrogeniche. In particolare gestodene, desogestrel, levonorgestrel hanno un'attività androgenica, mentre, drospirenone, clormadinone non hanno attività androgenica. [1]. La popolazione è stata suddivisa in donne che non fanno uso di contraccettivi orali (Fs) e donne che ne fanno uso (FOCs). In particolare, quest'ultima, è stata ulteriormente stratificata in base al tipo di progestinico androgenico (FOCA+) e antiandrogenico (FOCA-). Questo protocollo di studio è stato approvato dal comitato etico locale. Tutte le partecipanti hanno dato il consenso per l'utilizzo dei dati personali.

## **Esami biochimici ed ematologici**

Le valutazioni di laboratorio sono state condotte su campioni di sangue venoso prelevato tra le ore 8.00 e le ore 10.00 del mattino, a digiuno, su donne nella fase follicolare del loro ciclo mestruale (1-10 giorni), per valutare se la popolazione in esame rispondesse ai criteri di inclusione.

Il sangue è stato riposto in apposite provette contenenti un adeguato anticoagulante.

Le aliquote di plasma sono state utilizzate immediatamente per la misurazione della glicemia a digiuno, colesterolo totale, lipoproteine a bassa densità (LDL), lipoproteine ad alta densità (HDL), trigliceridi (TG), creatinina, acido urico, urea, bilirubina totale, aspartato aminotransferasi (AST), alanina aminotransferasi (ALT), gamma glutamil transpeptidasi (GGT), fosfatasi alcalina, calcio, sodio, potassio, sideremia, ferritina, proteina C reattiva (CRP), tempo di protrombina (PT), transferrina (TIBC) e % di saturazione, utilizzando procedure standard di laboratorio.

Aliquote di sangue intero sono state utilizzate per misurare i globuli rossi (RBC), la formula leucocitaria, il conteggio piastrinico (PLT), l'emoglobina (Hb) e il volume corpuscolare medio (MCV), utilizzando procedure standard di laboratorio.

## **Esami parametri ormonali**

Aliquote di siero sono state preparate per la determinazione degli ormoni, in particolare il cortisolo (Cortisol RIA CT, Chematil S.r.L., Angri, Italy), la tireotropina TSH (VITROS TSH, Ortho- Clinical Diagnostics Johnson & Johnson, Roma, Italy), l'estradiolo E2 (Estradiol MAIA, Adaltis Italia S.p.A., Bologna, Italy) e il testosterone (Testosterone RIA CT, RADIM S.p.A, Pomezia, Italy) sono stati misurati mediante un test RIA commerciale, mentre, l'ormone luteinizzante LH (LH IRMA kit, Immunotech a.s., Milano, Italy) e l'ormone follicolo stimolante FSH (FSH IRMA kit, Immunotech a.s., Milano, Italy) sono stati misurati mediante un

test IRMA commerciale. I coefficienti di variazione erano inferiori de 2,5%.

## **Tioli plasmatici**

L'omocisteina (Hcy), il glutatione (GSH), cisteinglicina (Cys-Gly), cisteina (Cys), e la glucilcisteina (Glu-Cys), sono aminotioli plasmatici e la loro quantificazione nei fluidi biologici è importante in quanto diversi studi clinici dimostrano che un loro aumento è associato a patologie quali l'aterosclerosi precoce e malattie cardiovascolari [85]. Esistono numerosi metodi per la loro determinazione, in particolare noi abbiamo utilizzato un metodo alternativo (CE-LIF) con fluorescenza indotta da laser il cui vantaggio è dovuto alla semplicità nell'uso della strumentazione, la rapidità e l'efficienza di separazione, l'uso di campioni di piccolo volume (1-10 nL) [86].

I campioni di sangue sono stati raccolti mediante prelievo venoso in provette contenenti anticoagulante (EDTA) e processati immediatamente. Il plasma è stato ottenuto per centrifugazione a 3000xg per 10 minuti a 4°C, e conservato a -80°C e l'analisi è stata effettuata entro un mese. Per l'analisi dei tioli plasmatici sono stati mescolati 100 µL di standard o di plasma con 10 µL di TBI (10%), agitati per 30 secondi e successivamente incubati a 4°C per 10 minuti. Al termine dell'incubazione sono stati aggiunti 100 µL di TCA al 10%, agitati per 10 secondi e poi centrifugato per 10 minuti a 3000xg. 100 µL di surnatante sono stati mescolati con 100 µL di Na<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> 300 mM/L a pH 12.5 e con 25 µL di 5-IAF (4.1 mM/L), e successivamente incubato a temperatura ambiente per 10 minuti. Il mix è stato diluito 1/100 prima di effettuare un elettroforesi capillare con rivelatore a fluorescenza indotto da laser [86].

Il P/ACE 5.510 CE con sistema laser 488 nm è stato utilizzato (Beckman Instruments, Palo Alto, CA, USA).

Il sistema è stato dotato di un alimentatore a 30 KV con corrente limite di 250 A. La dimensione del capillare in silice fusa non rivestito è di 75 µm ID e 57 cm di lunghezza (50 cm alla finestra di rivelazione). L'analisi è stata effettuata utilizzando 14 nL di campione sotto pressione di azoto (0.5 psi) per 2 secondi con 5 mmol/L di fosfato di sodio, 4 mmol/L di acido borico come soluzione elettrolitica con 75 mmol/L di N-methyl-D-glucamine a pH 11. Le condizioni di separazione (28 KV, 70A a polarità normale) sono state raggiunte in 30 secondi mantenendo una tensione costante per 5 minuti.

La separazione è stata effettuata a 40°C [86].

## **Taurina**

Il nostro interesse nel quantificare i livelli di taurina quale inibitore endogeno dell'acido ipocloroso, è dovuto al ruolo antiossidante che essa ricopre, alla sua capacità di scavenging dei ROS, alla riduzione della produzione dei prodotti finali della perossidazione lipidica e alla stabilizzazione delle membrane [75, 76].

I campioni di sangue sono stati raccolti mediante prelievo venoso in provette contenenti EDTA e centrifugato a 3000xg per 5 minuti a 4°C. Il plasma ottenuto (50 µl) è stato addizionato a 50 µl di acido omocisteico (200 mmol/L); 100 µl di TCA al 10% è stato aggiunto per precipitare le proteine. Dopo centrifugazione a 3000xg per 5 minuti 10 µl il surnatante è stato addizionato con 90 µl (100mmol/L) di Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> a pH 9.5 e 11 µl 15 mmol/L) di FITC. Dopo 20 minuti di incubazione a 100°C i campioni sono stati diluiti di 100 volte. L'analisi elettroforetica è stata eseguita utilizzando un capillare di silice fusa 75 µm ID e 60.2 cm di lunghezza (40 cm alla finestra di rivelazione). La separazione è stata effettuata in un tampone fosfato di sodio tribasico 50 mmol/L a pH 11.8, 23°C a una polarità normale di 22 KV [87].

## **MDA**

Poiché variazioni dello stato redox sono implicate in molte patologie tra cui le malattie cardiovascolari e il diabete mellito, abbiamo deciso di valutare i livelli plasmatici della malonildialdeide (MDA) quale indice di perossidazione lipidica.

La misurazione della TBARS (tiobarbiturico Acid Reactive Substances) è un test di scelta per lo screening e il monitoraggio della perossidazione lipidica. Il plasma ottenuto (200 µl) è stato mescolato con 200 ml di acido acetico diluito (1:3 in H<sub>2</sub>O). A questa miscela sono stati aggiunti 150 ml di sodio dodecilsolfato al 10% (SDS) per precipitare facilmente le proteine e 200 ml di Tris-HCl 50 mM. Questa soluzione è stata tenuta in incubazione per 10 minuti a temperatura ambiente (RT) e poi sono stati aggiunti 500 microlitri di una soluzione di acido tiobarbiturico (0,75% in acido acetico diluito in NaOH 1N (1:1)). La miscela è stata bollita per 60 minuti, raffreddata in ghiaccio (10 ') Successivamente abbiamo aggiunto 400 ml di acido acetico (1:3), quindi si centrifuga a 4 ° C alla massima velocità per 20' La quantificazione è stata effettuata misurando spettrofotometricamente l'assorbanza a 532 nm. [88].

## **Arginina-ADMA-SDMA**

La misurazione dell'arginina e dei suoi derivati nei campioni biologici possono ampliare le nostre conoscenze sul ruolo di questi composti nei meccanismi fisiopatologici coinvolti nell'aterosclerosi. Attualmente i metodi analitici per la determinazione della concentrazione plasmatica di arginina, Dimetil-L-Arginina Asimetrica (ADMA) e Dimetil-L-Arginina-Simmetrica (SDMA) sono effettuate attraverso tecniche di HPLC.

Arginina, ADMA e SDMA sono stati preparati sciogliendo accuratamente i composti in 10 mM di HCL. Come descritto da Teerlink [89], queste soluzioni stock sono stabili a 4°C per più di un anno.

Le concentrazioni finali sono state 200 mmol/L per l'arginina e 2 mmol/L per ADMA e SDMA conservate a -20°C.

I campioni di sangue sono stati raccolti mediante prelievo venoso in provette contenenti EDTA e centrifugato a 3000xg per 5 minuti a 4°C. Il plasma ottenuto (400 µL) è stato mescolato con 50 µL di IS homoarginina (50 mmol/L concentrazione finale). ACN/ammoniaca (900 µL, 90:10) è stata aggiunta per far precipitare le proteine.

Dopo centrifugazione a 3000xg per 5 minuti il surnatante è stato fatto evaporare sottovuoto e il residuo è stato ridisciolti con 500 µL di acqua filtrata in vivaspin 500. Mediante centrifugazione a 3000xg per 20 minuti sono stati rimossi ulteriori residui di proteine. I campioni sono stati filtrati ed evaporati nel vuoto e il residuo è stato disciolto in 50 mL di acqua. Il campione è stato fatto correre in elettroforesi capillare. L'analisi è stata eseguita con un capillare in silice fusa, 75 µm ID e 60.2 cm di lunghezza (50 cm alla finestra di rivelazione). La separazione è stata effettuata in tris buffer 50 mmol/L titolato con acido fosforico 1 mmol/L a pH 2.30, 15°C a una polarità normale di 15 KV [86].

## **Metilazione del DNA**

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

L'estrazione del DNA genomico è stata eseguita mediante il kit "QIampDNA blood mini" seguendo il protocollo fornito dalla ditta produttrice. Il DNA estratto è stato esaminato mediante assorbimento UV a lunghezze d'onda comprese tra 260 e 260/280 nm per valutarne rispettivamente concentrazione e purezza. Un rapporto di densità ottica (260/280) tra 1.7 e 1.9 è stato considerato indicativo di accettabile purezza. Il DNA purificato è stato poi conservato in tampone di eluizione a 20°C

fino all'idrolisi. La precipitazione del DNA è stata eseguita aggiungendo a 200 µl di eluato un ugual volume di 2-isopropanolo freddo. Dopo un lavaggio con etanolo freddo al 70%, il pellet puro è stato risospeso in 100 µl di Acido formico al 90% ed incubato per 80 minuti a 130° C. I campioni sono stati portati a secchezza sottovuoto a 60°C e il residuo secco, contenente le basi libere del DNA, è stato disciolto in 50 µl di acqua ultrapura. La separazione delle basi del DNA è stata eseguita mediante elettroforesi capillare con un sistema Pace MDQ dotato di un detector a serie di diodi settato a 280 nm.

Il tampone di separazione usato è costituito da un tampone Tris fosfato 100 mM a pH 3,75. La curva di calibrazione è stata ottenuta riportando l'area corretta (area del picco diviso tempo di migrazione) verso la concentrazione delle soluzioni standard dei nucleotidi (in un range da 0,25 a 200 mmol/l). Le concentrazioni della citosina (C) e della metilcitosina (mC), nei campioni e nei controlli, sono state calcolate mediante l'analisi delle rette di calibrazione attraverso la seguente formula:

$$mC/tC = \mu\text{mol } mC / \mu\text{mol } mC + \mu\text{mol } C \times 100.$$

## **Isolamento dei monociti**

In questo studio abbiamo focalizzato la nostra attenzione sui macrofagi derivanti dai monociti plasmatici (MDMs) poiché essi hanno un ruolo cruciale nell'aterosclerosi e nell'immunità [90].

Una parte del sangue, raccolta dai donatori sani, è stata, infatti, utilizzata per ottenere macrofagi derivati dai monociti come descritto in [91].

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 su 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 di 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/cm<sup>2</sup>. I leucociti sono stati mantenuti in incubatore a 37° C e 5% CO<sub>2</sub>.

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 per valutare sé la popolazione macrofagica in esame fosse in accordo con quanto descritto in [92], attraverso l'espressione del CD14 e l'uptake di LDL acetilate (Dil Ac-LDL).

### Espressione di CD14

L'espressione del CD14 è stata valutata nei primi tre giorni di coltura. Dopo l'isolamento, le cellule sono state seminate in una piastra da 48 pozzetti.

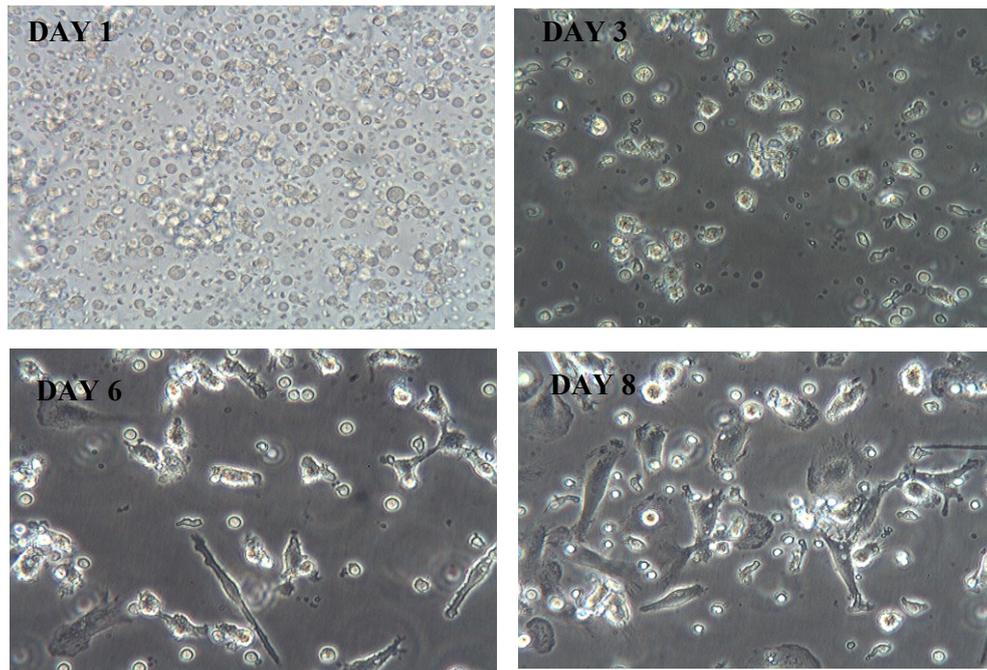
Dopo aver eliminato il terreno di coltura è stato eseguito un lavaggio con PBS le cellule sono state fissate con paraformaldeide (PFA) al 4% per 5 minuti a RT, lavate con PBS, trattate con metanolo per 1 minuto a RT, lavate con PBS e incubate per 10 minuti a RT con blocking solution (BS) costituita da 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-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

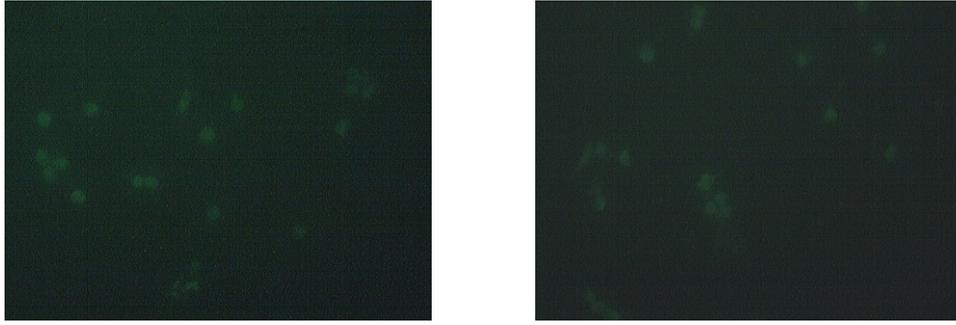
Per valutare l'uptake di Ac-LDL le cellule sono state incubate per 3 h a 37° con Dil Ac-LDL. Dopo lavaggio con PBS le cellule sono state fissate con PFA 4% per 10 minuti a RT, lavate con PBS e incubate per 4 minuti a RT, al buio con DAPI 0,5 mg/ml. Entrambe le colorazioni sono state quindi osservate e fotografate al microscopio munito di lampada a fluorescenza con ingrandimento 40x.

La figura 4 mostra i cambiamenti morfologici che i monociti in coltura subiscono nella loro trasformazione in macrofagi.

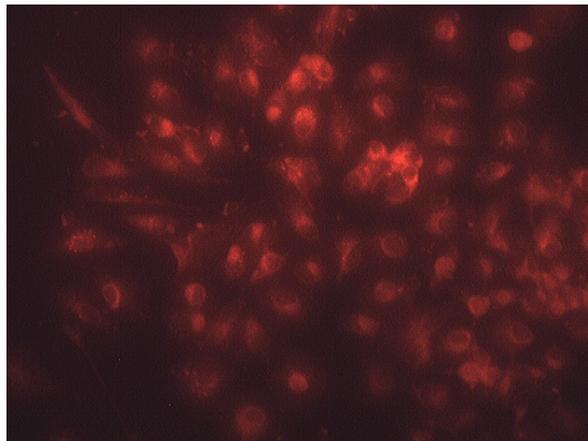
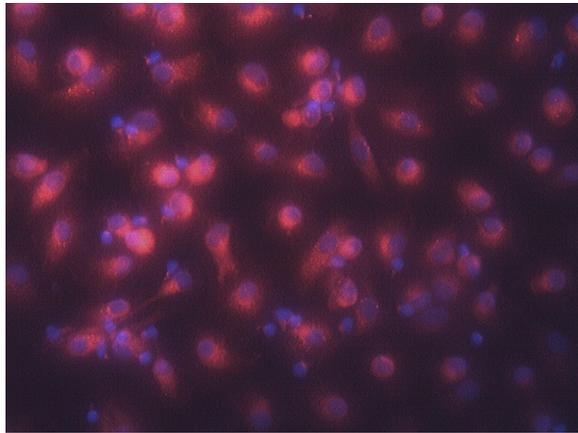
La trasformazione dei monociti in macrofagi è stata evidenziata anche biochimicamente, mediante lo studio dell' uptake delle Ac-LDL che avviene solo nei macrofagi differenziati in cui si ha la scomparsa del recettore CD14 che diminuisce via via che procede la trasformazione (Fig 5 e 6)



**Figura 4. Trasformazione dei monociti in macrofagi nei diversi giorni di coltura**



**Figura 5. Espressione del CD14.**



**Figura 6. Uptake delle Ac-LDL.**

## **Espressione e attivazione di ER $\alpha$ , ER $\beta$ e AR in MDMs derivati da differenti popolazioni femminili.**

Un aliquota di MDMs è stata seminata in una piastra 6 well. È stato effettuato per due volte un lavaggio con PBS freddo seguito da un raschiamento dei pozzetti con tampone di lisi (Tris HCL – vedi formula). Il lisato è stato centrifugato (13.000xg; 10 minuti; 4°C). Il surnatante ottenuto è stato raccolto e conservato a -80°C; mediante Western Blot è stata effettuata un'analisi per valutare i livelli ER $\alpha$ , ER $\beta$  e AR [93]. Lo stato di attivazione di ERs è stato valutato analizzando la fosforilazione di Ser118 per ER $\alpha$  e la fosforilazione di p38 per ER $\beta$  [18].

La determinazione della concentrazione proteica è stata effettuata attraverso un kit per il dosaggio delle proteine BCA Pierce kit (Thermo Scientific). Inoltre, una curva standard di proteine ricombinanti hanno dimostrato che l'intensità della banda era proporzionale alla quantità di proteine. La reazione con l'anticorpo è stata visualizzata in chemiluminescenza attraverso un reagente di rivelazione per Western blotting. L'analisi densitometrica è stata eseguita con Images software per Windows.

## **Dosaggio di TNF-alfa**

Per analizzare la risposta infiammatoria dei macrofagi è stato misurato il rilascio di TNF-alfa sia in condizioni basali che dopo 24 h di stimolazione con LPS (100ng/ml) utilizzando un kit commerciale per dosaggio ELISA.

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. È pertanto in grado di interagire con i recettori CD14 dei monociti-macrofagi, determinando l'attivazione di questi tipi cellulari.

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-alfa) 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 temperatura ambiente (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 RT. Dopo i lavaggi è stato aggiunto Detection Antibody (biotinylated goat anti-human TNF-alfa) 250 ng/ml ad ogni pozzetto e incubato per 2h a RT. 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 (H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 2N) ed è stata effettuata la lettura a 450 nm e 550 nm come lunghezza d'onda di riferimento con un lettore di micropiastre.

## **Analisi statistica**

I dati sono stati espressi come media  $\pm$  deviazione standard se presentavano una distribuzione normale; in caso contrario sono stati riportati i valori delle mediane e del range. E' stato considerato significativo un valore di  $P < 0.05$ .

L'analisi statistica dei dati è stata effettuata confrontando Fs verso FOCs, e FOCA+ verso FOCA-, ed i controlli verso gli stimolati, attraverso il test t di Student. L'analisi statistica per il confronto fra le donne non trattate e i due sottogruppi di donne stratificate sulla base dell'attività del progestinico è stata effettuata tramite il test One Way Anova.

## RISULTATI

### Dati demografici delle popolazioni studiate.

Nel nostro studio abbiamo reclutato donne che utilizzano CO (FOCs) e donne che non li utilizzano (Fs) risultanti omogenee per indice di massa corporea (BMI) ed età, e questo dato viene mantenuto costante anche dopo stratificazione della popolazione in base al tipo di progestinico, androgenico (FOCA+) e antiandrogenico (FOCA-) (tabella 1). Come possiamo osservare dalla tabella 1, le donne che usano CO fumano meno rispetto alle Fs e hanno un livello di scolarizzazione maggiore fino alle scuole medie superiori, mentre le Fs si laureano di più rispetto alle FOCs.

	<b>Fs (n=68)</b>	<b>FOCs (n=57)</b>	<b>FOCA+ (n=27)</b>	<b>FOCA- (n=30)</b>
Età	27 (24-31) (n=68)	27 (24.7-31) (n=57)	28 (24-30.75) (n=27)	26.5 (25-31) (n=30)
BMI	20.98±3.00 (n=68)	21.46±2.28 (n=57)	21.68±2.02 (n=27)	21.27±2.52 (n=30)
Fumatrici	40% (n=27)	28% (n=16)	22% (n=6)	33% (n=10)
Non Fumatrici	60% (n=41)	72% (n=41)	78% (n=21)	67% (n=20)
Scuola media	12% (n=6)	7% (n=3)	6% (n=2)	4% (n=1)
Scuola superiore	63% (n=30)	81% (n=34)	72% (n=13)	92% (n=21)
Laurea	25% (n=12)	12% (n=5)	22% (n=4)	4% (n=1)

**Tabella 1. Dati demografici delle popolazioni studiate.** I dati sono espressi come media ± deviazione standard, mediana e range, %. n indica il numero di soggetti utilizzati per calcolare i dati statistici.

## Valutazione degli effetti dei CO nei parametri biochimici ed ematologici.

FOCs mostrano livelli maggiori di transferrina o capacità totale legante il ferro (TIBC) e di un indice flogistico come la proteina C reattiva (CRP) della Fs. Questi valori rimangono significativi anche in seguito a correzione per BMI.

Si osserva anche un aumento dei trigliceridi (TG) in seguito a trattamento con CO, tale aumento risulta essere positivo anche in seguito alla correzione con il peso corporeo (tabella 2).

Mentre, l'aumento di colesterolo totale e di HDL scompare quando i valori vengono corretti per il BMI. La bilirubina totale è significativamente maggiore nelle Fs anche in seguito a correzione per BMI (tabella 2), mentre il tempo di protrombina (PT) diminuisce significativamente nelle FOCs rispetto alle Fs. (tabella 2). Quando le FOCs sono state stratificate in base alla funzione androgenica (FOCA+) e antiandrogenica (FOCA-) del progestinico sono emerse delle differenze significative. Tali differenze riguardano la calcemia, le HDL e la glicemia a digiuno che aumentano nelle FOCA- , ma solo l'aumento della glicemia a digiuno rimane significativamente maggiori in FOCA- che in FOCA+ dopo la correzione per il BMI. Infine, il PT è maggiore in FOCA+ (tabella 3). I TG sono maggiori in FOCA- anche se questa differenza non è statisticamente significativa. Ciò indica che questi parametri sono influenzati dalle proprietà androgeniche del progestinico (tabella 3).

PARAMETRI	Fs (n=68)	FOCs (n=57)	Power
Sideremia (ug/l)	84.58±35.68 (n=64)	95.11±44.51 (n=53)	0.158
Sideremia (ug/l)/BMI	3.87 (2.59-5.57) (n=64)	4.44 (2.85-5.32) (n=53)	
TIBC (ug/dl)	363.35±69.8 (n=52)	449.29±81.3** (n=45)	1.000
TIBC (ug/dl)/BMI	17.51±4 (n=52)	21.22±3.9** (n=45)	0.997

<b>Saturazione (%)</b>	23.78±9.96 (n=53)	22.31±10.70 (n=45)	0.050
<b>Saturazione (%)/BMI</b>	1.18±0.53 (n=53)	1.06±0.54 (n=45)	0.062
<b>Ferritina (ng/ml)</b>	36.5 (18.50-54.50) (n=64)	39 (20-63) (n=48)	
<b>Ferritina (ng/ml)/BMI</b>	1.79 (0.83-2.42) (n=64)	1.78 (1.05-2.94) (n=48)	
<b>Colesterolo Totale (mg/dl)</b>	183.34±27.93 (n=68)	198.91±34.39* (n=57)	0.745
<b>Colesterolo Totale (mg/dl)/BMI</b>	8.86±1.53 (n=68)	9.38±1.96 (n=57)	0.248
<b>Colesterolo HDL (mg/dl)</b>	61.79±11.1 (n=68)	68.72±13.9* (n=57)	0.845
<b>Colesterolo HDL (mg/dl)/BMI</b>	3±0.65 (n=68)	3.24±0.76 (n=57)	0.347
<b>Colesterolo LDL(mg/dl)</b>	107 (89.25-124) (n=67)	108 (92.75-123.50) (n=53)	
<b>Colesterolo LDL(mg/dl)/BMI</b>	5.16±1.13 (n=67)	5.28±1.70 (n=53)	0.050
<b>HDL/LDL</b>	0.58 (0.48-0.73) (n=68)	0.64 (0.51-0.80) (n=53)	
<b>HDL/LDL/(BMI)</b>	0.029 (0.02-0.03) (n=68)	0.03 (0.02-0.04) (n=53)	
<b>Trigliceridi (mg/dl)</b>	67.5 (53.50-79.50) (n=68)	90.5 (73.50-113.50)** (n=56)	
<b>Trigliceridi (mg/dl)/BMI</b>	3.25 (2.70-3.89) (n=68)	4.15 (3.30-5.86)** (n=56)	
<b>Glicemia (mg/dl)</b>	78 (73-81.50) (n=68)	77 (73-84.25) (n=57)	
<b>Glicemia (mg/dl)/BMI</b>	3.77 (3.19-4.18) (n=68)	3.64 (3.34-3.95) (n=57)	
<b>Creatinina (mg/ml)</b>	0.7 (0.66-0.75) (n=68)	0.72 (0.68-0.76) (n=57)	
<b>Creatinina (mg/ml)/BMI</b>	0.0344±0.00535 (n=68)	0.0343±0.00442 (n=57)	0.050
<b>Acido Urico (mg/dl)</b>	3.65±0.97 (n=68)	3.42±0.81 (n=57)	0.173
<b>Acido Urico (mg/dl)/BMI</b>	0.17 (0.14-0.21) (n=68)	0.16 (0.14-0.18) (n=57)	
<b>Urea (mg/dl)</b>	27.3 (22.60-32.1) (n=68)	28.4 (22.75-32.12) (n=57)	
<b>Urea (mg/dl)/BMI</b>	1.3 (1.07-1.61) (n=68)	1.32 (1.12-1.48) (n=57)	
<b>Bilirubina Totale (mg/dl)</b>	0.52 (0.40-0.73) (n=68)	0.4 (0.29-0.55)** (n=57)	
<b>Bilirubina Totale (mg/dl)/BMI</b>	0.026 (0.018-0.038) (n=68)	0.019 (0.013-0.026)** (n=57)	
<b>Fosfatasi alcalina (U/L)</b>	56.5 (48.50-66.50) (n=68)	55 (46-63) (n=57)	
<b>Fosfatasi alcalina (U/L)/BMI</b>	2.86 (2.28-3.17) (n=68)	2.62 (2.17-2.95) (n=57)	

<b>Aspartato aminotransferasi (U/L)</b>	19.79±5.18 (n=68)	19.02±4.11 (n=57)	0.050
<b>Aspartato aminotransferasi (U/L)/BMI</b>	0.96±0.29 (n=68)	0.89±0.21 (n=57)	0.166
<b>Alanina aminotransferasi (U/L)</b>	17 (14.50-22) (n=68)	16 (11.75-20.25) (n=57)	
<b>Alanina aminotransferasi (U/L)/BMI</b>	0.86 (0.65-1) (n=68)	0.74 (0.55-0.97) (n=57)	
<b>Gamma glutamil transpeptidasi (U/L)</b>	15.22±5.18 (n=68)	14.40±5.42 (n=55)	0.050
<b>Gamma glutamil transpeptidasi (U/L)/BMI</b>	0.71 (0.55-0.88) (n=68)	0.63 (0.50-0.79) (n=57)	
<b>Calcemia (mg/dl)</b>	9.49±0.37 (n=64)	9.37±0.37 (n=57)	0.297
<b>Calcemia (mg/dl)/BMI</b>	0.46 (0.41-0.52) (n=64)	0.44 (0.40-0.47) (n=57)	
<b>Natremia (mEq/L)</b>	140 (139-141) (n=68)	140 (138.75-142) (n=57)	
<b>Natremia (mEq/L)/BMI</b>	6.81 (6.16-7.62) (n=68)	6.62 (6.12-7.12) (n=57)	
<b>Potassaemia (mEq/L)</b>	4.1 (3.9-4.25) (n=68)	4.2 (3.97-4.40) (n=57)	
<b>Potassaemia (mEq/L)/BMI</b>	0.20±0.028 (n=68)	0.20±0.024 (n=57)	0.050
<b>CRP (mg/dl)</b>	0.10 (0.10-0.30) (n=66)	0.30 (0.20-0.47)** (n=50)	
<b>CRP (mg/dl)/BMI</b>	0.00587 (0.0045-0.012) (n=66)	0.0125 (0.0087-0.0022)** (n=50)	
<b>Tempo di protrombina (sec)</b>	10.8 (10.50-11.10) (n=54)	10.4 (10.20-10.60)** (n=48)	
<b>Tempo di protrombina (sec)/BMI</b>	0.52 (0.47-0.58) (n=68)	0.49 (0.45-0.53) (n=57)	

**Tabella 2. Valutazione degli effetti dei CO nei parametri biochimici.** I dati sono espressi come media ± deviazione standard, mediana e range. \* e \*\* indicano rispettivamente P< di 0.05 e P<0.001. n indica il numero di soggetti utilizzati per calcolare i dati statistici. Il power indica il potere statistico del test quando valutato come media ± deviazione standard.

<b>PARAMETRI</b>	<b>FOCA+ (n=27)</b>	<b>FOCA- (n=30)</b>	<b>Power</b>
<b>Sideremia (ug/dl)</b>	104.88±49.69 (n=27)	86.39±38.13 (n=30)	0.192
<b>Sideremia (ug/dl)/BMI</b>	4.62 (3.40-6) (n=27)	3.89 (2.83-4.76) (n=30)	
<b>TIBC (mg/dl)</b>	443.62±76.28 (n=21)	454.25±86.79 (n=24)	0.050
<b>TIBC (mg/dl)/BMI</b>	20.94±4.47 (n=21)	21.47±3.61 (n=24)	0.050

<b>Saturazione (%)</b>	25.48±10.63 (n=21)	19.53±10.17 (n=24)	0.342
<b>Saturazione (%)/BMI</b>	1.20±0.53 (n=21)	0.94±0.54 (n=24)	0.224
<b>Ferritina (ng/ml)</b>	36.38±29.15 (n=21)	49.61±28.84 (n=27)	0.206
<b>Ferritina (ng/ml)/BMI</b>	1.65±1.23 (n=21)	2.35± 1.43 (n=27)	0.288
<b>Colesterolo Totale (mg/dl)</b>	198.48±34.83 (n=27)	199.30±34.58 (n=30)	0.050
<b>Colesterolo Totale (mg/dl)/BMI</b>	8.77 (7.77-10.13) (n=27)	9.25 (8.64-10.30) (n=30)	
<b>Colesterolo HDL (mg/dl)</b>	65.00±11.77 (n=27)	72.07±14.98 (n=30)	0.367
<b>Colesterolo HDL (mg/dl)/BMI</b>	3.02±0.62 (n=27)	3.43±0.83* (n=30)	0.424
<b>Colesterolo LDL (mg/dl)</b>	112 (95.50-131.50) (n=24)	105 (86-119.25) (n=29)	
<b>Colesterolo LDL (mg/dl)/BMI</b>	5.46±1.75 (n=24)	5.12±1.66 (n=29)	0.050
<b>HDL/LDL</b>	0.61 (0.49-0.73) (n=27)	0.65 (0.59-0.85) (n=30)	
<b>HDL/LDL/(BMI)</b>	0.03 (0.021-0.034) (n=27)	0.031 (0.025-0.042) (n=30)	
<b>Trigliceridi (mg/dl)</b>	90.27±31.55 (n=26)	105.10±38.44 (n=30)	0.204
<b>Trigliceridi (mg/dl)/BMI</b>	3.69 (3.12-5) (n=27)	4.22 (3.41-5.90) (n=30)	
<b>Glicemia (mg/dl)</b>	75.67±8.79 (n=27)	80.50±6.81* (n=30)	0.537
<b>Glicemia (mg/dl)/BMI</b>	3.52±0.53 (n=27)	3.83±0.50* (n=30)	0.501
<b>Creatinina (mg/ml)</b>	0.72 (0.69-0.80) (n=27)	0.72 (0.67-0.74) (n=30)	
<b>Creatinina (mg/ml)/BMI</b>	0.034±0.0044 (n=27)	0.034±0.0045 (n=30)	0.050
<b>Acido Urico (mg/dl)</b>	3.29±0.93 (n=27)	3.53±0.68 (n=30)	0.068
<b>Acido Urico (mg/dl)/BMI</b>	0.17 (0.12-0.17) (n=27)	0.16 (0.15-0.19) (n=30)	
<b>Urea (mg/dl)</b>	28.23±7.54 (n=27)	28.67±7.40 (n=30)	0.050
<b>Urea (mg/dl)/BMI</b>	1.30±0.30 (n=27)	1.36±0.33 (n=30)	0.050
<b>Bilirubina Totale (mg/dl)</b>	0.42 (0.34-0.59) (n=27)	0.39 (0.25-0.50) (n=30)	
<b>Bilirubina Totale (mg/dl)/BMI</b>	0.019 (0.015-0.026) (n=27)	0.019 (0.011-0.025) (n=30)	
<b>Fosfatasi Alcalina (U/L)</b>	53.04±10.63 (n=27)	58.33±15.32 (n=30)	0.183
<b>Fosfatasi Alcalina (U/L)/BMI</b>	2.48±0.60 (n=27)	2.78±0.79 (n=30)	0.222

<b>Aspartato aminotransferasi (U/L)</b>	19.44±4.53 (n=27)	18.63±3.74 (n=30)	0.050
<b>Aspartato aminotransferasi (U/L)/BMI</b>	0.90±0.22 (n=27)	0.89±0.21 (n=30)	0.050
<b>Alanina aminotransferasi (U/L)</b>	15 (13-21.25) (n=27)	16.5 (11-20) (n=30)	
<b>Alanina aminotransferasi (U/L)/BMI</b>	0.82±0.36 (n=27)	0.75±0.28 (n=30)	0.050
<b>Gamma glutamil transpeptidasi (U/L)</b>	15 (12-18) (n=27)	12 (9-15) (n=30)	
<b>Gamma glutamil transpeptidasi (U/L)/BMI</b>	0.68 (0.52-0.79) (n=27)	0.57 (0.47-0.74) (n=30)	
<b>Calcemia (mg/dl)</b>	9.22±0.34 (n=27)	9.51±0.36* (n=30)	0.844
<b>Calcemia (mg/dl)/BMI</b>	0.43±0.044 (n=27)	0.45±0.049 (n=30)	0.333
<b>Natremia (mEq/L)</b>	140.11±2.53 (n=27)	139.80±2.01 (n=30)	0.050
<b>Natremia (mEq/L)/BMI</b>	6.52±0.66 (n=27)	6.65±0.71 (n=30)	0.050
<b>Potassaemia (mEq/L)</b>	4.13±0.30 (n=27)	4.21±0.35 (n=30)	0.051
<b>Potassaemia (mEq/L)/BMI</b>	0.19±0.022 (n=27)	0.20±0.025 (n=30)	0.129
<b>CRP (mg/dl)</b>	0.200 (0.18-0.40) (n=23)	0.3 (0.20-0.49) (n=30)	
<b>CRP (mg/dl)/BMI</b>	0.0095 (0.0081-0.020) (n=27)	0.014 (0.0095-0.023) (n=30)	
<b>PT (sec)</b>	10.5 (10.40-10.80) (n=23)	10.2 (10.10-10.50)* (n=25)	
<b>PT (sec)/BMI</b>	0.49±0.05 (n=23)	0.49±0.06 (n=25)	0.05

**Tabella 3. Valutazione degli effetti dei CO nei parametri biochimici della popolazione femminile stratificata in base al tipo di progestinico presente nell'antifecondativo.** I dati sono espressi come media ± deviazione standard e mediana. \* e \*\* indicano rispettivamente P< di 0.05 e P<0.001. n indica il numero di soggetti utilizzati per calcolare i dati statistici. Il power indica il potere statistico del test quando valutato come media ± deviazione standard.

Dalla valutazione dei parametri ematologici non si riscontrano differenze tra Fs e FOCs (Tabella 4), mentre tra FOCA+ e FOCA- si riscontrano differenze significative nei globuli bianchi - (Tabella 5) che risultano essere ridotti nelle FOCA+.

PARAMETRI	Fs (n=68)	FOCs (n=57)	Power
Globuli rossi (10 <sup>12</sup> /l)	4.80±0.48	4.78±0.50	0.050
Emoglobina (g/dl)	12.55±1.10	12.62±0.93	0.050
Ematocrito (%)	38.33±3.12	38.60±2.74	0.050
Volume corpuscolare medio (fL)	81.95 (77.75-85.80)	82.3 (76.80-86.42)	
Globuli bianchi (10 <sup>9</sup> /l)	6.56±1.61	6.91±1.54	0.106
Neutrofili (10 <sup>9</sup> /l)	3.4 (2.6-4.1)	3.5 (3-4.2)	
Linfociti (10 <sup>9</sup> /l)	2.3 (1.8-2.7)	2.5 (2-3)	
Monociti (10 <sup>9</sup> /l)	0.3 (0.30-0.40)	0.3 (0.30-0.40)	
Eosinofili (10 <sup>9</sup> /l)	0.2 (0.10-0.20)	0.2 (0.10-0.20)	
Basofili (10 <sup>9</sup> /l)	0 (0-0.10)	0 (0-0.10)	
Piastrine (10 <sup>9</sup> /l)	288.97±52.49	397.21±52.57	0.050

**Tabella 4. Valutazione degli effetti dei CO nei parametri ematologici.** I dati sono espressi come media ± deviazione standard, mediana e range. n indica il numero di soggetti utilizzati per calcolare i dati statistici. Il power indica il potere statistico del test quando valutato come media ± deviazione standard.

PARAMETRI	FOCA+ (n=27)	FOCA- (n=30)	Power
Globuli rossi (10 <sup>12</sup> /l)	4.84±0.53	4.76±0.44	0.050
Emoglobina g/dl	12.37±0.98	12.84±0.84	0.375
Hematocrito (%)	37.99±2.76	39.14±2.65	0.350
Volume corpuscolare medio (fL)	79.10±7.81	82.62±5.93	0.218
Globuli bianchi (10 <sup>9</sup> /l)	6.49±1.71	7.29±1.29*	0.387
Neutrofili (10 <sup>9</sup> /l)	3.41±0.83	3.85±0.96	0.320
Linfociti (10 <sup>9</sup> /l)	2.39±0.99	2.70±0.69	0.146
Monociti (10 <sup>9</sup> /l)	0.3 (0.30-0.37)	0.3 (0.30-0.40)	
Eosinofili (10 <sup>9</sup> /l)	0.1 (0.10-0.20)	0.2 (0.10-0.20)	
Basofili (10 <sup>9</sup> /l)	0 (0-0.10)	0 (0-0.10)	
Piastrine (10 <sup>9</sup> /l)	291.78±49.15	302.10±55.85	0.050

**Tabella 5. Valutazione degli effetti dei CO nei parametri ematologici nella popolazione femminile stratificata in base al tipo di progestinico presente nell'antifecondativo.** I dati sono espressi come media ± deviazione standard e mediana. \* indica un P= 0.050. n indica il numero di soggetti utilizzati per calcolare i dati statistici. Il power indica il potere statistico del test quando valutato come media ± deviazione standard.

## Valutazione degli effetti dei CO nei parametri ormonali.

Dalla valutazione del profilo ormonale è emerso che FOCs presentano livelli significativamente maggiori di cortisolo rispetto alle Fs, mentre i loro livelli di testosterone sono significativamente inferiori rispetto alle donne non trattate. Come previsto, E2, LH, FSH sono significativamente maggiori nelle Fs, mentre, il livello di TSH non varia significativamente tra le due popolazioni femminili (tabella 6). Non sono emerse differenze significative tra FOCA+ e FOCA- (tabella 7).

PARAMETRI	Fs	FOCs
	204 (76-373) (n=44)	334 (177-585)** (n=32)
<b>Cortisolo (ng/ml)</b>		
	28 (6.6-172) (n=42)	19 (0.9-77)* (n=9)
<b>Estradiolo (pg/ml)</b>		
	50.9 (17.2-91.3) (n=34)	31.1 (13-84)** (n=27)
<b>Testosterone (ng/dl)</b>		
	6.8 (2.6-16.5) (n=44)	2.1 (0.7-6.3)** (n=32)
<b>Ormone luteinizzante (mUI/ml)</b>		
	6.9 (2.8-10.7) (n=44)	4.6 (1.2-20.02)* (n=32)
<b>Ormone follicolo stimolante (mUI/ml)</b>		
	1.9 (0.8-4.7) (n=51)	2.1 (0.7-6.3) (n=49)
<b>Tireotropina (uU/ml)</b>		

**Tabella 6. Valutazione degli effetti dei CO nei parametri ormonali.** I dati sono espressi come mediana e range. \* e \*\* indicano rispettivamente  $P < 0.05$  e  $P < 0.001$ . n indica il numero di soggetti utilizzati per calcolare i dati statistici.

PARAMETRI	FOCA+	FOCA-
	330 (177-464) (n=16)	358 (215-585) (n=16)
<b>Cortisolo (ng/ml)</b>		
	5.5 (0.9-77) (n=4)	12.5 (3.9-56.7) (n=5)
<b>Estradiolo (pg/ml)</b>		
	31.1 (22.1-47.7) (n=13)	29.8 (12.9-84.0) (n=14)
<b>Testosterone (ng/dl)</b>		
	2.2 (0.24-10.4) (n=16)	4.5 (0.2-9.6) (n=16)
<b>Ormone luteinizzante (mUI/ml)</b>		
	4.9 (1.5-8.5) (n=16)	4.4 (1.2-20.2) (n=16)
<b>Ormone follicolo stimolante (mUI/ml)</b>		
	2.2 (0.7-5.7) (n=22)	2.0 (0.8-6.3) (n=27)
<b>Tireotropina (uU/ml)</b>		

**Tabella 7. Valutazione degli effetti dei CO nei parametri ormonali nella popolazione femminile stratificata in base al tipo di progestinico presente nell'antifecondativo.** I dati sono espressi come mediana e range. n indica il numero di soggetti utilizzati per calcolare i dati statistici.

## **Valutazione degli effetti dei CO nella perossidazione lipidica, tioli e taurina.**

Dalla valutazione dello stato redox è emerso che l'uso dei CO determina una diminuzione significativa nei livelli di cisteina e taurina (tabella 8).

La cisteina rimane significativa diversa anche dopo correzione per BMI, mentre non sono emerse differenze significative tra FOCA+ e FOCA-. L'omocisteina, la cisteinglicina, la glucilcisteina ed il glutatione non risultano essere modificate. Anche l'indice della perossidazione lipidica (MDA) indica che a livello plasmatico non ci sono variazioni significative nella lperossidazione dei lipidi plasmatici.

Le proprietà del progestinico non modifica nessuno dei parametri riportati in tabella 8.

	<b>Fs (n=56)</b>	<b>FOCs (n=45)</b>	<b>Power</b>
<b>Malonildialdeide (µM)</b>	3.53±1.33 (n=53)	3.41±1.31 (n=45)	0.050
<b>Malonildialdeide (µM)/BMI</b>	0.17±0.070 (n=53)	0.16±0.059 (n=45)	0.050
<b>Omocisteina (µM)</b>	8.66 (6.83-11.36) (n=56)	7.44 (5.82-10.63) (n=45)	
<b>Omocisteina (µM)/BMI</b>	0.40 (0.31-0.55) (n=56)	0.36 (0.27-0.49) (n=45)	
<b>Cisteina (µM)</b>	196.25 (181.14-235.17) (n=56)	169.67 (147.50-205.17)* (n=45)	
<b>Cisteina (µM)/BMI</b>	10.02±2.42 (n=56)	8.58±2.20* (n=45)	0.834
<b>Cisteinglicina (µM)</b>	19.41±5.40 (n=56)	20.64±6.63 (n=45)	0.050
<b>Cisteinglicina (µM)/BMI</b>	0.86 (0.74-1.21) (n=56)	0.94 (0.73-1.16) (n=45)	
<b>GlucilCisteina (µM)</b>	4.63±1.03 (n=56)	4.57±0.95 (n=45)	0.050
<b>GlucilCisteina (µM)/BMI</b>	0.22±0.06 (n=56)	0.22±0.04 (n=45)	0.050
<b>GSH (µM)</b>	7.79 (6.41-8.96) (n=56)	7.91 (6.67-9.26) (n=45)	
<b>GSH (µM)/BMI</b>	0.38±0.11 (n=56)	0.38±0.11 (n=45)	0.050
<b>Taurina (µM)</b>	59.32 (49.41-84.93) (n=56)	53.54 (40.85-68.86)* (n=45)	
<b>Taurina (µM)/BMI</b>	2.97 (2.20-4.02) (n=56)	2.54 (1.84-3.18) (n=45)	

**Tabella 8. Valutazione degli effetti dei CO nella perossidazione lipidica, tioli e taurina.** I dati sono espressi come media ± deviazione standard, mediana e range. \* indica rispettivamente un P< di 0.05. n indica il numero di soggetti utilizzati per calcolare i dati statistici. Il power indica il potere statistico del test quando valutato come media ± deviazione standard.

### **Valutazione degli effetti dei CO sulla metilazione del DNA e sulle arginine metilate.**

Visto l'importanza dei processi della metilazione siamo andati a studiarla a livello del DNA e delle arginine. In particolare, FOCs presentano livelli plasmatici di Arginina, ADMA, ADMA/SDMA, significativamente inferiori rispetto alle Fs come già descritto in precedenza in una popolazione finnica [5], e tali differenze permangono anche dopo correzione per BMI (tabella 9). Il rapporto ADMA/Arginina è significativamente superiore nelle FOCs rispetto a Fs solo prima della correzione per BMI. Non si riscontrano differenze in SDMA (tabella 9). La metilazione globale del DNA risulta essere ridotta nelle donne che assumano contraccettivi orali (tabella 9) anche dopo correzione per numero di globuli bianchi. I parametri riportati non sono sensibili all'attività androgenica del progestinico.

	<b>Fs (n=56)</b>	<b>FOCs (n=45)</b>	<b>Power</b>
<b>Arginina (µM)</b>	79.71 (72.52-90.53) (n=56)	57.65 (47.88-67.74)** (n=45)	
<b>Arginina (µM)/BMI</b>	3.96±0.93 (n=56)	2.76±0.72** (n=45)	1.000
<b>ADMA (µM)</b>	0.55±0.11 (n=56)	0.45±0.12** (n=45)	0.987
<b>ADMA (µM)/BMI</b>	0.024(0.02-0.031) (n=56)	0.020(0.016-0.026)** (n=45)	
<b>SDMA (µM)</b>	0.4 (0.37-0.49) (n=56)	0.42 (0.35-0.49) (n=45)	
<b>SDMA (µM)/BMI</b>	0.02±0.006 (n=56)	0.02±0.005 (n=45)	0.050
<b>ADMA/SDMA</b>	1.28 (1.12-1.56) (n=56)	1.03 (0.84-1.24)** (n=45)	
<b>ADMA/SDMA/(BMI)</b>	0.061 (0.051-0.077) (n=56)	0.047(0.039-0.064)** (n=45)	
<b>ADMA/Arginina</b>	0.007 (0.0058-0.0076) (n=56)	0.0075 (0.0064-0.0098)* (n=45)	
<b>ADMA/Arginina/(BMI)</b>	0.000317 (0.000276-0.000364) (n=56)	0.000347 (0.000276-0.000485) (n=45)	
<b>Metilazione del DNA (%metilcit)</b>	3.67±0.26 (n=56)	3.52±0.29* (n=45)	0.679
<b>Metilazione del DNA (%metilcit)/Globuli bianchi</b>	0.56(0.48-0.71) (n=56)	0.51(0,42-0.60)* (n=45)	

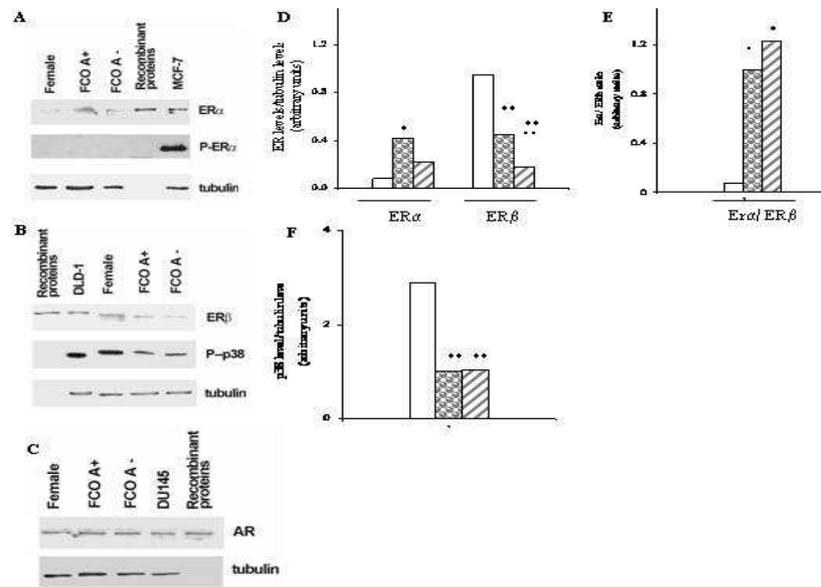
**Tabella 9. Valutazione degli effetti dei CO sulla metilazione del DNA e sulle arginine metilate.** I dati sono espressi come media ± deviazione standard, mediana e range. \* e \*\* indicano rispettivamente  $P \leq$  di 0.05 e  $P <$  di 0.001. n indica il numero di soggetti utilizzati per calcolare i dati statistici. Il power indica il potere statistico del test quando valutato come media ± deviazione standard.

## **Espressione e attività di ER e AR in MDMs ottenuti da differenti popolazioni femminili.**

MDMs ottenuti dalle Fs esprimono i AR ed entrambe le isoforme dei ER (ER $\alpha$ , ER $\beta$ ) (Figura 7). L'isoforma  $\beta$  è la più espressa, come indicato dal confronto della banda ottenuta caricando la stessa quantità di proteine ricombinanti (5 ng), di conseguenza, MDMs presentano un basso rapporto ER $\alpha$ /ER $\beta$ . FOCA+ e FOCA- esprimono ER $\alpha$  e ER $\beta$  essendo l'espressione di entrambi superiore in FOCA+ che in FOCA- (Figura 7). Di conseguenza il rapporto ER $\alpha$ /ER $\beta$  è significativamente maggiore in FOCA- che in FOCA+ (Figura 7). Mentre il recettore degli androgeni non è significativamente variato. Abbiamo anche valutato l'attività delle due isoforme del recettore degli estrogeni misurando la fosforilazione di Ser 118 per ER $\alpha$  e la fosforilazione di p38 per ER $\beta$  [93].

La forma fosforilata di ER $\alpha$  non è presente negli stessi lisati che esprimevano la proteina, indicando che ER $\alpha$  è inattivo, mentre, la fosforilazione di ER $\alpha$  è evidente in una linea cellulare di carcinoma mammario umano MCF-7 usata come controllo positivo.

La fosforilazione di p38 e quindi l'attivazione di ER $\beta$  è inferiore in MDMs ottenuti da monociti di donne che usano contraccettivi orali (Figura 7).

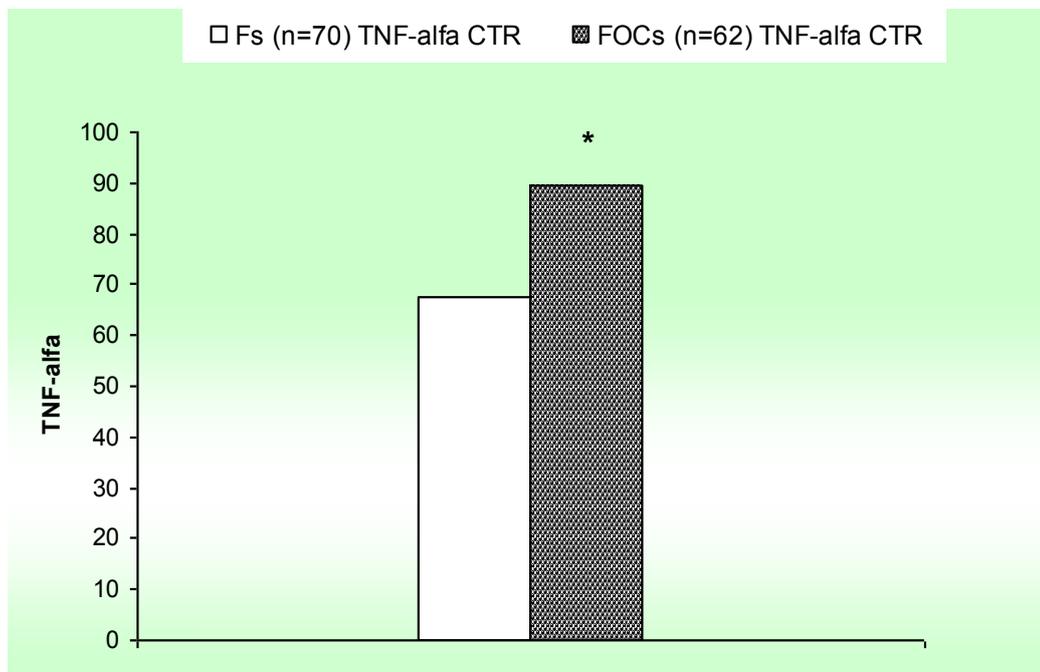


**Figura 7. Espressione e attivazione di ER $\alpha$ , ER $\beta$  e AR in MDMs derivati da differenti popolazioni di femmine.** Analisi al Western blot dei recettori per gli ormoni sessuali. L'espressione e l'attività dei recettori degli estrogeni (ER $\alpha$  e ER $\beta$  – pannello A e B), espressione dei recettori degli androgeni (AR – pannello C). L'analisi densitometrica è indicata nel pannello D, E, F. \* e \*\* indicano un P<0.05 e un P<0.001 verso le Fs. • e •• indicano rispettivamente un P<0.05 e un P<0.001 tra FOCA+ e FOCA-.

## Misurazione del TNF-alfa

E' stato dimostrato che gli estrogeni influenzano la risposta infiammatoria attraverso meccanismi di soppressione delle citochine. Questo ci ha indotto a valutare se le modifiche dei ER fossero associate a cambiamenti nel rilascio di TNF-alfa sia nel basale che dopo stimolazione con LPS.

Il rilascio della citochina nel basale è significativamente maggiore nelle FOCs rispetto a Fs (Figura 8) Stratificando la popolazione femminile in base al tipo di progestinico, androgenico e antiandrogenico non si riscontra nessuna differenza.



**Figura 8. Liberazione di TNF-alfa in condizioni basali.** \* indica  $P = 0.017$  tra Fs e FOCs. n indica il numero di soggetti utilizzati per calcolare i dati statistici.

Come è ovvio il rilascio di TNF-alfa dopo la stimolazione con LPS aumenta in tutti i gruppi, ma nessuna differenza significativa è stata riscontrata in seguito a stimolazione con LPS tra Fs e FOCs e dopo stratificazione della popolazione, tra FOCA+ e FOCA- anche se i valori ottenuti nelle FOCA+ sono inferiori rispetto a FOCA-.

## DISCUSSIONE

In questo studio abbiamo voluto evidenziare che l'uso dei contraccettivi orali seleziona due popolazioni di donne e che entrambe devono essere inserite nei trials clinici, visto anche che il consumo delle associazioni estro-progestiniche è molto diffuso in tutto il mondo, [94, 95]. 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 [2]. 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, dopo aver reclutato due popolazioni in base all'assunzione o meno di contraccettivi orali (CO). La popolazione che usa contraccettivi orali è stata poi suddivisa in base alla attività androgenica del progestico presente nelle associazioni assunte. Appare importante sottolineare, che le FOCs fumano di meno ed hanno un livello di scolarizzazione maggiore fino alle scuole medie superiori. Nonostante la relativamente bassa numerosità campionaria, questi dati suggeriscono che le donne facenti uso di CO possiedono un livello d'istruzione più alto e sono consapevoli dei danni derivanti dall'associazione tra fumo ed estro-progestinici [96-100]. La nostra popolazione risulta omogenea per peso ed età.

Andando ad esaminare i parametri biochimici, si conferma che l'uso dei contraccettivi orali induce variazioni nei parametri biochimici quali TIBC, colesterolo totale, HDL, TG, CRP e PT [101-103]. Di particolare interesse appare il fatto che alcune di queste differenze scompaiono quando vengono normalizzate in base al BMI che come descritto in letteratura, riflette la quantità di grasso di un individuo [104].

Ciò indica che alcune variazioni sono solo apparenti (vedi HDL) altre rimangono anche dopo correzione, come nel caso di TIBC, TG, bilirubina totale e la CRP.

Questo potrebbe indicare che la normalizzazione dei dati per il BMI è necessaria [3].

Come già accennato, l'uso dei CO aumenta i livelli di TG e CRP due fattori di rischio della malattia cardiovascolare [105-107] anche se sulla CRP ultimamente sono nate delle discussioni. E' importante anche notare che le linee guida indicano che l'aumento dei TG è un fattore di rischio maggiore nella donna che non nell'uomo. Le variazioni dell'assetto lipidico non meravigliano visto che l'importanza degli estrogeni nel metabolismo lipidico è ben nota [101, 108].

A conferma di quanto già noto, le FOCs mostrano livelli significativamente inferiori di PT. In letteratura, è ampiamente descritto il potenziale rischio trombo-embolico derivante dall'uso dei CO [4, 6] differenza che scompare dopo la correzione del peso corporeo.

Quando andiamo a stratificare la popolazione che usa CO in base alle proprietà androgeniche del progestinico si evidenzia che esse influenzano alcuni dei parametri studiati. In particolare, come già riportato da Van Rooijen et al [109] le FOCA- hanno livelli di HDL statisticamente maggiori rispetto alle FOCA+, e tale differenza è presente solo dopo la correzione con il BMI.

Di particolare interesse sono le differenze riportate nella glicemia a digiuno che risulta più elevata in FOCA- anche dopo correzione con il BMI. Questo era un dato non noto fino a questo momento ed evidenzia come l'attività androgenica possa rivelarsi fondamentale per far insorgere una condizione di pre-diabete [10, 110]. L'aumento della glicemia a digiuno è un fattore di rischio per la malattia diabetica e particolarmente preoccupante è la gravità della malattia diabetica nella donna [111, 112], infatti le donne diabetiche vanno più facilmente incontro a malattie cardiovascolari rispetto agli uomini diabetici ed alle donne non diabetiche [113, 114].

I nostri dati suggeriscono che non sia opportuno trattare le donne che presentano altri fattori di rischio per la malattia diabetica con CO

sprovvisi di attività androgenica. Potremmo pensare che l'effetto sul glucosio sia mediato dall'aumento del cortisolo ematico indotto dai CO, ma questo aumenta in ugual misura in ambedue le popolazioni. Tuttavia l'aumento del cortisolo nelle donne che usano i CO è preoccupante perché esso, col tempo, si può associare ad una serie di variazioni metaboliche [115].

Ovviamente siamo pienamente coscienti che il dato sulla glicemia a digiuno non è sufficiente a chiarire le cause di ciò, per cui sono stati disegnati altri studi che prevedono la misura dell'insulina e del C peptide e il calcolo dell'HOMA.

Abbiamo inoltre confermato che l'uso di CO è associato ad una serie di cambiamenti nell'asse ipotalamo-ipofisi-ovarico [116]. Infatti, le donne che assumono CO presentano livelli significativamente minori di testosterone rispetto alle donne non trattate [117, 118]. La riduzione del testosterone ematico potrebbe dipendere anche dall'aumento del cortisolo, poiché livelli farmacologici di cortisolo hanno un effetto altamente negativo sulle concentrazioni di testosterone circolante [119]. FSH, LH, E2, sono significativamente maggiori nelle Fs rispetto alle FOCs, infatti, l'estrogeno del CO è un inibitore dell'ormone FSH [120] mentre l'inibizione dell'ormone luteinizzante (LH) e quindi l'ovulazione, è impedita dalla componente progestinica [120]. Una loro diminuzione nelle FOCs è un dato caratteristico nelle donne che fanno uso di CO [121].

I livelli di TSH non cambiano significativamente; ciò potrebbe indicare che la funzione tiroidea viene conservata [122].

Anche se non si osservano variazioni nella lipoperossidazione lipidica l'uso dei CO produce una modesta ma significativa riduzione di alcune molecole che partecipano ai meccanismi difensivi verso le specie reattive dell'ossigeno come la bilirubina totale [123, 124], la taurina [125] e la cisteina [126, 127]. Visto il ruolo che le specie reattive dell'ossigeno e lo stress ossidativo hanno nello sviluppo di numerose malattie come il diabete, il cancro [128], le malattie cardiovascolari [129, 130].

Un risultato importante emerso dal nostro studio è che i CO migliorano la funzione endoteliale, in quanto, nelle donne trattate con CO si osserva una diminuzione nei livelli di ADMA. Questo è un marker della funzione endoteliale ed un inibitore della NOS [131]. Anche se la riduzione di questo inibitore endogeno della NOS non è elevata, è degno di nota ricordare che anche piccole variazioni sono associate ad un elevato rischio di eventi coronarici acuti [131, 132].

La riduzione di ADMA è in linea con i risultati di Valtonen P. et al [5], infatti FOCs presentano livelli plasmatici di arginina, ADMA, ADMA/SDMA significativamente inferiori rispetto alle donne non trattate. Tali differenze permangono anche dopo correzione per BMI. Come descritto in letteratura, elevati livelli plasmatici di arginina portano ad un aumento di ADMA, mentre una sua diminuzione potrebbe essere correlata ad una minore produzione di NO [132]. Questo dato potrebbe essere spiegato con gli effetti che gli estrogeni hanno sulla sintesi del NO [133]. Gli estrogeni, infatti, esercitano la loro azione inibitoria sull'accumulo di ADMA per mezzo di tre meccanismi principali [134]:

- (i) Aumento della produzione di NO, che è dovuto alla stimolazione diretta di entrambe le isoforme di NOS (eNOS e iNOS) [135].
- (ii) Up-regulation dell'attività delle dimetilarginina dimetil-amino-idrolasi (DDAH), enzima responsabile della degradazione dell' ADMA [136].
- (iii) Azione protettiva sulla DDAH, attraverso meccanismi anti-ossidativi, in quanto è stato riferito che lo stress ossidativo ha un effetto neutralizzante su questo particolare enzima.

In particolare, possiamo notare che il rapporto ADMA/arginina è significativamente maggiore in FOCs rispetto a Fs.

A nostro parere appare particolarmente rilevante la differenza significativa riscontrata nei livelli percentuali di metilcitosina. È stato, infatti, osservato un minore grado di metilazione del DNA nei soggetti trattati con CO.

Variazioni nel grado di metilazione del DNA implicano modificazioni epigenetiche ereditabili nella funzione genica [137].

In particolare, l'ipometilazione porta alla predisposizione alle malattie croniche legate all'età, tra cui l'aterosclerosi [138].

Una possibile spiegazione nel minore grado di metilazione del DNA nei soggetti trattati con CO potrebbe essere l'inibizione che gli estrogeni esercitano sull'assorbimento dei folati [139] fonte di S-adenosilmetionina (SAM), coenzima donatore di gruppi metilici necessari per la metilazione del DNA. 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, mentre nelle femmine con terapia anticoncezionale si osserva una diminuzione, non significativa, dei livelli di Hcy. Attualmente non è stato possibile analizzare i livelli di folati nella popolazione in esame per verificare tale associazione. Pertanto tale dato andrà opportunamente meglio approfondito ed indagato.

Una serie di esperimenti sono stati condotti sugli MDMs. Dobbiamo subito segnalare che non sono state riscontrate differenze nei tempi di differenziamento per cui è stato possibile adottare, per tutti i gruppi, lo stesso tipo di preparazione e le stesse condizioni sperimentali. La novità principale del nostro studio sui macrofagi è il fatto che i CO modificano i livelli di ER $\alpha$  e ER $\beta$  mentre rimane immutata l'espressione di AR. La nostra attenzione è stata focalizzata su MDMs in considerazione del fatto che, i macrofagi hanno un ruolo cruciale nell'aterosclerosi e nell'immunità [90, 140] e l'implicazione che gli estrogeni hanno nello sviluppo e nella progressione di numerose patologie quali cancro alla mammella, malattie cardiovascolari, insulino-resistenza e obesità [141].

In particolare, l'isoforma  $\beta$  è la più espressa nelle donne che non usano CO, di conseguenza, MDMs presentano un basso rapporto ER $\alpha$ /ER $\beta$ . L'uso dei CO ha avuto un notevole impatto sui livelli dei ER. Infatti aumentano i livelli di ER $\alpha$  e diminuiscono gli ER $\beta$  conseguentemente il rapporto ER $\alpha$ /ER $\beta$  aumenta notevolmente. In particolare, l'effetto sugli alfa è più marcato nelle FOCA+ mentre quello sui beta è più marcato nei FOCA-.

Le variazioni dell'espressione delle proteine recettoriali si accompagnano ad una variazione dell'attività del recettore alfa che rimane inattivo.

La variazione del rapporto  $ER\alpha/ER\beta$  si accompagna, in assenza di stimolazione, ad un significativo aumento della liberazione del TNF- $\alpha$ . Infatti, tanto più alto è il rapporto tanto maggiore è la liberazione della citochina. Questi dati suggeriscono che MDMs sono in grado di mantenere una "memoria" selettiva relativa al loro ambiente in vivo. Inoltre, questi dati suggeriscono che le FOCs siano in uno stato "più infiammatorio" e questa ipotesi è anche confermata dall'aumento della CRP. In questo contesto, è importante ricordare che le FOCs hanno livelli più alti di cortisolo che dovrebbe impattare sul rilascio di TNF-alfa. Infatti, il rilascio della citochina dopo stimolazione con LPS è maggiore nelle Fs, e le Fs hanno livelli minori di cortisolo. L'importanza degli ormoni sulla liberazione di TNF-alfa è stata suggerita da Amory et al [142], e più recentemente è stata dimostrata anche una correlazione diretta fra l'espressione di  $ER\alpha$  e la soppressione della secrezione di CXCL8 indotta dall'LPS [8]. Nel nostro caso  $ER\alpha$  non è attivo per cui riteniamo che il ruolo del cortisolo sia predominante. I risultati ottenuti sui macrofagi sono in linea con gli effetti dei CO nei linfociti T umani [140].

## CONCLUSIONI

I nostri risultati indicano che le donne che usano e non usano CO sono due popolazioni differenti. Differenze sono state infatti viste sui test clinici di laboratorio, sui macrofagi e sulla metilazione del DNA. In particolare, l'ipometilazione del DNA nelle donne trattate con CO può comportare la loro maggiore suscettibilità ad alcune malattie. Inoltre, di particolare rilevanza, il fatto che i contraccettivi orali modificano i livelli di ER $\alpha$  e ER $\beta$ , mentre rimane immutata l'espressione di AR e la liberazione del TNF-alfa.

Meno aspettate le differenze indotte dalle proprietà androgeniche del progestinico, il che indica che non basta suddividere in consumatrici e non di CO, ma è necessario effettuare ulteriori stratificazioni. I risultati ottenuti possono essere importanti dal punto di vista traslazionale e suggerisco che:

a) è necessario impiegare donne che usano e non usano CO nei trials clinici, considerando il fatto che la contraccezione ormonale può interferire con la farmacocinetica e la farmacodinamica,

b) è importante valutare la scelta del tipo di CO, vista la notevole influenza che sembra avere l'attività del progestinico (androgenico o antiandrogenico) su parametri significativi dal punto di vista patologico.

Ci chiediamo anche se alcuni degli effetti da noi visti siano reversibili o se le variazioni indotte permangono per tutta la vita.

## **RINGRAZIAMENTI**

Ringrazio particolarmente la Prof.ssa Flavia Franconi per avermi trasmesso la passione per la ricerca, e per gli insegnamenti ricevuti.

Ringrazio la Dott.ssa Antonella Mattana per la sua disponibilità.

Un grazie particolare a Roberta, Adriana e Ilaria.

## BIBLIOGRAFIA

1. Sweetman, S.C., *Dose adjustment in renal impairment: response from Martindale: the Complete Drug Reference*. Bmj, 2005. **331**(7511): p. 292-3.
2. Franconi, F., et al., *Gender differences in drug responses*. Pharmacological Research, 2007. **55**(2): p. 81.
3. Lopez, L.M., et al., *Hormonal contraceptives for contraception in overweight or obese women*. Cochrane Database Syst Rev, 2010(7): p. CD008452.
4. Machado, R.B., et al., *Effect of a continuous regimen of contraceptive combination of ethinylestradiol and drospirenone on lipid, carbohydrate and coagulation profiles*. Contraception, 2010. **81**(2): p. 102-6.
5. Valtonen, P., et al., *ADMA concentration changes across the menstrual cycle and during oral contraceptive use: the Cardiovascular Risk in Young Finns Study*. Eur J Endocrinol, 2010. **162**(2): p. 259-65.
6. Tchaikovski, S.N. and J. Rosing, *Mechanisms of estrogen-induced venous thromboembolism*. Thromb Res, 2010. **126**(1): p. 5-11.
7. Gordon, S., et al., *Transcription factor YY1: structure, function, and therapeutic implications in cancer biology*. Oncogene, 2006. **25**(8): p. 1125-42.
8. Murphy, A.J., et al., *Estradiol regulates expression of estrogen receptor ERalpha46 in human macrophages*. PLoS One, 2009. **4**(5): p. e5539.
9. Goodman and Gilman, *The Pharmacological Basis of THERAPEUTICS*. 2006: McGRAW-HILL.

10. Skouby, S.O., *Hormonal contraception in obesity, the metabolic syndrome, and diabetes*. Ann N Y Acad Sci, 2010. **1205**: p. 240-4.
11. Andries, M., D. Glintborg, and M. Andersen, *Risk of impaired glucose tolerance in normal weight hirsute women during four years observation*. Acta Obstet Gynecol Scand, 2010. **89**(8): p. 1091-5.
12. Castelli, W.P., *Cardiovascular disease: Pathogenesis, epidemiology, and risk among users of oral contraceptives who smoke*. American Journal of Obstetrics and Gynecology, 1999. **180**(6, Supplement 1): p. S349.
13. Grady, D. and S.B. Hulley, *Hormones to prevent coronary disease in women: when are observational studies adequate evidence?* Ann Intern Med, 2000. **133**(12): p. 999-1001.
14. Herrington, D.M., *Hormone replacement therapy and heart disease: replacing dogma with data*. Circulation, 2003. **107**(1): p. 2-4.
15. Tan, Y.Y., et al., *Effects of vascular endothelial growth factor (VEGF) on MC3T3-E1*. Orthod Craniofac Res, 2010. **13**(4): p. 223-8.
16. Hanstein, B., et al., *Insights into the molecular biology of the estrogen receptor define novel therapeutic targets for breast cancer*. Eur J Endocrinol, 2004. **150**(3): p. 243-55.
17. Conneely, O.M. and B.M. Jericevic, *Progesterone regulation of reproductive function through functionally distinct progesterone receptor isoforms*. Rev Endocr Metab Disord, 2002. **3**(3): p. 201-9.
18. Ascenzi, P., A. Bocedi, and M. Marino, *Structure-function relationship of estrogen receptor alpha and beta: impact on human health*. Mol Aspects Med, 2006. **27**(4): p. 299-402.
19. Dechering, K., C. Boersma, and S. Mosselman, *Estrogen receptors alpha and beta: two receptors of a kind?* Curr Med Chem, 2000. **7**(5): p. 561-76.

20. Fazio, G., et al., *Prothrombotic Effects of Contraceptives*. Curr Pharm Des, 2010.
21. Wuerzner, G., et al., [*Hypertension: is the actual definition adapted to women?*]. Rev Med Suisse, 2010. **6**(257): p. 1448-51.
22. Mendelsohn, M.E. and R.H. Karas, *The protective effects of estrogen on the cardiovascular system*. N Engl J Med, 1999. **340**(23): p. 1801-11.
23. Vegeto, E., et al., *Estrogen and progesterone induction of survival of monoblastoid cells undergoing TNF-alpha-induced apoptosis*. Faseb J, 1999. **13**(8): p. 793-803.
24. Simoncini, T., et al., *Estrogens and glucocorticoids inhibit endothelial vascular cell adhesion molecule-1 expression by different transcriptional mechanisms*. Circ Res, 2000. **87**(1): p. 19-25.
25. Bolego, C., et al., *The acute estrogenic dilation of rat aorta is mediated solely by selective estrogen receptor-alpha agonists and is abolished by estrogen deprivation*. J Pharmacol Exp Ther, 2005. **313**(3): p. 1203-8.
26. Zancan, V., et al., *17Beta-estradiol decreases nitric oxide synthase II synthesis in vascular smooth muscle cells*. Endocrinology, 1999. **140**(5): p. 2004-9.
27. Mendelsohn, M.E., *Protective effects of estrogen on the cardiovascular system*. Am J Cardiol, 2002. **89**(12A): p. 12E-17E; discussion 17E-18E.
28. Heldring, N., et al., *Estrogen receptors: how do they signal and what are their targets*. Physiol Rev, 2007. **87**(3): p. 905-31.
29. Bolego, C., et al., *Selective agonists of estrogen receptor isoforms: new perspectives for cardiovascular disease*. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 2006. **26**(10): p. 2192-9.

30. Peach, H.G., N.E. Bath, and S. Farish, *Predictive value of MCV for hazardous drinking in the community*. Clin Lab Haematol, 1997. **19**(2): p. 85-7.
31. Galien, R. and T. Garcia, *Estrogen receptor impairs interleukin-6 expression by preventing protein binding on the NF-kappaB site*. Nucleic Acids Res, 1997. **25**(12): p. 2424-9.
32. Losel, R. and M. Wehling, *Nongenomic actions of steroid hormones*. Nat Rev Mol Cell Biol, 2003. **4**(1): p. 46-56.
33. Pedram, A., et al., *Integration of the non-genomic and genomic actions of estrogen. Membrane-initiated signaling by steroid to transcription and cell biology*. J Biol Chem, 2002. **277**(52): p. 50768-75.
34. Simoncini, T., et al., *Novel non-transcriptional mechanisms for estrogen receptor signaling in the cardiovascular system: Interaction of estrogen receptor [alpha] with phosphatidylinositol 3-OH kinase*. Steroids, 2002. **67**(12): p. 935.
35. Razandi, M., et al., *Plasma Membrane Estrogen Receptors Exist and Functions as Dimers*. Mol Endocrinol, 2004. **18**(12): p. 2854-2865.
36. Li, C.Z., et al., *[Study on the treatment of high dose mifepristone and progesterone in endometrial carcinoma]*. Zhonghua Fu Chan Ke Za Zhi, 2003. **38**(9): p. 552-5.
37. Grattan, D.R., et al., *Antiandrogen microimplants into the rostral medial preoptic area decrease gamma-aminobutyric acidergic neuronal activity and increase luteinizing hormone secretion in the intact male rat*. Endocrinology, 1996. **137**(10): p. 4167-73.
38. Edwards, D.P., *REGULATION OF SIGNAL TRANSDUCTION PATHWAYS BY ESTROGEN AND PROGESTERONE*. Annual Review of Physiology, 2005. **67**(1): p. 335-376.

39. Revankar, C.M., et al., *A transmembrane intracellular estrogen receptor mediates rapid cell signaling*. Science, 2005. **307**(5715): p. 1625-30.
40. Masuda, J., [*Risk factors for cerebrovascular diseases*]. Rinsho Byori, 2005. **53**(5): p. 422-9.
41. Bas, S., R. James, and C. Gabay, *Serum lipoproteins attenuate macrophage activation and Toll-Like Receptor stimulation by bacterial lipoproteins*. BMC Immunology, 2010. **11**(1): p. 46.
42. Di Girolamo, N., et al., *Expression of TNF-alpha by human plasma cells in chronic inflammation*. J Leukoc Biol, 1997. **61**(6): p. 667-78.
43. Kuiper, J., et al., *Immunomodulation of the inflammatory response in atherosclerosis*. Curr Opin Lipidol, 2007. **18**(5): p. 521-6.
44. Shen, H.-M. and S. Pervaiz, *TNF receptor superfamily-induced cell death: redox-dependent execution*. The FASEB Journal, 2006. **20**(10): p. 1589.
45. Park, J.-S., et al., *Characteristics of Type 2 Diabetes in Terms of Insulin Resistance in Korea*. Yonsei Med J, 2005. **46**(4): p. 484.
46. Stenvinkel, P., et al., *Impact of inflammation on epigenetic DNA methylation - a novel risk factor for cardiovascular disease?* J Intern Med, 2007. **261**(5): p. 488-99.
47. Kang, G.H., et al., *Profile of aberrant CpG island methylation along multistep gastric carcinogenesis*. Lab Invest, 2003. **83**(4): p. 519-26.
48. Jang, T.J., et al., *p16(INK4a) Promoter hypermethylation of non-tumorous tissue adjacent to gastric cancer is correlated with glandular atrophy and chronic inflammation*. Int J Cancer, 2001. **93**(5): p. 629-34.
49. Dong, C., W. Yoon, and P.J. Goldschmidt-Clermont, *DNA methylation and atherosclerosis*. J Nutr, 2002. **132**(8 Suppl): p. 2406S-2409S.

50. Li, Y., et al., *The DNA Methylome of Human Peripheral Blood Mononuclear Cells*. PLoS Biol, 2010. **8**(11): p. e1000533.
51. Buiting, K., et al., *Detection of aberrant DNA methylation in unique Prader-Willi syndrome patients and its diagnostic implications*. Hum Mol Genet, 1994. **3**(6): p. 893-5.
52. Glenn, C.C., et al., *Functional imprinting and epigenetic modification of the human SNRPN gene*. Hum Mol Genet, 1993. **2**(12): p. 2001-5.
53. de Capoa A, M.A., Della Rosa S, Caiafa P, Mariani L, Del Nonno F, Vocaturo A, Donnorso RP, Niveleau A, Grappelli C., *DNA demethylation is directly related to tumour progression: evidence in normal, pre-malignant and malignant cells from uterine cervix samples*. Oncol Rep, 2003. **10**(3): p. 545-9.
54. Post, W.S., et al., *Methylation of the estrogen receptor gene is associated with aging and atherosclerosis in the cardiovascular system*. Cardiovasc Res, 1999. **43**(4): p. 985-91.
55. Kleinman, W.A. and J.P. Richie, Jr., *Status of glutathione and other thiols and disulfides in human plasma*. Biochem Pharmacol, 2000. **60**(1): p. 19-29.
56. Rensen, P.C., et al., *Human recombinant apolipoprotein E redirects lipopolysaccharide from Kupffer cells to liver parenchymal cells in rats In vivo*. J Clin Invest, 1997. **99**: p. 2438 - 45.
57. Selhub, J., *Homocysteine metabolism*. Annu Rev Nutr, 1999. **19**: p. 217-46.
58. Strassburg, A., et al., *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, 2004. **74**(2): p. 129-36.
59. McCully, K.S., *Homocysteine, folate, vitamin B6, and cardiovascular disease*. Jama, 1998. **279**(5): p. 392-3.

60. van Guldener, C. and C.D. Stehouwer, *Hyperhomocysteinemia, vascular pathology, and endothelial dysfunction*. Semin Thromb Hemost, 2000. **26**(3): p. 281-9.
61. Pejaver, R.K. and A.H. Watson, *Glutathione synthetase deficiency: a family report*. J R Soc Med, 1994. **87**(3): p. 171.
62. Hamilos, D.L., P. Zelarney, and J.J. Mascali, *Lymphocyte proliferation in glutathione-depleted lymphocytes: direct relationship between glutathione availability and the proliferative response*. Immunopharmacology, 1989. **18**(3): p. 223-35.
63. Asensi, M., et al., *Effect of nonprotein thiols on protein synthesis in isolated rat hepatocytes*. Experientia, 1996. **52**(2): p. 111-4.
64. Mailliard, M.E., *Amino acid transport and glutathione homeostasis: what is the mechanism for cysteine uptake from bile?* Hepatology, 1993. **18**(3): p. 700-2.
65. Dudman, N.P., et al., *Homocysteine thiolactone disposal by human arterial endothelial cells and serum in vitro*. Arterioscler Thromb, 1991. **11**(3): p. 663-70.
66. Nath, K.A. and A.K. Salahudeen, *Autoxidation of cysteine generates hydrogen peroxide: cytotoxicity and attenuation by pyruvate*. Am J Physiol, 1993. **264**(2 Pt 2): p. F306-14.
67. Jacob, N., et al., *Cysteine is a cardiovascular risk factor in hyperlipidemic patients*. Atherosclerosis, 1999. **146**(1): p. 53-9.
68. El-Khairi, L., et al., *Plasma total cysteine as a risk factor for vascular disease: The European Concerted Action Project*. Circulation, 2001. **103**(21): p. 2544-9.
69. Molchanova, S.M., S.S. Oja, and P. Saransaari, *Effect of taurine on the concentrations of glutamate, GABA, glutamine and alanine in the rat striatum and hippocampus*. Proc West Pharmacol Soc, 2007. **50**: p. 95-7.

70. Foos, T.M. and J.Y. Wu, *The role of taurine in the central nervous system and the modulation of intracellular calcium homeostasis*. Neurochem Res, 2002. **27**(1-2): p. 21-6.
71. Oja, S.S. and P. Saransaari, *Pharmacology of taurine*. Proc West Pharmacol Soc, 2007. **50**: p. 8-15.
72. Franconi, F., et al., *Taurine supplementation and diabetes mellitus*. Curr Opin Clin Nutr Metab Care, 2006. **9**(1): p. 32-6.
73. Balkan, J., et al., *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, 2005. **17**(9): p. 917-21.
74. Erman, F., et al., *Betaine or taurine administration prevents fibrosis and lipid peroxidation induced by rat liver by ethanol plus carbon tetrachloride intoxication*. Amino Acids, 2004. **27**(2): p. 199-205.
75. Franconi, F., et al., *Is taurine beneficial in reducing risk factors for diabetes mellitus?* Neurochem Res, 2004. **29**(1): p. 143-50.
76. Schaffer, S., et al., *Why is taurine cytoprotective?* Adv Exp Med Biol, 2003. **526**: p. 307-21.
77. Zinellu, A., et al., *Plasma methionine determination by capillary electrophoresis-UV assay: application on patients affected by retinal venous occlusive disease*. Anal Biochem, 2007. **363**(1): p. 91-6.
78. Obianyo, O., T.C. Osborne, and P.R. Thompson, *Kinetic mechanism of protein arginine methyltransferase I*. Biochemistry, 2008. **47**(39): p. 10420-7.
79. MacAllister, R.J., et al., *Metabolism of methylarginines by human vasculature; implications for the regulation of nitric oxide synthesis*. Br J Pharmacol, 1994. **112**(1): p. 43-8.
80. Boger, R.H. and S.M. Bode-Boger, *Asymmetric dimethylarginine, derangements of the endothelial nitric oxide synthase pathway, and*

- cardiovascular diseases*. Semin Thromb Hemost, 2000. **26**(5): p. 539-45.
81. Cayatte, A.J., et al., *Chronic inhibition of nitric oxide production accelerates neointima formation and impairs endothelial function in hypercholesterolemic rabbits*. Arterioscler Thromb, 1994. **14**(5): p. 753-9.
  82. Stuhlinger, M.C., et al., *Homocysteine impairs the nitric oxide synthase pathway: role of asymmetric dimethylarginine*. Circulation, 2001. **104**(21): p. 2569-75.
  83. Boger, R.H., et al., *Elevation of asymmetrical dimethylarginine may mediate endothelial dysfunction during experimental hyperhomocyst(e)inaemia in humans*. Clin Sci (Lond), 2001. **100**(2): p. 161-7.
  84. Vallance, P., et al., *Endogenous dimethylarginine as an inhibitor of nitric oxide synthesis*. J Cardiovasc Pharmacol, 1992. **20 Suppl 12**: p. S60-2.
  85. Bots, M.L., et al., *Intensive lipid lowering may reduce progression of carotid atherosclerosis within 12 months of treatment: the METEOR study*. J Intern Med, 2009. **265**(6): p. 698-707.
  86. Zinellu, A., et al., *N-methyl-D-glucamine improves the laser-induced fluorescence capillary electrophoresis performance in the total plasma thiols measurement*. Electrophoresis, 2003. **24**(16): p. 2796-804.
  87. Zinellu, A., et al., *Taurine determination by capillary electrophoresis with laser-induced fluorescence detection: from clinical field to quality food applications*. Amino Acids, 2009. **36**(1): p. 35-41.
  88. Esterbauer, H., et al., *Endogenous antioxidants and lipoprotein oxidation*. Biochem Soc Trans, 1990. **18**(6): p. 1059-61.
  89. Teerlink, T., *ADMA metabolism and clearance*. Vasc Med, 2005. **10 Suppl 1**: p. S73-81.

90. Masuda, J. and R. Ross, *Atherogenesis during low level hypercholesterolemia in the nonhuman primate. I. Fatty streak formation*. *Arteriosclerosis*, 1990. **10**(2): p. 164-77.
91. Brunelleschi, S., et al., *Macrophage stimulating protein (MSP) evokes superoxide anion production by human macrophages of different origin*. *Br J Pharmacol*, 2001. **134**(6): p. 1285-95.
92. Brunelleschi, S., et al., *Minor polar compounds extra-virgin olive oil extract (MPC-OOE) inhibits NF-kappa B translocation in human monocyte/macrophages*. *Pharmacol Res*, 2007. **56**(6): p. 542-9.
93. Galluzzo, P., et al., *17beta-Estradiol regulates the first steps of skeletal muscle cell differentiation via ER-alpha-mediated signals*. *Am J Physiol Cell Physiol*, 2009. **297**(5): p. C1249-62.
94. Nelson, A., *New low-dose, extended-cycle pills with levonorgestrel and ethinyl estradiol: an evolutionary step in birth control*. *Int J Women Health*, 2010. **2**: p. 99-106.
95. Szarewski, A., D. Mansour, and L.P. Shulman, *50 years of "The Pill": celebrating a golden anniversary*. *J Fam Plann Reprod Health Care*, 2010. **36**(4): p. 231-8.
96. Zimlichman, E., et al., *Oral contraceptive use and smoking habits in young Israeli women: a cross-sectional study*. *Isr Med Assoc J*, 2004. **6**(9): p. 546-9.
97. Godsland, I.F., et al., *Occlusive vascular diseases in oral contraceptive users. Epidemiology, pathology and mechanisms*. *Drugs*, 2000. **60**(4): p. 721-869.
98. Herings, R.M., J. Urquhart, and H.G. Leufkens, *Venous thromboembolism among new users of different oral contraceptives*. *Lancet*, 1999. **354**(9173): p. 127-8.
99. Keeling, D., *Combined oral contraceptives and the risk of myocardial infarction*. *Ann Med*, 2003. **35**(6): p. 413-8.

100. McClave, A.K., et al., *Cigarette smoking women of reproductive age who use oral contraceptives: results from the 2002 and 2004 behavioral risk factor surveillance systems*. *Womens Health Issues*, 2010. **20**(6): p. 380-5.
101. Petitti, D.B., *Clinical practice. Combination estrogen-progestin oral contraceptives*. *N Engl J Med*, 2003. **349**(15): p. 1443-50.
102. Administration., A.S.F.a.D., Rockville, Editor. 1998.
103. Berenson, A.B. and M. Rahman, *Changes in weight, total fat, percent body fat, and central-to-peripheral fat ratio associated with injectable and oral contraceptive use*. *Am J Obstet Gynecol*, 2009. **200**(3): p. 329 e1-8.
104. *Hormonal contraceptives for contraception in overweight or obese women*. *Obstet Gynecol*. **116**(5): p. 1206-7.
105. Mendall, M.A., et al., *C reactive protein and its relation to cardiovascular risk factors: a population based cross sectional study*. *Bmj*, 1996. **312**(7038): p. 1061-5.
106. Klufft, C., et al., *Pro-inflammatory effects of oestrogens during use of oral contraceptives and hormone replacement treatment*. *Vascul Pharmacol*, 2002. **39**(3): p. 149-54.
107. Walsh, B.W., et al., *The effects of hormone replacement therapy and raloxifene on C-reactive protein and homocysteine in healthy postmenopausal women: a randomized, controlled trial*. *J Clin Endocrinol Metab*, 2000. **85**(1): p. 214-8.
108. Taneepanichskul, S., U. Jaisamrarn, and V. Phupong, *Effect of a new oral contraceptive with drospirenone on vital signs, complete blood count, glucose, electrolytes, renal, and liver function*. *J Med Assoc Thai*, 2007. **90**(3): p. 426-31.
109. van Rooijen, M., et al., *Different effects of oral contraceptives containing levonorgestrel or desogestrel on plasma lipoproteins and coagulation factor VII*. *Am J Obstet Gynecol*, 2002. **186**(1): p. 44-8.

110. Nikolov, A., et al., [*Contraception in women with diabetes mellitus*]. *Akush Ginekol (Sofia)*, 2005. **44**(5): p. 47-52.
111. Shawe, J., et al., *Use of hormonal contraceptive methods by women with diabetes*. *Prim Care Diabetes*, 2008. **2**(4): p. 195-9.
112. Shawe, J. and R. Lawrenson, *Hormonal contraception in women with diabetes mellitus: special considerations*. *Treat Endocrinol*, 2003. **2**(5): p. 321-30.
113. Qiao, Q., *Comparison of different definitions of the metabolic syndrome in relation to cardiovascular mortality in European men and women*. *Diabetologia*, 2006. **49**(12): p. 2837-46.
114. Pyorala, K., et al., *Risk factor management in diabetic and non-diabetic patients with coronary heart disease. Findings from the EUROASPIRE I AND II surveys*. *Diabetologia*, 2004. **47**(7): p. 1257-65.
115. Koertge, J., et al., *Cortisol and vital exhaustion in relation to significant coronary artery stenosis in middle-aged women with acute coronary syndrome*. *Psychoneuroendocrinology*, 2002. **27**(8): p. 893-906.
116. Liening, S.H., et al., *Salivary testosterone, cortisol, and progesterone: two-week stability, interhormone correlations, and effects of time of day, menstrual cycle, and oral contraceptive use on steroid hormone levels*. *Physiol Behav*, 1999. **99**(1): p. 8-16.
117. Winkler, U.H. and R. Sudik, *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*, 2009. **79**(1): p. 15-23.
118. Giraldo, E., et al., *Influence of gender and oral contraceptives intake on innate and inflammatory response. Role of neuroendocrine factors*. *Mol Cell Biochem*, 2008. **313**(1-2): p. 147-53.

119. Hackney, A.C., A.W. Moore, and K.K. Brownlee, *Testosterone and endurance exercise: development of the "exercise-hypogonadal male condition"*. Acta Physiol Hung, 2005. **92**(2): p. 121-37.
120. van Heusden, A.M. and B.C. Fauser, *Activity of the pituitary-ovarian axis in the pill-free interval during use of low-dose combined oral contraceptives*. Contraception, 1999. **59**(4): p. 237-43.
121. Sondheimer, S.J., *Oral contraceptives: mechanism of action, dosing, safety, and efficacy*. Cutis, 2008. **81**(1 Suppl): p. 19-22.
122. Toldy, E., et al., *Comparative analytical evaluation of thyroid hormone levels in pregnancy and in women taking oral contraceptives: a study from an iodine deficient area*. Gynecol Endocrinol, 2004. **18**(4): p. 219-26.
123. Schiele, F., et al., *Biological effects of eleven combined oral contraceptives on serum triglycerides, gamma-glutamyltransferase, alkaline phosphatase, bilirubin and other biochemical variables*. Clin Chem Lab Med, 1998. **36**(11): p. 871-8.
124. Bednarek-Tupikowska, G., et al., *Serum lipid peroxides and total antioxidant status in postmenopausal women on hormone replacement therapy*. Gynecol Endocrinol, 2004. **19**(2): p. 57-63.
125. Ozden, S., et al., *The effects of hormone replacement therapy on lipid peroxidation and antioxidant status*. Maturitas, 2001. **38**(2): p. 165-70.
126. Weiss, N., et al., *Overexpression of cellular glutathione peroxidase rescues homocyst(e)ine-induced endothelial dysfunction*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2001. **98**(22): p. 12503-8.
127. Weiss, N., et al., *Cellular redox state and endothelial dysfunction in mildly hyperhomocysteinemic cystathionine beta-synthase-deficient mice*. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 2002. **22**(1): p. 34-41.
128. Seibold, P., et al., *Polymorphisms in oxidative stress-related genes and postmenopausal breast cancer risk*. Int J Cancer, 2010.

129. Felty, Q., *Estrogen-induced DNA synthesis in vascular endothelial cells is mediated by ROS signaling*. BMC Cardiovasc Disord, 2006. **6**: p. 16.
130. Rossouw, J.E., *Coronary heart disease in menopausal women: implications of primary and secondary prevention trials of hormones*. Maturitas, 2005. **51**(1): p. 51-63.
131. Blackwell, S., *The biochemistry, measurement and current clinical significance of asymmetric dimethylarginine*. Ann Clin Biochem, 2010. **47**(Pt 1): p. 17-28.
132. Wang, J., et al., *L-arginine regulates asymmetric dimethylarginine metabolism by inhibiting dimethylarginine dimethylaminohydrolase activity in hepatic (HepG2) cells*. Cell Mol Life Sci, 2006. **63**(23): p. 2838-46.
133. Karkanaki, A., et al., *Hormone therapy and asymmetrical dimethylarginine in postmenopausal women*. Hormones (Athens), 2010. **9**(2): p. 127-35.
134. Charitidou, C., et al., *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, 2008. **196**(2): p. 958-65.
135. Binko, J. and H. Majewski, *17 beta-Estradiol reduces vasoconstriction in endothelium-denuded rat aortas through inducible NOS*. Am J Physiol, 1998. **274**(3 Pt 2): p. H853-9.
136. Kimoto, M., et al., *Detection of NG,NG-dimethylarginine dimethylaminohydrolase in human tissues using a monoclonal antibody*. J Biochem, 1995. **117**(2): p. 237-8.
137. McGowan, P.O., M.J. Meaney, and M. Szyf, *Diet and the epigenetic (re)programming of phenotypic differences in behavior*. Brain Res, 2008. **1237**: p. 12-24.

138. Hiltunen, M.O. and S. Yla-Herttuala, *DNA methylation, smooth muscle cells, and atherogenesis*. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2003. **23**(10): p. 1750-3.
139. Sutterlin, M.W., et al., *Serum folate and Vitamin B12 levels in women using modern oral contraceptives (OC) containing 20 microg ethinyl estradiol*. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol*, 2003. **107**(1): p. 57-61.
140. Parihar, A., T.D. Eubank, and A.I. Doseff, *Monocytes and macrophages regulate immunity through dynamic networks of survival and cell death*. *J Innate Immun*, 2010. **2**(3): p. 204-15.
141. Deroo, L.A., et al., *Comparison of women's breast cancer risk factors in Geneva, Switzerland and Shanghai, China*. *Prev Med*, 2010.
142. Amory, J.H., R. Lawler, and J. Hitti, *Increased tumor necrosis factor-alpha in whole blood during the luteal phase of ovulatory cycles*. *J Reprod Med*, 2004. **49**(8): p. 678-82.