



SAPIENZA
UNIVERSITÀ DI ROMA

FACOLTÀ DI MEDICINA E ODONTOIATRIA

SCUOLA DI DOTTORATO IN SCIENZE ENDOCRINOLOGICHE

Direttore Prof. A. Lenzi

ANNO ACCADEMICO 2016/2017

XXX CICLO

TESI DI DOTTORATO

**Valutazione della funzione piastrinica in relazione alle variazioni
ormonali del ciclo mestruale:
prospettive di genere**

Relatore:
Prof. Stefania Basili

Co-Relatore
Dott. Valeria Raparelli

Candidata:
Dott. Laura Napoleone
Matricola 690315

Indice

<u>Indice</u>	2
<u>Elenco delle Figure</u>	3
<u>Elenco delle Tabelle</u>	4
<u>1. Introduzione</u>	5
<u>2. Obiettivo dello studio</u>	26
<u>3. Materiali e Metodi</u>	27
<i>3.1 Disegno dello studio</i>	27
<i>3.2 Metodi di laboratorio</i>	29
<i>3.2.1 Misurazione attività piastrinica in vivo</i>	29
<i>3.2.2 Dosaggi ormonali</i>	30
<i>3.3 Dimensione del campione</i>	32
<i>3.4 Gestione del Database ed Analisi statistica</i>	33
<u>4. Risultati</u>	34
<i>4.1 Caratteristiche cliniche della popolazione in studio</i>	34
<i>4.2 Indici di attivazione piastrinica</i>	34
<i>4.3 Mediatori di attivazione piastrinica</i>	35
<i>4.4 Andamento ormonale nelle varie fasi del ciclo mestruale</i>	36
<i>4.5 Correlazioni</i>	36
<u>5. Discussione</u>	38
<u>6. Conclusioni</u>	45
<u>Figure e Tabelle</u>	46
<u>Bibliografia</u>	52

Elenco delle Figure

Figura 1 - Andamento del TxB2 nelle fasi del ciclo mestruale.....	46
Figura 2 - Andamento della sPs nelle fasi del ciclo mestruale.....	47
Figura 3 - Andamento della sCD40L nelle fasi del ciclo mestruale.....	48
Figura 4 - Andamento della sNOX2 nelle fasi del ciclo mestruale.....	49

Elenco delle Tabelle

Tabella 1 – Caratteristiche cliniche ed anamnestiche dei soggetti arruolati.....	50
Tabella 2 - Assetto Ormonale nelle donne arruolate.....	51

1. Introduzione

Le malattie aterotrombotiche sono la più comune causa di morte nella società occidentale, rappresentando il substrato delle malattie cardiovascolari (CVD): malattia ischemica cardiaca, infarto cerebrale e tromboembolismo venoso (VTE). Sebbene le malattie cardiovascolari rappresentino la principale causa di morbilità e mortalità in entrambi i sessi, esistono differenze tra uomini e donne, ancora ampiamente inspiegate, in termini di epidemiologia, fattori di rischio, presentazione clinica, progressione della malattia e risposta alla terapia, che rendono indispensabile la loro valutazione tramite un approccio differente, orientato al genere.

I soggetti di sesso maschile sono sempre stati considerati a maggior rischio di eventi cardiovascolari, causando, nelle donne, una sottostima del rischio ed un mancato riconoscimento dei sintomi correlati.

La differenza di genere nell'incidenza di queste patologie, in relazione all'età, ha contribuito alla disparità di arruolamento e gestione degli studi clinici svolti in questo ambito: i soggetti di sesso femminile costituiscono meno del 30% della quota di partecipanti negli studi randomizzati. Questi aspetti sono dei fattori limitanti da considerare quando si traslano i risultati degli studi clinici nella pratica clinica quotidiana, anche alla luce della peggior prognosi delle donne a seguito di un evento acuto.

Una migliore comprensione di queste differenze di genere potrebbe portare verso lo sviluppo di terapie ottimali per la prevenzione ed il trattamento delle malattie cardiovascolari nelle donne, minimizzando al contempo il rischio di eventi avversi.

Epidemiologia

Le malattie cardiovascolari sono la prima causa di morte nel mondo e sono responsabili di oltre 3.9 milioni di decessi ogni anno in Europa. Sono quindi patologie ad elevata morbilità e costo socio-sanitario, causando, nella popolazione femminile, circa il 25% di tutte le morti.

Rispetto alle ultime decadi sta emergendo la consapevolezza della necessità di una conoscenza approfondita riguardo le differenze di genere. Le proiezioni attuali indicano un continuo aumento dell'incidenza delle malattie cardiovascolari nella popolazione generale dovuto all'invecchiamento della popolazione ed alle epidemie di obesità, diabete e sindrome metabolica. Annualmente, la popolazione affetta da malattie cardiovascolari continua a registrare un aumento del numero di morti tra i soggetti di sesso femminile rispetto alla riduzione dello stesso dato negli uomini (1,2).

Medicina di genere: razionale

La prevalenza dei disordini cardiovascolari nelle donne varia ampiamente con l'età: l'insorgenza, rispetto agli uomini è più tardiva (3, 4, 5), ma l'incidenza di coronaropatia ed infarto cerebrale aumenta del triplo in età avanzata, in particolare dall'inizio della menopausa, a causa dei profondi cambiamenti dal punto di vista ormonale. L'incidenza di malattia arteriosa periferica è meno rilevante nelle donne rispetto agli uomini (18% vs 27%) (6). La carenza di estrogeni ovarici endogeni che si verifica in menopausa è il fattore principale che aumenta il rischio di CVD. Tuttavia, il meccanismo che ne è alla base rimane ancora oscuro (7). Per quel che riguarda l'infarto cerebrale, gli uomini, comparati con le donne, hanno una più alta incidenza e prevalenza (età media del primo evento: 68.6 anni vs 72.9 anni). A fronte di questo dato, però, nei soggetti di sesso femminile l'infarto cerebrale tende ad essere più

grave, con una mortalità ad un mese dall'evento del 24.7% comparato con una mortalità del 19.7% nei soggetti di sesso maschile (8, 9).

Numerosi dati statistici evidenziano come un'alta percentuale di donne muoia per cause cardiache misconosciute, avendo, nell'ambito delle CVD, una qualità della vita inferiore e sperimentando severità ed estensione di malattia più gravi; tutto questo comporta un aumento dei costi socio-sanitari che si riflette in un aumento della frequenza di ospedalizzazioni, visite di controllo e morbilità. Oltre l'80% delle donne di mezza età ha uno o più fattori di rischio cardiaci tradizionali (10): più elevati livelli di colesterolo dopo la quinta decade di vita (11) ed una diminuzione dei livelli di HDL dopo la menopausa (12). L'obesità è presente in un terzo delle donne, con il 7% che raggiunge un indice di massa corporea (BMI) ≥ 40 Kg/m². L'ipertrigliceridemia è uno dei più importanti fattori di rischio nelle donne rispetto agli uomini. Il diabete, nei soggetti di sesso femminile, causa, rispetto agli uomini affetti dalla stessa patologia, una maggiore mortalità per eventi ischemici; inoltre, il rischio aumenta di 3.3 volte rispetto alle donne non diabetiche. Gli ultimi 30 anni hanno mostrato una diminuzione della mortalità negli uomini con diabete, riduzione non presente nelle donne. La presenza di più fattori di rischio è comune in post-menopausa, in particolare la combinazione tra obesità, ipertensione e dislipidemia (13), potenzialmente legata a disturbi metabolici ormono-correlati. In letteratura, si evidenzia come le donne abbiano maggiori livelli di proteina C reattiva rispetto agli uomini (14); questa differenza inizia ad apparire durante la pubertà e sembra verosimilmente correlata con la maggiore frequenza di malattie autoimmuni infiammatorie (i.e. artrite reumatoide, lupus eritematoso sistemico) suggerendo un ruolo preminente dell'infiammazione nell'epidemiologia delle malattie ischemiche. È stato dimostrato come cicli anovulatori causati da deficienza di estrogeni, disfunzioni ipotalamiche (15) o

irregolarità del ciclo mestruale (16) nelle donne in pre-menopausa, siano associati ad un aumento del rischio di aterosclerosi coronarica ed eventi avversi cardiovascolari. Soggetti di sesso femminile con sintomi tipici o atipici di angina hanno una probabilità inferiore di avere una coronaropatia ostruttiva rispetto agli uomini (17) ma un esito in termini di qualità della vita e mortalità, peggiore. Questo apparente paradosso necessita di ulteriori approfondimenti, anche se, è possibile ipotizzare, come ciò sia dovuto ad un'età più avanzata, alla presenza di numerose comorbidità ed a un non corretto utilizzo delle linee guida (17).

Recenti dati supportano un ruolo specifico, relato al genere, della presenza di disfunzioni microvascolari nella fisiopatologia delle sindromi ischemiche. Dati autoptici evidenziano nelle donne una più alta frequenza di placche coronariche erose ed embolizzazioni distali. Ulteriori importanti differenze di genere riguardano la risposta al rimodellamento tissutale in seguito a danno endoteliale (18) che, combinato con il calibro più piccolo delle arterie può giocare un ruolo preminente nelle disfunzioni del microcircolo. Uno studio di pazienti con coronaropatie ostruttive ha evidenziato, negli uomini, la presenza di ateromi e disfunzioni epicardiche endoteliali con maggior frequenza rispetto alle disfunzioni del microcircolo. Tali disfunzioni del microcircolo sono state evidenziate in maggior misura nelle donne; questo potrebbe rendere ragione della maggior quota di manifestazioni anginose ed ischemiche in assenza di coronaropatia ostruttiva (17)

Queste osservazioni supportano l'influenza delle caratteristiche legate al genere nell'epidemiologia delle malattie cardiovascolari, la cui più ampia comprensione porterebbe ad un miglioramento dell'aspettativa e della qualità di vita delle donne, oltre che ad una migliore gestione dei costi sanitari.

Effetto ateroprotettivo degli estrogeni

Come già menzionato, esistono due vie conosciute che vengono attivate dall'interazione degli estrogeni endogeni con i recettori ($ER\alpha$ e $ER\beta$): la via genomica e la via non-genomica. La via genomica prevede, in seguito al legame con il ligando, il passaggio dell'estrogeno attraverso la membrana lipidica per raggiungere il nucleo dove il legame con altri recettori media l'attivazione o la soppressione di geni. La via non-genomica è rappresentata dalla rapida attivazione del recettore localizzato sulla membrana plasmatica che causa il rilascio di secondi messaggeri, come l'ossido nitrico, il calcio o varie chinasi. Per quanto riguarda il sistema cardiovascolare, l'attivazione di recettori $ER\alpha$ su cellule endoteliali e miocardiche induce effetti antiossidanti ed aumenta le capacità di riparazione tissutale. I ER nel sistema cardiovascolare modulano una rapida vasodilatazione mediata dall'ossido nitrico e possono avere effetti a lungo termine (vie genomiche) che portano ad un aumento della crescita endoteliale ed all'inibizione della proliferazione delle cellule muscolari lisce. Gli estrogeni riducono l'ossidazione del colesterolo, delle lipoproteine a bassa densità, il legame e l'aggregazione piastrinica ed incrementano l'attività della ciclossigenasi-2 (19).

Studi epidemiologici e sperimentali, ad oggi, sostengono un effetto ateroprotettivo degli estrogeni endogeni e/o esogeni. Esistono studi in animali nei quali, inducendo l'interruzione dei segnali dell'ipotalamo diretti alle ovaie, dalla quale deriva anovulazione e ipoestrogenemia, viene osservata la comparsa di aterosclerosi premenopausale nei primati e, la successiva somministrazione di contraccettione ormonale, blocca gli effetti aterosclerotici (19).

Per studiare gli effetti degli estrogeni sul sistema cardiovascolare sono stati analizzati i dati riguardanti la terapia estroprogestinica utilizzata in forma sostitutiva nelle

donne in menopausa e riguardanti la terapia contraccettiva nelle donne in età riproduttiva. Le formulazioni farmaceutiche oggi disponibili sono differenti rispetto al passato; esistono formulazioni con una dose di estrogeni notevolmente diminuita, con diversi tempi di somministrazione e molecole di nuova generazione con proprietà antiandrogeniche e diuretiche.

Lo studio Women's Health Initiative non ha però dimostrato un effetto protettivo coronarico degli estrogeni in donne in post-menopausa. Tale evidenza contraddittoria rispetto all'atteso, potrebbe dipendere tuttavia sia dai tempi di somministrazione degli estrogeni che dal tipo di progestinico associato (20).

Le molecole di vecchia generazione erano associate ad un aumento sensibile della pressione arteriosa; studi recenti hanno mostrato una diminuzione della pressione sistolica nelle donne in terapia con le nuove formulazioni (19); questo effetto è dovuto probabilmente alla diminuzione della dose di estrogeno ed alle proprietà diuretiche di alcune molecole di progestinico derivate dallo spironolattone.

Il profilo lipidico viene influenzato dagli estrogeni utilizzando la via genomica. Studi in donne in pre-menopausa in terapia con contraccettivi orali, hanno mostrato variazioni del profilo lipidico secondo una modalità dose-correlata. Le donne in terapia con 20µg EE (Ethinilestradiolo)/100µg LNG (Levonorgestrel) hanno riportato una riduzione nelle lipoproteine ad alta densità (HDL) ed un piccolo incremento di LDL e trigliceridi (19). La quota di alterazioni lipidiche è dipendente anche dalla via di somministrazione, difatti, la via transdermica, ha un'influenza minore se comparata con la via orale. Barkfeldt et al. hanno condotto uno studio randomizzato in doppio cieco che ha valutato gli effetti del metabolismo lipidico in 98 donne che ricevevano due differenti tipi di contraccettivi con solo progestinico, desogestrel 75µg/die e LNG 30µg/die. Sono stati riscontrati cambiamenti minimi nel profilo

lipidico eccetto che per la diminuzione dei livelli di HDL, le sue frazioni e le apolipoproteine I e II. Non sono state evidenziate differenze nelle due formulazioni nonostante l'alta dose di progestinico nel desogestrel, incluso nessun cambiamento nei livelli di LDL o di apolipoproteine (21).

Numerosi studi hanno evidenziato il ruolo degli ormoni riproduttivi nella regolazione del tono vasale, dato evidente data la più alta frequenza nelle donne di malattie nelle quali la componente vasale costituisce l'evento eziopatogenetico fondamentale, come la malattia di Raynaud e l'angina di Prinzmetal. Gli estrogeni aumentano i livelli di ossido nitrico e di Cox-2 e abbassano i livelli di endotelina e la risposta endocrina, tutti meccanismi che favoriscono la vasodilatazione. Tuttavia si conosce ancora poco riguardo gli effetti del progesterone e dei progestinici in questo ambito (19).

Esistono evidenze che dimostrano come l'uso di estrogeni in menopausa provochi un aumento dei livelli di proteina C reattiva (22), dato non chiaro, in quanto non è noto se sia un evento avverso o dovuto a meccanismi di up-regolazione epatica. Tale evidenza contraddittoria rispetto all'atteso, potrebbe dipendere tuttavia sia dai tempi di somministrazione degli estrogeni che dal tipo di progestinico associato. Molti studi suggeriscono che gli ormoni steroidei abbiano un effetto antiaterosclerotico; tuttavia si conosce relativamente poco circa l'impatto sulla trombosi, sull'endotelio vasale e sull'aritmogenesi, tutti aspetti che contribuiscono a definire il rischio cardiovascolare.

Esistono studi osservazionali in pazienti in trattamento con contraccettivi ormonali di prima e seconda generazione (a più alto dosaggio rispetto quelli attuali), che dimostravano un piccolo ma significativo aumento del rischio di infarto del miocardio e di tromboembolismo venoso, in particolare tra donne in terapia continuativa e tra le fumatrici, mentre un uso discontinuo o l'utilizzo di contraccettivi orali di terza generazione è associato ad una riduzione/non incremento del rischio.

L'alto rischio di trombosi sembra essere più alto nel primo anno di utilizzo, legato alle alte dosi di estrogeni. Le formulazioni di nuova generazione attualmente in uso non incrementano il rischio di infarto del miocardio ma permane un rischio aumentato di VTE che, verosimilmente, è correlato alla durata del trattamento (19).

Ruolo delle piastrine

Le piastrine ed i meccanismi di attivazione/inibizione della cascata coagulativa giocano un ruolo centrale nell'emostasi e nella patogenesi delle malattie cardiovascolari ed è stato ipotizzato un loro ruolo per spiegare le differenze di funzionalità e ed epidemiologia correlata al genere.

Le piastrine sono i più piccoli elementi figurati del sangue con forma discoidale e diametro compreso tra 2 e 4 μm . L'emivita delle piastrine circolanti è di 10 giorni. Sono cellule anucleate, derivate da frammenti citoplasmatici dei megacariociti, cellule nucleate presenti nel midollo osseo e derivanti da cellule staminali ematopoietiche. Non contengono nucleo e pertanto non possono sintetizzare nuove proteine; tuttavia contengono una quota residua di mRNA e reticolo endoplasmatico che permette loro di far fronte al fabbisogno proteico e funzionale. In condizioni fisiologiche, le piastrine circolanti esprimono livelli relativamente bassi di alcune molecole. Tali molecole sono indispensabili nelle interazioni con altre piastrine ed altre cellule come leucociti e cellule endoteliali, in seguito alla loro attivazione. Le piastrine contengono, inoltre, un numero variabile di granuli, come i granuli densi, gli α -granuli ed i lisosomi. I granuli contengono degli agonisti piastrinici secondari come l'adenosina difosfato (ADP) e la serotonina, calcio e fattore attivante le piastrine (PAF), coinvolti nell'attivazione di altre piastrine e nella promozione degli effetti biologici di queste su altre cellule coinvolte nei processi coagulativi. Inoltre, studi di proteomica hanno

mostrato come le piastrine stimulate da trombina rilascino più di 300 differenti tipi di proteine, molte delle quali associate con l'infiammazione (23).

Le piastrine possono essere attivate da fattori circolanti nel sangue o dal collagene sub-endoteliale esposto in seguito a danno endoteliale. L'interazione tra componenti di placca aterosclerotica esposti, recettori piastrinici e fattori della coagulazione porta all'attivazione piastrinica, aggregazione e conseguente formazione di trombi (i.e. malattia aterotrombotica) che può compromettere la pervietà del lume arterioso.

Due molecole principali sono coinvolte in questo processo: il fattore di von Willebrand (vWF) e la glicoproteina Ib (GIIb). Il vWF è una proteina adesiva sintetizzata dalle cellule endoteliali e nei megacariociti, ed è presente negli α granuli delle piastrine. Questa proteina multimerica contiene diversi siti funzionali (domini), responsabili dell'attività biologica che coinvolge l'interazione con numerose altre molecole. Questi eventi sono influenzati dalle forze emodinamiche presenti all'interno dei vasi: le alte forze di scorrimento tendono a spingere le piastrine verso la superficie vasale dove aderiscono quando trovano una soluzione di continuo. Il collagene rappresenta la maggioranza delle proteine della matrice extracellulare ed un ruolo determinante nell'emostasi spetta ai collagene di tipo I, III, e VI. Nel vWF sono stati identificati due siti di legame per il collagene di tipo VI ma solo un dominio A1 è responsabile dell'interazione con la GPIIb della membrana piastrinica. L'inizio dell'adesione piastrinica al vaso richiede il legame delle piastrine al collagene. A questo proposito collagene e vWF formano un'unità funzionale che genera il trombo iniziale. Il fattore di vWF contribuisce a reclutare le piastrine e il collagene determina un legame più stabile e duraturo che consente l'adesione piastrinica. La GPIV e le integrine $\alpha 2\beta 1$ sono i recettori implicati direttamente nel legame delle piastrine con il collagene. Dopo l'interazione con il collagene, le

piastrine sono fortemente attivate e rilasciano il contenuto dei granuli α e dei granuli densi. I meccanismi che portano all'interazione tra le piastrine sono determinati dalla presenza delle integrine $\alpha_{IIb}\beta_3$ che legano il fibrinogeno, fattori plasmatici e fattori rilasciati dalle piastrine. Il fibrinogeno agisce come un ponte di legame tra due recettori espressi in due differenti piastrine. Una volta che le piastrine sono attivate ed interagiscono tra di loro, avviene il rilascio, da parte delle piastrine, di fattori agonisti, tra cui l'ADP. La formazione di un innesco stabile di piastrine è necessario per la conversione del fibrinogeno in fibrina, che è mediato dalla trombina. La trombina è prodotta dal sangue e dalle cellule vascolari.

Esistono diversi meccanismi di stimolazione delle piastrine come, ad esempio, gli agonisti ADP, trombossano A2 (TxA2), noradrenalina, serotonina e trombina che interagiscono con recettori transmembrana legati a proteine G eterodimeriche legate al GTP; queste vie portano al rilascio di numerosi messaggeri intracellulari, come prodotti dell'idrolisi della fosfolipasi C, diacilglicerolo, inositolo 1,4,5-trifosfato e lo stesso trombossano A2 (TxA2).

Differenza di genere nella funzione piastrinica

Le più recenti acquisizioni sul ruolo delle piastrine nella fisiopatologia dell'aterotrombosi forniscono indizi e generano risposte a domande circa la possibilità che una modulazione peculiare nella reattività piastrinica possa influenzare il decorso clinico a prognosi peggiore delle CVD nella popolazione femminile.

Sono state descritte differenze di reattività piastrinica nella popolazione usando diversi metodi ed in risposta a vari stimoli. Le piastrine nelle donne senza coronaropatia sono più reattive di quelle degli uomini in risposta a concentrazioni standard di agonisti come l'ADP. Esistono diverse evidenze della differenza di genere nella funzione e nella reattività piastrinica negli animali e negli esseri umani. Nel caso

degli animali, sono stati ottenuti risultati contrastanti. Negli esseri umani gli studi sulla funzione piastrinica hanno osservato un aumento della reattività delle piastrine femminili rispetto a quelle maschili.

In particolare, le piastrine dei soggetti di sesso femminile presentano più alti livelli di attivazione tramite le vie dell'adenosina-5-difosfato (ADP), acido arachidonico (AA), epinefrina e collagene. Tra le pazienti senza malattia apparente, le piastrine legano molto più fibrinogeno in risposta a basse e alte concentrazioni di ADP ed hanno mostrato una aggregazione spontanea più elevata rispetto agli uomini dopo aggiustamento per fattori di rischio come fumo, ipertensione, diabete, iperlipidemia ed uso di aspirina (24). Usando la citometria a flusso, Faraday e collaboratori (25) hanno dimostrato come esistano differenze di genere nel numero di siti di legame per il fibrinogeno e per la componente di attivazione delle pro-caspasi (PAC-1), un marcatore di attivazione delle piastrine. Questi autori hanno mostrato come, in risposta a stimolazione con ADP, il numero di complessi recettoriali della glicoproteina IIb/IIIa (GPIIb-IIIa) capaci di legare il fibrinogeno era significativamente più alto nelle piastrine delle donne. Similmente, il numero di recettori GPIIb-IIIa (capaci di legare PAC-1 in risposta allo stimolo con ADP) ed il peptide trombina recettore attivato (TRAP) era dal 50% all'80% più alto nelle donne rispetto agli uomini. Analisi successive dei dati derivanti da sottogruppi di donne, hanno dimostrato un'associazione tra reattività dei recettori GPIIb-IIIa e la fase luteale piuttosto che quella follicolare del ciclo mestruale, suggerendo in questo modo che, gli ormoni possano regolare l'attivazione di questi recettori. Questi dati sono in accordo con l'ipotesi, parzialmente verificata, di come esista un'attività piastrinica aumentata durante la fase luteale. È stato suggerito che i recettori GPIIb-IIIa delle piastrine di donne in pre-menopausa siano molto più reattivi e predisposti

all'attivazione rispetto a quelli delle piastrine di giovani uomini, in correlazione con i livelli sierici di estrogeni e/o progestinici. In aggiunta, Roshan e collaboratori (26) hanno mostrato valori significativamente più alti di recettore PAC-1 in donne in post-menopausa rispetto un gruppo di donne in pre-menopausa, suggerendo altresì un ruolo delle piastrine nell'incidenza di eventi trombotici in associazione con la diminuzione dei livelli di estradiolo.

GeneSTAR (Genetic Study of Aspirin Responsiveness), prendendo in analisi una popolazione di donne e uomini sani, ha dimostrato una maggiore reattività piastrinica nelle donne rispetto agli uomini, in risposta a differenti concentrazioni di acido arachidonico, ADP e noradrenalina dopo correzione per età, fattori di rischio, razza, stato menopausale e terapia ormonale (24). In seguito ad una terapia a basse dosi di aspirina, donne e uomini hanno mostrato diminuzioni dell'inibizione piastrinica in risposta all'acido arachidonico. Nei soggetti di sesso femminile, però, le piastrine rimangono significativamente più reattive di quelle degli uomini in risposta al collagene o alla stimolazione da ADP; ad esempio, nelle donne, dopo terapia con aspirina, l'aggregazione piastrinica in risposta a 5µg/ml di collagene è risultata essere del 31.8% contro il 27.2% negli uomini ($p < 0.001$) (24). Altre evidenze riguardo l'esistenza di differenze piastriniche correlate al genere derivano da studi basati sulla tromboelastografia che mostrano una maggiore tendenza pro-trombotica nelle donne rispetto agli uomini, in termini di aumento della velocità e della forza di legame tra piastrine e fibrina all'interno del coagulo (27).

Le piastrine attivate, attraverso il rilascio di citochine e ligandi immunomodulatori, mediano una risposta infiammatoria che amplifica a sua volta la risposta piastrinica stessa e l'attivazione endoteliale che avviene in conseguenza della rottura di una placca aterosclerotica (28). In conseguenza della rottura di una placca, l'esposizione

del suo contenuto promuove l'adesione dei recettori delle piastrine e delle integrine al fattore di von Willebrand ed al collagene del subendotelio. Le piastrine attivate inoltre, rilasciano fattori infiammatori, che si legano ai leucociti formando aggregati di leucociti-piastrine, facilitano il rilascio di citochine pro-infiammatorie e promuovono una risposta infiammatoria all'interno del vaso.

Nello Woman's Health Study, tra le donne sane in post-menopausa, alti livelli di proteina C reattiva (CPR), il marcatore di infiammazione più studiato, costituiscono un fattore di rischio indipendente di morte cardiovascolare, infarto del miocardio non fatale, infarto cerebrale o necessità di rivascolarizzazione coronarica (29). Sebbene questo studio abbia mostrato l'utilità della proteina C reattiva in termini di predizione di rischio solo per gli uomini classificati a rischio intermedio e non per le donne (30), un'altra meta-analisi ha evidenziato un risk ratio per coronaropatia del 1.41 (95% IC: 1.13 a 1.75) tra le donne che avevano livelli di CPR >3.0mg/l vs <1.0mg/l (31). Altri marcatori infiammatori come la conta leucocitaria e l'espressione di P-selectina, se elevati, potrebbero essere predittivi di un evento cardiovascolare futuro.

La terapia anti-piastrinica presenta effetti pleotropici anti-infiammatori oltre agli effetti direttamente mediati dalle piastrine. In uno studio longitudinale, nel quale il 50% dei partecipanti era di sesso femminile, l'aspirina ha mostrato un effetto sinergico con le statine nel diminuire i livelli di CPR; tale sinergia non si modificava con il sesso. In uno studio controllato randomizzato, è stato dimostrato come la terapia con Clopidogrel sia associata ad una riduzione dei livelli di marcatori infiammatori, anche dopo correzione per sesso. Inoltre, è stato dimostrato come i livelli di CPR aumentino un mese dopo la sospensione di Clopidogrel, in questo caso senza significative differenze di genere (32).

Meccanismi che potrebbero spiegare queste differenze sono in corso di valutazione.

È ipotizzabile un coinvolgimento degli ormoni sessuali steroidei, in particolare del 17 beta estradiolo (E2) mediante i recettori per gli estrogeni (ER), che esercita effetti multipli, diretti ed indiretti, sulla fisiologia cardiovascolare.

Fisiologia del ciclo mestruale

L'attività ovarica, nella donna, inizia nella pubertà in risposta alla secrezione di gonadotropine (GnRH) da parte dell'ipofisi (ormone luteinizzante, LH; ormone follicolo-stimolante, FSH). Nell'ovaio, sotto l'effetto delle gonadotropine, FSH e LH, avviene lo sviluppo follicolare, l'ovulazione e la secrezione degli ormoni estrogeni e progesterone. I follicoli primari sono spinti a maturazione dal rapporto FSH/LH che è utile quando è a favore dell'FSH.

GnRH e FSH stimolano i follicoli primari; uno completerà il ciclo fino all'ovulazione, gli altri andranno incontro a degenerazione (fase follicolare).

Sotto l'influenza dell'FSH le cellule follicolari secernono estrogeno che opera un feedback negativo sulla secrezione ipofisaria di FSH (producendo anche inibina, follicolostatina ed activina che contribuiscono a regolare i livelli di FSH); quando gli estrogeni secreti raggiungono il livello più alto provocano la secrezione di LH che determina la rottura del follicolo (ovulazione) e l'espulsione dell'ovulo che migra verso le tube.

Le cellule follicolari rimaste subiscono una trasformazione costituendo il corpo luteo che secreta progesterone (fase luteinica). Se non avviene la fecondazione, in 14 giorni il corpo luteo si atrofizza, i livelli di progesterone in circolo cadono portando al distacco dell'endometrio (mestruazione). Al termine della fase luteinica, la caduta degli estrogeni e del progesterone "libera" l'ipofisi dal feedback negativo, con successivo progressivo aumento dei livelli di FSH e stimolazione di nuovi follicoli per il successivo ciclo mestruale.

Estrogeni e coagulazione

I megacariociti e le piastrine esprimono i recettori per gli estrogeni (ER) β e i recettori per gli androgeni (AR); l'espressione del recettore AR è regolata dal testosterone (33). Inoltre, la trascrizione dei recettori β degli estrogeni e quella degli androgeni sono up-regolate durante la differenziazione dei megacariociti. Gli effetti genomici nei megacariociti così come le proprietà di segnale nelle piastrine potrebbero contribuire alla differenza di genere nella funzione piastrinica.

Esistono diverse prove dirette e indirette di come gli ormoni sessuali influenzino la biologia piastrinica ma ci sono evidenze conflittuali degli effetti del ciclo mestruale su quest'ultima. In letteratura, è stato evidenziato come le piastrine delle donne leghino molto più fibrinogeno durante la fase luteale (solitamente della durata di 14 giorni, iniziando con l'ovulazione e terminando con la mestruazione) del ciclo mestruale rispetto alla fase follicolare, suggerendo una regolazione ormonale dell'attivazione delle glicoproteine IIb-IIIa (34). Il numero dei recettori α_2 adrenergici è risultato avere un picco all'inizio del mese ed una caduta a metà del ciclo mestruale. Tarantino et al. hanno osservato come l'adesione delle piastrine al collagene di tipo I sia caratterizzata da un periodo bifasico durante il ciclo mestruale (35). Al contrario, ulteriori studi non hanno riscontrato una significativa relazione tra aggregazione piastrinica e fasi del ciclo mestruale, contraccettivi orali o stato menopausale (28, 36). Sia i contraccettivi orali, sia fattori ormonali presenti in periodo peri-menopausale alterano l'espressione di proteine coinvolte nelle vie che regolano l'equilibrio tra coagulazione e fibrinolisi, aumentando i livelli e l'attività del fattore VII, promuovendo il legame del fibrinogeno alle piastrine ed aumentando i livelli di fibrinogeno e dell'inibitore dell'attivatore del plasminogeno (PAI-1) (28).

È possibile ipotizzare che, questi cambiamenti, possano contribuire ad aumentare il rischio trombotico.

La presenza di infiammazione sistemica è coinvolta negli effetti della relazione tra ormoni e rischio aterotrombotico. Studi clinici randomizzati (37) e trasversali hanno mostrato un aumento dei livelli di CPR nelle donne in post menopausa trattate con estrogeni. Tuttavia in un sottostudio caso controllo del Women's Health Initiative, i valori di CPR basali non hanno mostrato una significativa correlazione statistica con la terapia ormonale in termini di prevenzione del rischio cardiovascolare (38).

Molti studi hanno suggerito l'esistenza di una correlazione tra polimorfismi genetici per le glicoproteine piastriniche ed il rischio di eventi aterotrombotici (39), ma si conosce ancora poco circa l'impatto che questi polimorfismi, influenzati dal genere, possano avere sulla biologia piastrinica, sulla risposta al trattamento e sull'esito del paziente. La presenza di estrogeni e/o androgeni può inoltre influenzare l'espressione di geni codificanti per fattori indispensabili nel processo di emostasi come l'ossido nitrico sintasi (un inibitore dell'aggregazione piastrinica), la superossidodismutasi, la GP130 e il trombassano A2. È stato dimostrato come, in vitro, l'aggregazione piastrinica umana indotta dall'acido arachidonico sia potenziata dagli androgeni e come, la terapia con androgeni, abbia incrementato la conta piastrinica in pazienti con trombocitopenia e mielodisplasia (33).

I livelli di ormoni possono influenzare la presenza di fattori della coagulazione e favorire la comparsa di una resistenza acquisita all'azione della proteina C attivata, portando ad un aumento del rischio di VTE. Durante il ciclo mestruale è stata evidenziata una diminuzione dei livelli di fattore di von Willebrand (VWF), di fibrinogeno e fattore VII attivato. La gravidanza invece, come è noto, è uno stato pro-coagulante con progressivo aumento dei fattori VII, VIII, X, XII, fibrinogeno e VWF,

come anche un aumento della resistenza alla proteina C attivata. Durante il periodo post-menopausale, fattori genetici ed ambientali modulano negativamente l'espressione di proteine coinvolte nei processi emostatici portando ad una modulazione a differenti livelli (coagulazione, fibrinolisi, attivazione piastrinica, endotelio vascolare) (40). Questo potrebbe spiegare la più alta incidenza di trombosi arteriosa e venosa nelle persone anziane rispetto a quelle giovani.

Terapia estrogenica

La terapia con estrogeni ha effetti rilevanti nella gestione clinica di una varietà di condizioni morbose. La terapia con estrogeni orali è in effetti, clinicamente efficace ma, a seconda della via di somministrazione e dal tipo e dose di estrogeni può anche essere accompagnata da gravi effetti avversi che sono associati con alterazioni nel metabolismo epatico. In particolare, la somministrazione di estrogeni sintetici ha effetti su proteine plasmatiche derivanti dal fegato, fattori della coagulazione, lipoproteine e trigliceridi; al contrario, la somministrazione parenterale di estradiolo ha influenze minime su questi aspetti della funzione epatica. Per quanto riguarda l'emostasi, il trattamento con estrogeni orali (ma non trans-dermici) sembra influenzare alcune proteine regolatorie della coagulazione (inibitore del fattore tissutale, proteina S, proteina C e antitrombina) mentre aumenta i livelli di fattori pro-coagulanti VII, X, XII e i frammenti di protrombina 1+2. Questo squilibrio è associato ad un aumento dell'attivazione della coagulazione, nella quale, l'aumento dei livelli dei fattori rilasciati dalle cellule endoteliali (von Willebrand, fattore VIII) può giocare un ruolo importante (41).

Possibile differenza di genere in risposta alla terapia antiplastrinica

È noto come differenze di genere condizionino la risposta ai farmaci sia in ambito farmacodinamico che cinetico. Una più approfondita conoscenza dei fattori che

contribuiscono alle differenze di genere osservate nella biologia piastrinica è auspicabile in particolare per verificare l'efficacia dei farmaci antiplastrinici.

In tale contesto, si sta facendo strada la teoria del ruolo degli ormoni nel mediare l'attivazione piastrinica ed il differente beneficio dei farmaci antiplastrinici nelle donne. Infatti, in studi di prevenzione primaria con aspirina (ASA), le donne in trattamento presentano l'infarto del miocardio allo stesso modo delle non trattate, mentre si evidenzia una sostanziale protezione dall'evento cerebrovascolare acuto (42). Inoltre è stata documentata una minore percentuale di inibizione piastrinica in donne che assumono ASA in prevenzione secondaria.

Il Women's Health Study (WHS) (20) ha valutato l'efficacia e la sicurezza dell'aspirina in 39876 donne sane con più di 45 anni, randomizzate in due gruppi, il primo in terapia con 100 mg di aspirina a giorni alterni, il secondo trattato con placebo, monitorandole per 10 anni. Il trattamento con aspirina ha mostrato una riduzione non significativa del rischio di eventi cardiovascolari maggiori, un aumento non significativo nel rischio di infarto cerebrale emorragico ed un effetto non significativo sul rischio di infarto del miocardio o morte cardiovascolare. L'effetto dell'aspirina non è stato modificato dalla menopausa, l'utilizzo o meno della terapia sostitutiva ormonale dopo la menopausa o il rischio cardiovascolare. Come atteso, la frequenza di effetti avversi correlati al sanguinamento ed alle ulcere gastriche sono aumentati tra le donne in trattamento con aspirina.

La metanalisi del gruppo Antithrombotic Trialists (42), in cui sono stati presi in esame sei studi clinici randomizzati sulla prevenzione primaria con aspirina (dei quali tre condotti solo negli uomini ed uno solo con donne) su 95000 partecipanti ha evidenziato un significativo declino di eventi coronarici e vascolari maggiori negli uomini ma non nelle donne, sia in prevenzione primaria che secondaria.

Molte ipotesi sono state fatte per spiegare le differenze legate al genere nell'effetto cardioprotettivo dell'aspirina: la biologia piastrinica, il metabolismo dell'aspirina, così come la resistenza all'aspirina, che tende ad essere più comune nelle donne che negli uomini (43).

L'aumento dell'incidenza di malattie cardiovascolari in post-menopausa rispetto alle donne in pre-menopausa è correlato ad una diminuzione dei livelli di estrogeni, sebbene i risultati degli studi che valutano l'effetto di terapie sostitutive in termini di rischio cardiovascolare sia contraddittorio; la discrepanza potrebbe essere dovuta al tipo di estrogeno o al tempo di inizio della terapia sostitutiva (19). L'aspirina potrebbe bilanciare l'aumentato rischio trombotico nelle donne in post-menopausa in terapia ormonale sostitutiva.

Nella meta-analisi ATT, non sono stati evidenziati dati significativi di influenza tra genere e effetti dell'aspirina rispetto al placebo per quanto riguarda la prevenzione cardiovascolare secondaria: in particolare la riduzione del rischio relativo di eventi coronarici maggiori durante il follow-up con aspirina era del 19% nei maschi e 27% nelle femmine e del 19% in entrambi i generi per eventi vascolari maggiori (infarto del miocardio, infarto cerebrale, morte vascolare). Berger et al. hanno realizzato una meta-analisi analizzando cinque studi clinici randomizzati comparando il clopidogrel rispetto al placebo in aggiunta all'aspirina comprendenti 79613 donne con coronaropatia o donne ad alto rischio di recidiva (44). Si è evidenziato come il rischio assoluto di eventi durante il follow-up sia più alto nelle donne rispetto agli uomini: tra le 23533 donne valutate solo il rischio di infarto del miocardio si è significativamente ridotto, mentre, i soggetti di sesso maschile hanno mostrato una riduzione anche per l'infarto cerebrale ed altre cause di mortalità. Inoltre, il beneficio della terapia con clopidogrel è ridotto nelle donne (7%) rispetto agli

uomini (16%). Nel trial randomizzato con Prasugrel (45) e Ticagrelor (46), sebbene la riduzione nell'obiettivo primario era relativamente piccola nelle donne rispetto agli uomini (morte per cause cardiovascolari, infarto del miocardio non fatale, infarto cerebrale non fatale) non è stata notata una significativa interazione tra sesso e trattamento assegnato.

I polimorfismi degli alleli del citocromo P-450 e 2C19 sono stati associati con la variabilità di risposta al clopidogrel. Sono stati osservati sia un più alto rischio di sanguinamenti maggiori (47) che di trombosi di stent (48) dipendenti dalla presenza di genotipi differenti (rispettivamente guadagno di funzione e perdita di funzione). Questo tipo di polimorfismi sono equamente distribuiti tra uomini e donne e seppur non esistono differenze nell'outcome in base al genere, sono comunque studi utili per approfondire eventuali interazioni gene-gene e gene-ambiente.

Negli studi con gli inibitori del GP IIb/IIIa sono state osservate numerose interazioni tra trattamento e sesso. Negli uomini con sindrome coronarica acuta (ACS), l'uso di questi inibitori rispetto al placebo è associato a una riduzione significativa di morte o infarto del miocardio a 30 giorni, mentre le donne presentano un outcome peggiore (49). Esistono alcune ipotesi che potrebbero spiegare questi risultati: le donne arruolate erano di età più avanzata, presentavano maggiori comorbidità e presentavano un infarto del miocardio maggiormente esteso rispetto agli uomini.

Senza dubbio, la scoperta che i ER sono espressi sulle piastrine rende queste cellule un modello eccellente per studiare gli effetti non-genomici degli ormoni steroidei sessuali sulla biologia piastrinica e sulla risposta ai farmaci antiplastrinici.

Utilizzando modelli animali, Valerà et al. (50) hanno osservato come la cronica esposizione a livelli elevati fisiologici di E2 abbia un significativo effetto inibitorio sull'aggregazione piastrinica, indotta in differenti condizioni e con vari agonisti che

utilizzano differenti vie di trasduzione del segnale, suggerendo che gli estrogeni influenzino il meccanismo centrale che controlla la sensibilità globale piastrinica.

Pertanto, l'impatto degli estrogeni endogeni sull'attività piastrinica e sulla risposta ai farmaci antiplastrinici *in vivo* in donne non è stata ampiamente valutata.

Le numerose evidenze sulle differenze di genere riguardo la prevalenza delle malattie cardiovascolari, la loro eziopatogenesi, la gestione terapeutica e la morbilità necessitano di ulteriori approfondimenti e studi clinici randomizzati.

Per colmare questa “gap in evidence” e trovare un supporto per ottimizzare la terapia cardiovascolare con un approccio orientato al genere, abbiamo pianificato questo studio “proof of concept” per valutare l'effetto degli estrogeni endogeni (ciclo mestruale) sulla funzione piastrinica.

2. Obiettivo dello studio

L'obiettivo del presente studio è di valutare se esista una relazione tra funzione piastrinica *in-vivo* e le variazioni degli ormoni sessuali durante un fisiologico ciclo mestruale, di regolare durata (28 ± 2 giorni), in donne sane di età compresa tra i 18 ed i 40 anni.

3. Materiali e metodi

3.1 Disegno dello studio

Donne sane con cicli mestruali regolari di 28 ± 2 giorni sono state arruolate in modo consecutivo nel presente studio, presso i servizi dedicati nel Dipartimento di Medicina Interna e Specialità Mediche.

La selezione delle pazienti è avvenuta secondo i seguenti criteri di eleggibilità e di inclusione/esclusione:

CRITERI INCLUSIONE	CRITERI ESCLUSIONE
<ul style="list-style-type: none"> - Donne sane in pre-menopausa. - Et� compresa tra 18 e 40 anni. - Firma del consenso informato scritto. 	<ul style="list-style-type: none"> - Storia di recente (entro gli ultimi 2 mesi) assunzione di anticoagulanti, antinfiammatori non steroidei, contraccettivi orali o progestinici, gravidanza. - Presenza di patologie renali, epatiche, cardiologiche, endocrinologiche e/o infettive nei due mesi precedenti lo studio. - Assenza di storia clinica di patologie trombotiche ed emorragiche. - Uso cronico di farmaci.

Lo studio ha previsto la raccolta dei seguenti dati/campioni:

- Raccolta dati anamnestici personali e familiari (assunzione di alcol, fumo, attivit  fisica, anamnesi familiare per patologia cardiovascolare precoce);
- Raccolta di dettagliata anamnesi ginecologica (menarca, caratteristiche del ciclo mestruale, pregresso uso di estroprogestinici, pregresse gravidanze e storia di poliabortivit );

- Raccolta parametri clinici (peso, altezza, pressione arteriosa sistolica e diastolica, frequenza cardiaca e temperatura corporea);
- Prelievo ematochimico per la valutazione dello stato ormonale e dell'attività piastrinica *in vivo*.

Sono stati raccolti campioni ematici in quattro tempi ben definiti del ciclo mestruale delle donne arruolate:

- T1: “fase mestruale”, corrispondente al primo giorno della mestruazione
- T2: “fase follicolare”, corrispondente al giorno 5 ± 2
- T3: “fase ovulatoria”, corrispondente al giorno 14 ± 2
- T4: “fase luteinica”, corrispondente al giorno 21 ± 2

Le partecipanti allo studio dovevano essere a digiuno da almeno 12 ore per poter effettuare il prelievo ematico.

Ad ogni tempo stabilito sono stati valutati:

1) Profilo Ormonale

Sono stati dosati, mediante metodiche radioimmunologiche, i livelli circolanti dei seguenti ormoni steroidi:

- Estradiolo (pg/ml)
- Progesterone (ng/ml)
- Testosterone (ng/dl)
- Ormone luteinizzante (mIU/ml)
- Ormone follicolostimolante (mIU/ml)

2) Attività piastrinica *in vivo*

Per la valutazione della funzione piastrinica e dei meccanismi di attivazione piastrinica stress ossidativo dipendenti state eseguite le seguenti analisi:

- Analisi del CD40Ligando solubile (sCD40L) e della P-selectina solubile (sPs)
- Dosaggio Trombossano B2 sierico (TxB₂)
- Dosaggio del peptide solubile di rilascio della NOX2 (sNOX2).

3.2. Metodi di laboratorio

Tutti i dosaggi sono stati effettuati in cieco. I campioni analizzati mediante metodiche immunoenzimatiche sono stati testati in duplicato, quelli con concentrazioni eccedenti la curva standard sono stati riesaminati dopo opportuna diluizione.

3.2.1. Misurazione dell'attività piastrinica *in vivo*

Analisi del sCD40L e della sPs

I livelli plasmatici del sCD40L e della sPs sono stati analizzati usando kit EIA (enzyme immunoassay) specifici (R&D System).

I coefficienti di variazione inter ed inter-saggio sono <10%.

Dosaggio trombossano B sierico (TxB₂)

I livelli plasmatici e sierici di trombossano sono stati analizzati utilizzando un kit EIA specifico (Amersham Pharmacia, Biotech, Little Chalfont, UK); i coefficienti di variazione intra- ed inter-saggio sono, rispettivamente, 4% e 3.6%.

Analisi dei livelli sierici di sNOX2-dp

I livelli sierici di NOX2 solubile sono stati determinati attraverso una metodica ELISA così come precedentemente descritto da Pignatelli et al. (51); i coefficienti di variazione intra- ed inter-saggio sono, rispettivamente, 5.2% e 6%.

3.2.2 Dosaggi ormonali

Estradiolo (E2)

I livelli plasmatici e sierici di estradiolo (pg/ml) sono stati analizzati utilizzando un kit specifico con tecnologia CMIA (Chemiluminescent Microparticle Immunoassay) nel quale l'estradiolo presente nei campioni si lega a micro particelle anti-estradiolo con un rivestimento paramagnetico e, successivamente a due differenti fasi di incubazione e lavaggio ed all'aggiunta della soluzione finale si ottiene una reazione chemiluminescente misurabile tramite RLUs (relative light units).

La relazione tra la quantità di estradiolo nel campione e le RLUs rilevate dal sistema, è inversa (Architect Estradiol Assay, Abbott Diagnostic Division, Ireland).

La capacità del test ed i coefficienti di variazione inter ed inter-saggio sono, rispettivamente, 5 pmol/l, 7.4 and 10%.

Progesterone (PG)

I livelli plasmatici e sierici di progesterone (ng/mL) sono stati analizzati utilizzando un kit specifico con tecnologia CMIA (Chemiluminescent Microparticle Immunoassay) nel quale si vengono a formare complessi antigene-anticorpo. In seguito ad una fase di lavaggio ed all'aggiunta della soluzione finale si ottiene una reazione chemiluminescente misurabile tramite RLUs (relative light units).

La relazione tra la quantità di progesterone nel campione e le RLUs rilevate dal sistema, è inversa (Architect Estradiol Assay, Abbott Diagnostic Division, Ireland).

La capacità del test ed i coefficienti di variazione inter ed inter-saggio sono, rispettivamente, 0.6 nmol/l, 9.6 and 9.9%.

Testosterone (TE)

I livelli plasmatici e sierici di testosterone (ng/dL) sono stati analizzati utilizzando un kit specifico con tecnologia CMIA (Chemiluminescent Microparticle Immunoassay) nel quale si vengono a formare complessi antigene-anticorpo. In seguito ad una fase di lavaggio ed all'aggiunta della soluzione finale si ottiene una reazione chemiluminescente misurabile tramite RLUs (relative light units).

La relazione tra la quantità di testosterone nel campione e le RLUs rilevate dal sistema, è inversa (Architect Estradiol Assay, Abbott Diagnostic Division, Ireland).

La capacità del test ed i coefficienti di variazione inter ed inter-saggio sono, rispettivamente, 0.25 nmol/l, < 10%.

Ormone luteinizzante (LH)

I livelli plasmatici e sierici di ormone luteinizzante (mIU/ml) sono stati analizzati utilizzando un kit specifico con tecnologia CMIA (Chemiluminescent Microparticle Immunoassay) nel quale l'ormone luteinizzante (LH) presente nei campioni si lega a micro particelle anti-LH con un rivestimento paramagnetico e, successivamente ad una fase di incubazione e lavaggio ed all'aggiunta della soluzione finale si ottiene una reazione chemiluminescente misurabile tramite RLUs (relative light units).

La relazione tra la quantità di ormone luteinizzante nel campione e le RLUs rilevate dal sistema, è diretta (Architect Estradiol Assay, Abbott Diagnostic Division, Ireland).

La capacità del test ed i coefficienti di variazione inter ed inter-saggio sono, rispettivamente, 0.001 mIU/l, 2.3%.

Ormone follicolo-stimolante (FSH)

I livelli plasmatici e sierici di ormone follicolo-stimolante (mIU/ml) sono stati analizzati utilizzando un kit specifico con tecnologia CMIA (Chemiluminescent Microparticle Immunoassay) nel quale l'ormone follicolostimolante (FSH) presente nei campioni si lega a micro particelle anti-FSH con un rivestimento paramagnetico e, successivamente ad una fase di incubazione e lavaggio ed all'aggiunta della soluzione finale si ottiene una reazione chemioluminescente misurabile tramite RLUs (relative light units).

La relazione tra la quantità di ormone follicolo-stimolante nel campione e le RLUs rilevate dal sistema, è diretta (Architect Estradiol Assay, Abbott Diagnostic Division, Ireland).

La capacità del test ed i coefficienti di variazione inter ed inter-saggio sono, rispettivamente, 0.001 mIU/l, 2.5%.

3.3. Dimensione del campione

Abbiamo pianificato di includere nello studio n=22 donne in pre-menopausa. Utilizzando per l'analisi un t-test per misure ripetute, questa dimensione campionaria ci permetterà di evidenziare, con una potenza del 90% ed un errore α dello 0.05%, una differenza del 30% tra valori del trombossano urinario al tempo base (primo giorno del ciclo mestruale - ipotizzabili di circa 210 pg/mg creatinina con una deviazione standard pari a 40 pg/mg creatinina) (49) ed i valori nella fase estrogenica del ciclo mestruale.

3.4. Gestione del database ed Analisi Statistica

La gestione del database e le analisi statistiche dei dati sono state svolte a cura della UOC di Prima Clinica Medica - Centro per lo Studio della Trombosi e della Trombofilia dell'Azienda Policlinico Umberto I di Roma, Università "Sapienza".

L'analisi delle variabili continue è stata eseguita tramite l'utilizzo di T-test di Student per campioni dipendenti o tramite test ANOVA per i confronti tra più di due gruppi. Tutti i valori continui sono espressi come media \pm errore standard (SE). La distribuzione delle variabili categoriche tra i gruppi, espressa in numero e/o percentuale, è stata analizzata tramite l'utilizzo del test χ^2 . L'analisi delle associazioni tra i parametri di interesse ed ormoni nelle fasi del ciclo mestruale è stata effettuata mediante test di correlazione di Spearman. Un valore di probabilità < 0.05 è stato considerato come statisticamente significativo. Tutte le analisi statistiche sono state eseguite tramite l'utilizzo del software STATISTICA, versione 10.0 (STATSOFT, USA).

4. Risultati

4.1 Caratteristiche cliniche della popolazione in studio

Sono state arruolate 22 donne sane con un'età media di 30.3 ± 3.1 anni, normopeso (BMI medio= 21.2 ± 2.2).

L'età media della comparsa del menarca è risultata pari a 12.2 ± 1.2 anni e la durata media del ciclo mestruale è di 29.4 ± 3.1 giorni.

L'82% delle donne arruolate ha dichiarato di consumare alcool almeno 3 volte a settimana ed il 23% sono fumatrici.

Il 36.4% svolge attività fisica moderata-intensa (≥ 3 volte a settimana). Due tra le donne arruolate (9.1%) hanno avuto gravidanze, in entrambi i casi spontanee ed a termine. Il 54.5% ha utilizzato terapie contraccettive orali in passato. Infine, solo una tra le donne arruolate (4.5%) aveva una familiarità per malattia cardiovascolare precoce (Tabella 1).

4.2.1 Indici di attivazione piastrinica: andamento del TxB₂ nelle fasi del ciclo mestruale.

L'analisi del TxB₂ (pg/ml) ha evidenziato livelli significativamente aumentati, rispetto al T1, al T2 ($p=0.003$) e T4 ($p<0.001$), mentre sono risultati significativamente ridotti al T3 rispetto al T1 ($p=0.04$) e al T4 ($p<0.001$) (Figura 1).

Pertanto, rispetto al basale (fase mestruale), i valori di TxB₂ hanno presentato un andamento bifasico, aumentando in fase follicolare, riducendosi in fase ovulatoria per poi ri-aumentare in fase luteinica.

4.2.2 Indici di attivazione piastrinica: andamento del sPs nelle fasi del ciclo mestruale.

I livelli di sPs (ng/ml) mostrano di avere un aumento significativo nel T2 ($p=0.008$) rispetto al T1 mentre si riducono significativamente nel T3 ($p=0.008$) rispetto al T2 (Figura 2). I valori di sPs al tempo T2 e T4 sono entrambi elevati ma senza significativa differenza statistica.

Pertanto, in fase follicolare si assiste ad un incremento dei livelli circolanti di sPs che, dopo un decremento in fase ovulatoria, si ripresenta e mantiene in fase luteinica.

4.2.3. Indici di attivazione piastrinica: andamento della sCD40L nelle fasi del ciclo mestruale.

L'analisi dei livelli di sCD40L non ha mostrato variazioni significative nei quattro tempi presi in esame (Figura 3). Seppur i valori medi del CD40L risultavano in media più alti nella fase follicolare e luteinica rispetto alla fase mestruale in nessun caso si raggiungeva la significatività statistica.

4.3 Mediatori di attivazione piastrinica: andamento della sNOX2 nelle fasi del ciclo mestruale.

L'analisi della sNox2 (pg/ml), marcatore di stress ossidativo implicato nell'attivazione piastrinica, ha mostrato livelli significativamente aumentati al T2

rispetto al T1 ($p=0.0023$), significativamente ridotti al T3 rispetto al T2 ($p=0.02$), e di nuovo aumentati al T4 rispetto al T3 ($p=0.031$) (Figura 4).

In maniera analoga a quanto osservato per altri marcatori analizzati, si è osservato un andamento bifasico della sNOX2 con incremento in fase follicolare, seguito da un decremento significativo in fase ovulatoria, per poi ri-aumentare in fase luteinica.

4.4 Andamento ormonale nelle varie fasi del ciclo

La tabella 2 sintetizza le variazioni fisiologiche degli ormoni sessuali nelle 4 fasi del ciclo mestruale nelle 22 donne arruolate.

4.5 Studio delle correlazioni esistenti tra parametri di attivazione piastrinica e assetto ormonale nelle varie fasi del ciclo mestruale.

Considerando la presenza di variazioni dei parametri piastrinici nei 4 tempi del ciclo mestruale, abbiamo voluto valutare la possibile associazione con i livelli circolanti di ormoni sessuali dal momento che le piastrine esprimono sulla membrana recettori specifici per gli estrogeni e gli androgeni.

Considerando una suddivisione del ciclo mestruale in una fase proliferativa (T1 + T2) e in una fase secretiva (T3+T4), abbiamo messo in evidenza come in fase proliferativa esista una correlazione diretta tra TxB_2 e E2 ($R_s=0.62$, $p<0.05$) ed inversa tra TxB_2 e FSH ($R_s= -0.34$, $p<0.05$). In fase secretiva invece è stata evidenziata un'associazione tra sNOX2 e LH ($R_s=-0.47$, $p<0.05$).

Non sono state evidenziate ulteriori correlazioni tra indici di attivazione piastrinica ed ormoni sessuali.

5. Discussione

Il presente studio documenta come i biomarcatori di attivazione piastrinica in donne sane subiscano delle significative variazioni nelle diverse fasi del ciclo mestruale, che in parte sono giustificate dall'andamento degli ormoni sessuali, in particolare dell'estradiolo in fase proliferativa. Da notare che sia il TxB_2 che la sPs, nonché la sNOX2, riconosciuta come un mediatore di attivazione piastrinica *in vivo*, subiscono delle fluttuazioni durante il ciclo mestruale con degli incrementi in fase follicolare e in fase luteinica.

Negli ultimi anni, dall'applicazione della medicina di genere sta emergendo come, sebbene uomini e donne siano soggetti alle stesse CVD, tuttavia, presentino fattori di rischio, progressione di malattia e risposta al trattamento farmacologico differenti.

È stato ipotizzato come una modulazione peculiare nella reattività piastrinica possa influenzare il decorso clinico a prognosi peggiore delle CVD nella popolazione femminile (28).

Differenze di genere nella risposta piastrinica sono state descritte utilizzando diversi metodi di laboratorio ed in risposta a vari stimoli. In particolare, le piastrine di donne senza CVD sono più reattive di quelle degli uomini in risposta a concentrazioni standard degli agonisti. Meccanismi che potrebbero spiegare queste differenze sono in corso di valutazione. In particolare è ipotizzabile un coinvolgimento degli ormoni sessuali steroidei, in particolare del 17 beta estradiolo (E2) mediante i recettori per gli estrogeni (ER), che esercitano effetti multipli diretti ed indiretti sulla fisiologia cardiovascolare.

Gli effetti degli estrogeni sono mediati in parte dall'attivazione di due recettori: α (ER α) e β (ER β). Questi recettori funzionano come fattori di trascrizione regolando l'espressione di geni target e possono essere localizzati nel nucleo, nella membrana

plasmatica o nei mitocondri. Si ipotizza che i recettori per gli estrogeni nucleari e non nucleari non siano entità separate ma parte di un complesso meccanismo nel quale cooperano l'uno con l'altro (40).

Una plausibile spiegazione biologica dell'andamento bifasico fisiologico di alcuni dei marcatori oggetto del nostro studio risiede nel fatto che il sistema piastrinico si pre-allerta in corrispondenza di eventi acuti come l'ovulazione e il sanguinamento mestruale. È verosimile che gli effetti ormonali legati al ciclo mestruale agiscano mediante meccanismi ER mediati non genomici.

Una rapida risposta cellulare in seguito al legame con gli estrogeni, nell'arco di secondi o minuti, è infatti mediata dall'attivazione dei recettori non-nucleari, come quelli associati alle membrane (mERs). Questi rapidi effetti sono definiti non-genomici perché indipendenti dalla sintesi di proteine (52). Gli mERs sono localizzati nella componente lipidica della membrana plasmatica (microdomini arricchiti di colesterolo e sfingolipidi) e rappresentano approssimativamente tra il 5 e il 10% dei recettori ERs totali. Questa percentuale può includere sia i recettori ER α che ER β ma in base al tipo di cellula, sono state riscontrate delle differenze. Ad esempio, nelle cellule endoteliali vascolari, i recettori ER α e ER β sono stati riscontrati sia come omodimeri che come eterodimeri. Gli eterodimeri, probabilmente, mediano la rapida azione degli estrogeni nell'indurre vasodilatazione in vivo, dovuta alla rapida attivazione delle chinasi come la tirosin chinasi Src e la fosfatidilinositolo 3-OH chinasi (PI3k) oltre che da chinasi regolate da segnali extracellulari come ERK (serina treonina chinasi) e AKT (chinasi inibente l'apoptosi). L'attivazione di queste chinasi porta, tramite l'attivazione dell'ossido nitrico sintasi, alla produzione di ossido nitrico (NO) che modula il tono del muscolo liscio endoteliale. Studi recenti, hanno evidenziato, come questi recettori possano essere up regolati in condizioni di stress,

giocando un ruolo funzionale nel mantenere l'omeostasi cellulare (53). Difatti, l'attivazione dei recettori di membrana ER porta all'attivazione di IP3/AKT e MAPK chinasi. AKT, implicato nella proliferazione cellulare, regola la morte cellulare inibendo l'apoptosi ed inducendo l'autofagia. L'autofagia è una strategia lisosomiale conservata nell'evoluzione per degradare le proteine citoplasmatiche, le macromolecole e gli organelli, incentrata alla sopravvivenza e a discapito della morte cellulare (54). Un altro importante recettore ER è la proteina G estrogen-receptor 1 (GPER o GPR30), una proteina integrale di membrana con alta affinità per l'estradiolo ma non per l'estrogeno endogeno, come l'estrone o l'estriolo. Questa proteina lega l'estradiolo provocando la mobilitazione del calcio intracellulare e la sintesi di fosfatidilinositolo 3,4,5-trifosfato nel nucleo, giocando così un ruolo importante nella risposta rapida non genomica (40).

Gli estrogeni possono modificare la funzione delle piastrine attraverso l'interazione con i recettori ER. Moro e collaboratori hanno osservato che concentrazioni di E2 (100nM) determinano l'entrata di calcio e l'aggregazione piastrinica in modo sinergico con la trombina (un agonista fisiologico dell'aggregazione piastrinica) (55). In particolare il 17 β -estradiolo causa una rapida fosforilazione delle tirosin chinasi Src e Pyk2 e la formazione di complessi di segnale, che includono Src, Pyk2 e la fosfatidilinositolo 3 chinasi. Questi eventi sono dipendenti dal legame del recettore con l'estrogeno. Questi autori suggeriscono come le piastrine siano un eccellente modello per studiare gli effetti non genomici degli ormoni. Seguendo questa ipotesi, è stato dimostrato che concentrazioni (1.0-10.0 μ M) di E2 e molti metaboliti e analoghi dell'estradiolo, sono in grado di potenziare (all'incirca raddoppiare) l'azione della trombina nell'elevare le concentrazioni di ioni Ca²⁺ nelle piastrine, probabilmente attraverso ER β . Questi rapidi effetti di E2 sono stati ottenuti da alte concentrazioni di

steroidi, con livelli sierici di β estradiolo nel range di 50-200 pg/ml (41). Nakano e collaboratori (56) hanno dimostrato come, la terapia sostitutiva con estrogeni aumenti la fisiologica concentrazione di estrone ed estradiolo e come, l'aggregazione piastrinica venga inibita. Sulla base di questi risultati è possibile dedurre come, la risposta agli estrogeni, possa dipendere dal tipo e dalla dose di induttore di attivazione piastrinica (40).

Un importante contributo arriva dagli studi di Maccarone et al. (57); questi studi hanno evidenziato come nelle piastrine i mERs siano presenti ed agiscano come recettori funzionali capaci di attivare rapidamente segnali di vie intracellulari. Ad esempio, è stato recentemente dimostrato che i segnali non genomici mediati da ER α intervengono nella modulazione della proteina piastrinica precursore dell'amiloide (58). Entrambi i tipi recettoriali sono stati descritti ma i recettori ER β sembrano essere predominanti nelle piastrine di umani, maiali e topi. Reineri et al. hanno mostrato come gli estrogeni siano in grado di potenziare l'aggregazione piastrinica indotta da basse dosi di trombina e di favorire la via di segnale mediata da mER β che conduce all'attivazione di Src e Pyk2 chinasi. È da menzionare, inoltre che Khetawat e coll. (33) hanno riscontrato livelli comparabili di ER β (ed AR) nelle piastrine di uomini e donne, suggerendo che l'espressione dei recettori non può essere la sola responsabile della differenza di genere nella funzione delle piastrine (59). Questi dati comunque non escludono la possibilità che variazioni nel tempo dell'espressione dei recettori possano essi stessi alterare la sintesi di proteine che influenzano i megacariociti o la fisiologia delle piastrine, come ad esempio la transitoria up-down regolazione di mER, che potrebbe rappresentare un importante segnale intracellulare (40).

Come ampiamente descritto, esistono molte prove dirette ed indirette di come gli ormoni sessuali influenzino la biologia delle piastrine.

È stato osservato che molte proprietà delle piastrine variano in relazioni a fasi del ciclo mestruale. Ad esempio, le piastrine, nella popolazione femminile, legano molto più fibrinogeno durante la fase luteale del ciclo mestruale rispetto alla fase follicolare.

Una delle ipotesi a sostegno di questa sostanziale differenza, è rappresentata da una possibile regolazione ormonale dell'attivazione dell'integrina $\alpha_{IIb}\beta_3$, che rappresenta il maggior meccanismo di interazione tra le piastrine. Nel suo stato di inattività l'integrina $\alpha_{IIb}\beta_3$ non è in grado di legare il fibrinogeno.

In seguito a stimolazione, il numero di integrine sulla superficie piastrinica aumenta, portando al legame con il fibrinogeno ed il vWF. Inoltre, anche l'adesione piastrinica al collagene mostra un picco bifasico durante il ciclo mestruale (60).

La dimostrazione di un effetto del ciclo mestruale sui livelli circolanti di biomarcatori piastrinici in soggetti sani, come le donne arruolate nel presente studio, ha delle importanti implicazioni cliniche.

Molto spesso, nella pratica clinica, utilizziamo i biomarcatori a scopo diagnostico e per monitorizzare le terapie non tenendo presente di come, soprattutto nella popolazione femminile, la variabilità dei biomarcatori potrebbe essere influenzata dall'azione degli ormoni sessuali.

La nostra analisi ha evidenziato una correlazione tra E2, FSH ed LH e la variazione di alcuni marcatori di attivazione piastrinica.

Tuttavia, il presente studio ha arruolato un piccolo campione di donne, trattandosi di uno studio pilota: pertanto ulteriori studi in questo senso però risultano indispensabili per comprendere meglio l'utilizzo e il beneficio di alcuni parametri di laboratorio nella pratica clinica

A fronte di questo risultato, si è evidenziata una differenza statisticamente significativa nell'andamento degli indici di attivazione piastrinica nelle varie fasi del ciclo, in particolar modo tra la fase follicolare e la fase luteinica.

Sia il peptide solubile della Nox2 (sNox2), che il trombossano B2 e la P-Selectina mostrano un andamento simile, con un aumento nella fase follicolare rispetto alla fase mestruale, una riduzione nella fase ovulatoria ed un successivo aumento nella fase luteinica.

Questo risultato è in accordo con l'evidenza di come le piastrine, nelle donne, leghino più fibrinogeno nella fase luteinica rispetto alle altre fasi (60).

Nella fase ovulatoria, in seguito all'aumento degli estrogeni ed alla secrezione di LH, si ha la rottura del follicolo (ovulazione) con l'espulsione dell'ovulo che migra verso le tube per andare incontro ad un'eventuale impianto; è possibile speculare sulla riduzione riscontrata dell'attivazione piastrinica che potrebbe essere implicata nella fisiologia dell'ovulazione, per non ostacolare un eventuale impianto dell'ovulo fecondato. Inoltre, conferma il riscontro di Valerà et al. (50) in cui, in modelli animali, la cronica esposizione a livelli elevati fisiologici di E2, e quindi successivamente di LH, ha effetto inibitorio sull'aggregazione piastrinica.

Parimenti, nella fase luteinica, si è evidenziato un aumento dell'attivazione piastrinica; questo può essere correlato con il flusso mestruale, per evitare la comparsa di una mestruazione eccessivamente abbondante.

Dati sporadici in letteratura hanno evidenziato che alcuni degli ormoni implicati nella regolazione del ciclo mestruale possono condizionare i livelli di trombossano.

La nostra analisi su tutti i soggetti arruolati ha evidenziato una correlazione tra i livelli di FSH ed i livelli di TxB2 (fase proliferativa), in corrispondenza quindi del

momento in cui i livelli di FSH sono aumentati per la stimolazione dei follicoli primari e produzione di estrogeni.

Si è evidenziata poi una correlazione tra i livelli di LH e di P-Selectina al T3 ed al T4 (fase secretiva), in corrispondenza del momento di aumento di secrezione di LH, stimolato a sua volta dall'aumentata produzione di estrogeni.

Infine, la correlazione tra estradiolo e trombociti B2 evidenziata nella fase proliferativa del ciclo mestruale sembrerebbe orientare e supportare l'ipotesi di come gli estrogeni, tramite i propri recettori espressi sulle piastrine possano influenzare l'attivazione piastrinica, in specifiche fasi del ciclo mestruale.

Attualmente, i dati sono suggestivi ma non sufficienti per confermare l'ipotesi di una regolazione degli ormoni sessuali nei confronti dell'attivazione piastrinica.

6. Conclusioni

Dalla scoperta dell'espressione dei recettori degli estrogeni sulle piastrine, si è iniziata a valutare la possibilità che gli ormoni sessuali, in particolare gli estrogeni, possano influenzare l'attivazione piastrinica.

Di conseguenza, viste le differenze di sesso e genere che caratterizzano la clinica e la prognosi delle patologie cardiovascolari e visto il riscontro dei recettori per gli estrogeni sulla superficie piastrinica, è ipotizzabile come gli estrogeni possano essere implicati, tramite una modulazione peculiare dell'attivazione piastrinica, nell'influenzare il decorso clinico a prognosi peggiore delle patologie del sistema cardiovascolare nei soggetti di sesso femminile.

Il nostro studio, disegnato per valutare l'impatto degli estrogeni endogeni (ciclo mestruale) sulla funzione piastrinica, mostra dei dati preliminari che, in parte, supportano l'ipotesi che esista un'influenza degli ormoni sessuali sull'attivazione piastrinica, in modo eterogeneo a seconda nelle differenti fasi del ciclo mestruale. Essendo necessari ulteriori studi per poter supportare e confermare i risultati evidenziati da questa analisi preliminare, attualmente stiamo ampliando la casistica delle donne sane in età pre-menopausale.

Figure e tabelle

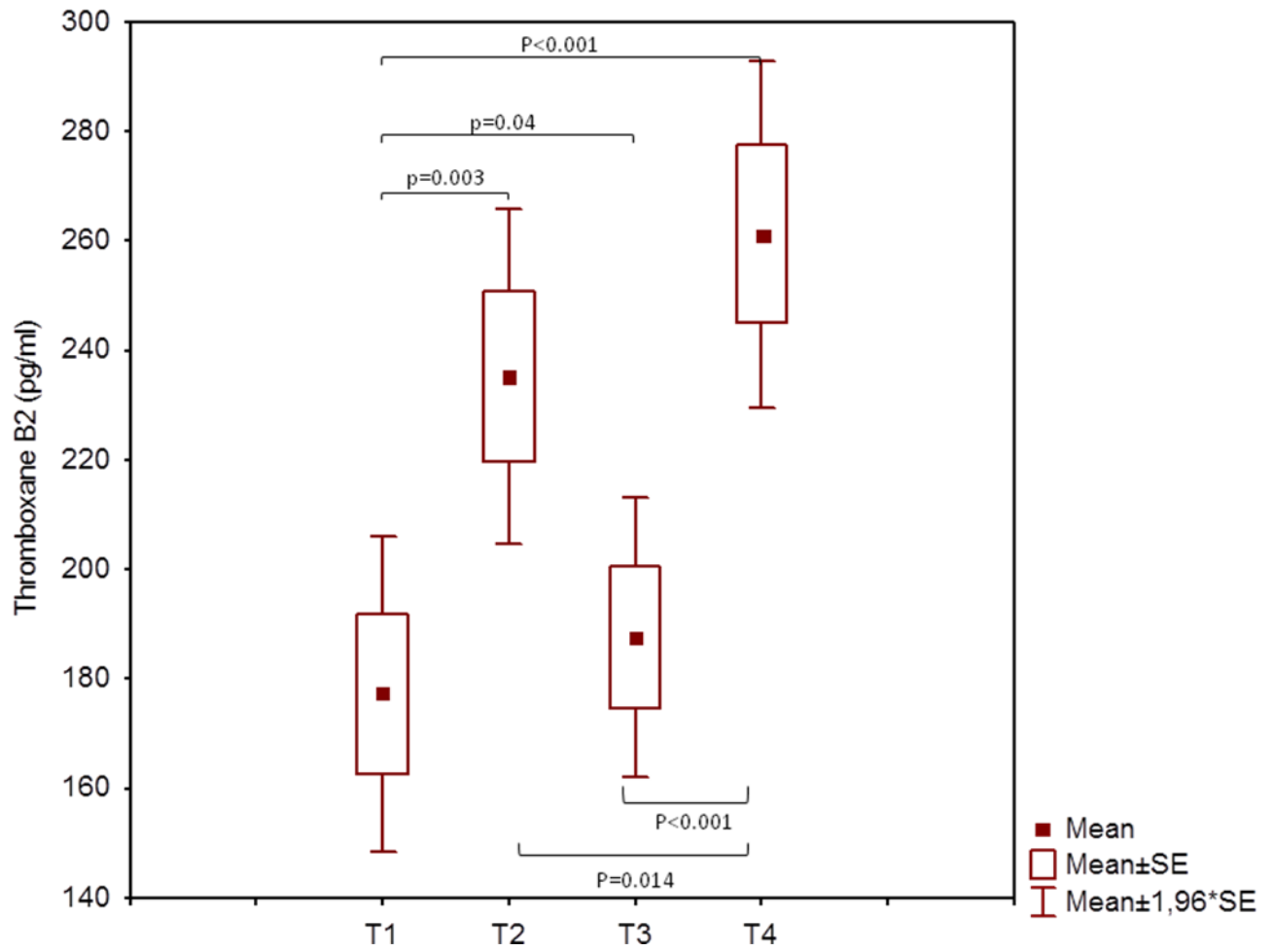


Figura 1 - Andamento del TxB2 nelle fasi del ciclo mestruale.

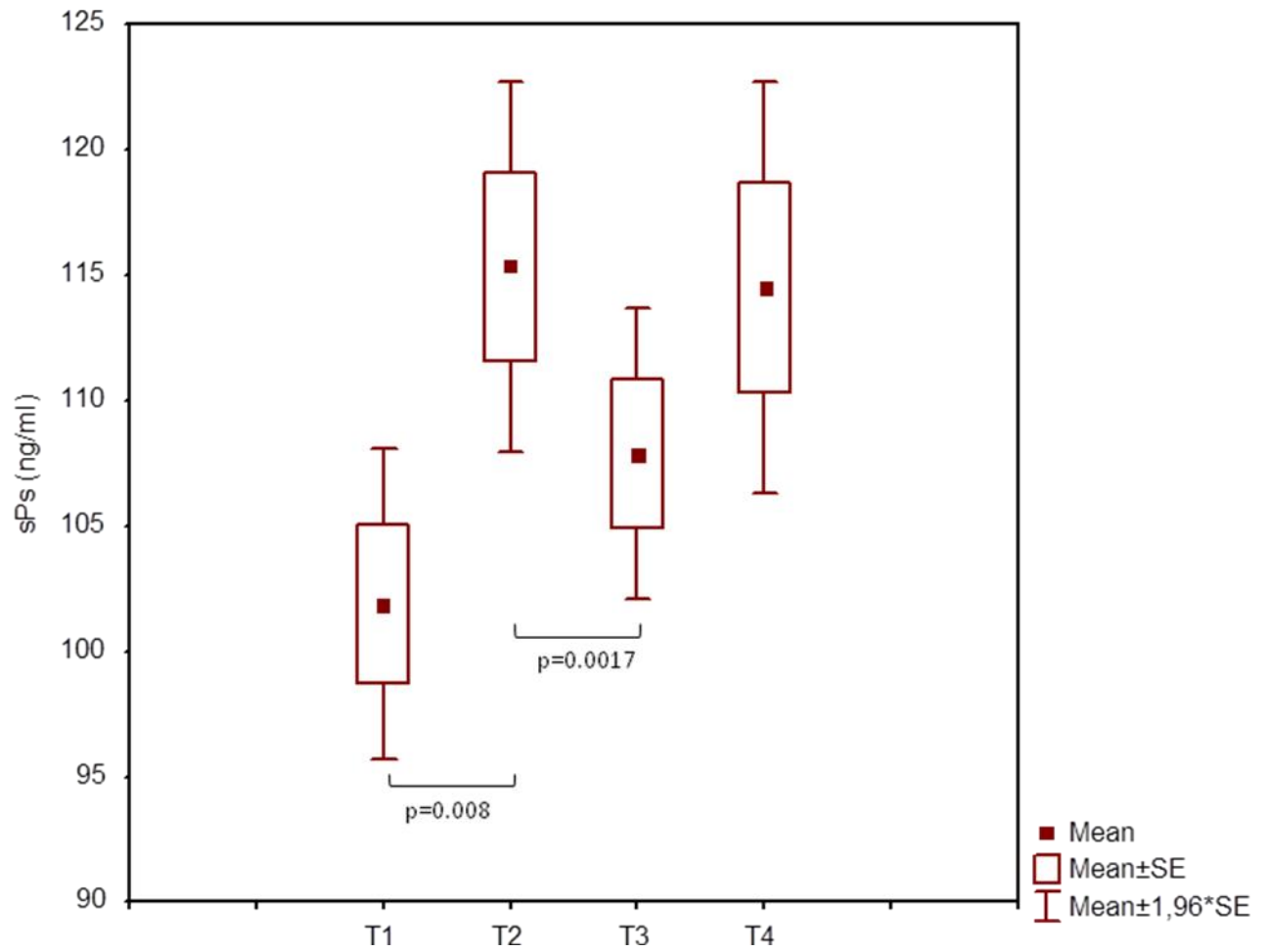


Figura 2 - Andamento della sPs nelle fasi del ciclo mestruale.

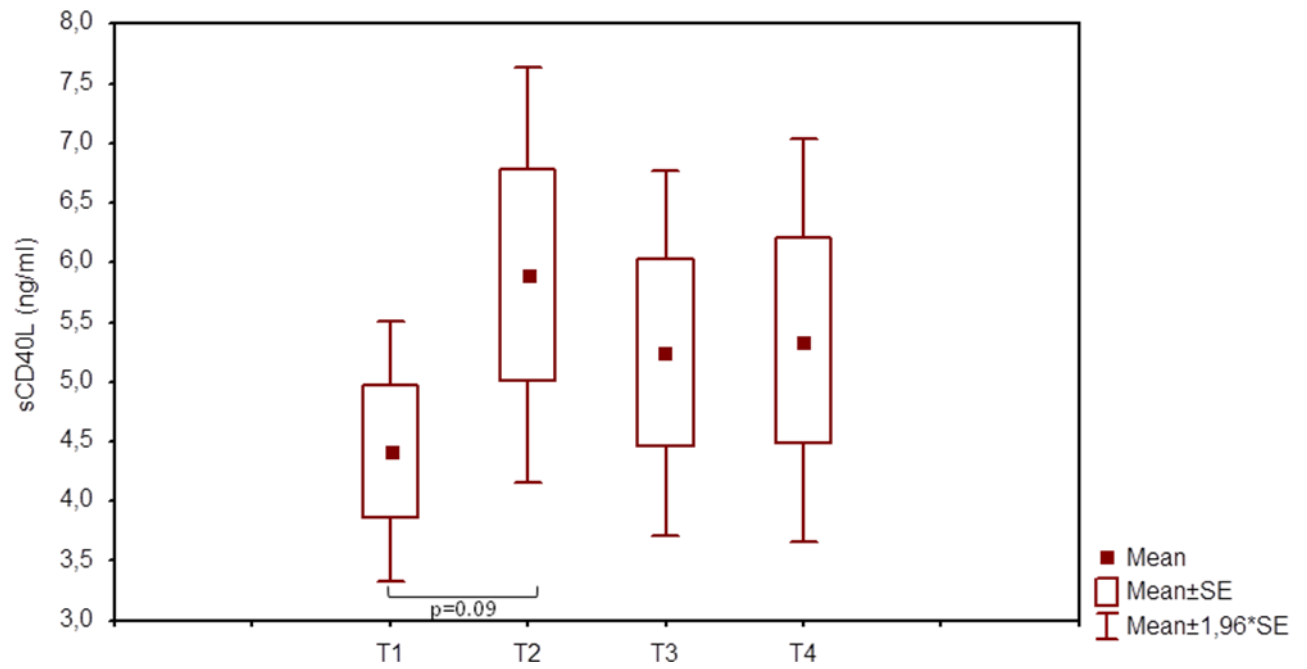


Figura 3 - Andamento della sCD40L nelle fasi del ciclo mestruale.

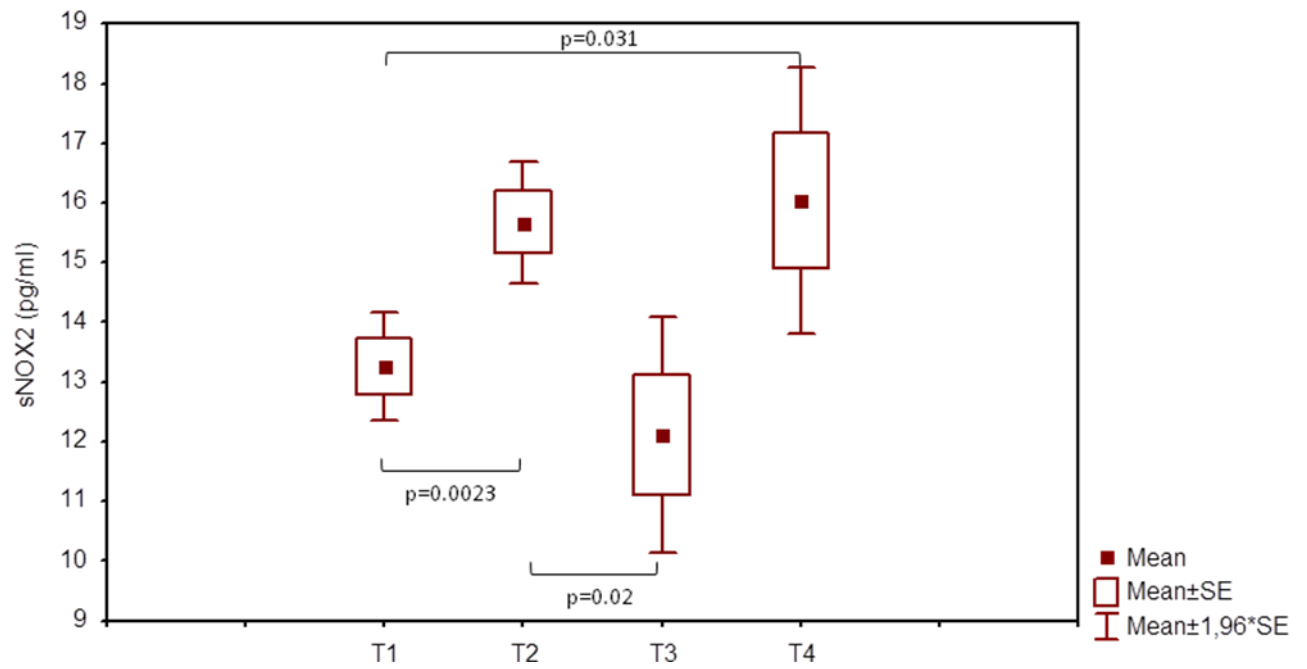


Figura 4 - Andamento della sNOX2 nelle fasi del ciclo mestruale.

	Media \pm DS
Età, <i>anni</i>	30,3 \pm 3,1
Peso, <i>kg</i>	58,7 \pm 8,3
Altezza, <i>m</i>	1,7 \pm 0,1
BMI	21,2 \pm 2,2
PAS, <i>mmHg</i>	110,5 \pm 7,9
PAD, <i>mmHg</i>	69,3 \pm 9,8
FC, <i>bpm</i>	68,4 \pm 7
Temperatura corporea, $^{\circ}$ C	36,1 \pm 0,5
Menarca, <i>anni</i>	12,2 \pm 1,2
Durata media ciclo mestruale, <i>giorni</i>	29,4 \pm 3,1
	%
Abitudine all'alcool	
Si (≥ 3 volte a settimana)	82
No	18
Fumo	
Si	23
No	77
Attività fisica	
In passato	40,9
Saltuaria	13,6
No	9,1
Si (≥ 3 volte a settimana)	36,4
Pregressa gravidanza	
Si	9,1
No	90,9
Tipo - Spontanea	100
Esito - A termine	100
Pregresso COC	
Si	54,5
No	45,5
Familiarità evento CV precoce (<60 anni)	4,5

Legenda: DS, deviazione standard; PAS, pressione arteriosa sistolica; PAD, pressione arteriosa diastolica; COC, contraccettivo orale; CV, cardiovascolare

Tabella 1 – Caratteristiche cliniche ed anamnestiche dei soggetti arruolati

Ormoni sessuali, median (IQR)	T1 (fase mestruale)	T2 (fase follicolare)	T3 (fase ovulatoria)	T4 (fase luteinica)
E2 (pg/ml)	41 (26-52)	68 (48-109)	105 (81-172)	116 (65-174)
PG (ng/ml)	0.4 (0.3-0.6)	0.3 (0.2-0.3)	3.3 (0.4-6.7)	6.2 (0.2-11.7)
LH (mIU/ml)	3.9 (3.01- 6.23)	4.5 (3.14- 7.03)	7.7 (3.17-4.93)	3.9 (1.90-5.02)
FSH (mIU/ml)	5.2 (4.1-7.0)	4.3 (4.0-5.2)	4.1 (3.2-4.9)	2.1 (1.9-5.0)
TE (ng/dl)	1.17 (1.01-1.49)	1.31 (1.16-1.44)	1.43 (1.23-1.61)	1.20 (1.1-1.4)

Tabella 2. Assetto Ormonale nelle donne arruolate

Bibliografia

1. Mozaffarian D, Benjamin EJ, Go AS, Arnett DK, Blaha MJ, Cushman M, Das SR, de Ferranti S, Després JP, Fullerton HJ, Howard VJ, Huffman MD, Isasi CR, Jiménez MC, Judd SE, Kissela BM, Lichtman JH, Lisabeth LD, Liu S, Mackey RH, Magid DJ, McGuire DK, Mohler ER 3rd, Moy CS, Muntner P, Mussolino ME, Nasir K, Neumar RW, Nichol G, Palaniappan L, Pandey DK, Reeves MJ, Rodriguez CJ, Rosamond W, Sorlie PD, Stein J, Towfighi A, Turan TN, Virani SS, Woo D, Yeh RW, Turner MB; American Heart Association Statistics Committee; Stroke Statistics Subcommittee. Executive Summary: Heart Disease and Stroke Statistics—2016 Update: A Report From the American Heart Association. *Circulation*. 2016;133(4):447-54.
2. Mendis S, Puska P, Norrving B editors. *Global Atlas on Cardiovascular Disease Prevention and Control*. World Health Organization, Geneva 2011, ISBN978 92 4 156437 3.
3. Di Giosia P, Passacuale G, Petrarca M, Giorgini P, Marra AM, Ferro A. Gender differences in cardiovascular prophylaxis: Focus on antiplatelet treatment. *Pharmacol Res*. 2017; 119:36-47.
4. Kuller LH. Cardiovascular disease is preventable among women. *Expert Rev Cardiovasc Ther*. 2010;8(2):175-87.
5. Maas AH, van der Schouw YT, Regitz-Zagrosek V, Swahn E, Appelman YE, Pasterkamp G, Ten Cate H, Nilsson PM, Huisman MV, Stam HC, Eizema K, Stramba-Badiale M. Red alert for women's heart: the urgent need for more research and knowledge on cardiovascular disease in women: proceedings of the workshop held in Brussels on gender differences in cardiovascular disease, 29 September 2010. *Eur Heart J*. 2011;32(11):1362-8.

6. Egorova N, Vouyouka AG, Quin J, Guillerme S, Moskowitz A, Marin M, Faries PL. Analysis of gender-related differences in lower extremity peripheral arterial disease. *J Vasc Surg.* 2010;51(2):372-8.
7. Bergendal A, Bremme K, Hedenmalm K, Lärfars G, Odeberg J, Persson I, Sundström A, Kieler H. Risk factors for venous thromboembolism in pre-and postmenopausal women. *Thromb Res.* 2012 Oct;130(4):596-601.
8. Petrea RE, Beiser AS, Seshadri S, Kelly-Hayes M, Kase CS, Wolf PA. Gender differences in stroke incidence and post-stroke disability in the Framingham heart study. *Stroke.* 2009;40(4):1032-7.
9. Manwani B, McCullough LD. Sexual dimorphism in ischemic stroke: lessons from the laboratory. *Womens Health (Lond).* 2011;7(3):319-39.
10. Mokdad AH, Ford ES, Bowman BA, Dietz WH, Vinicor F, Bales VS, Marks JS. Prevalence of obesity, diabetes, and obesity-related health risk factors, 2001. *JAMA.* 2003;289(1):76-9.
11. Bairey Merz CN, Shaw LJ, Reis SE, Bittner V, Kelsey SF, Olson M, Johnson BD, Pepine CJ, Mankad S, Sharaf BL, Rogers WJ, Pohost GM, Lerman A, Quyyumi AA, Sopko G; WISE Investigators. Insights from the NHLBI-Sponsored Women's Ischemia Syndrome Evaluation (WISE) Study: Part II: gender differences in presentation, diagnosis, and outcome with regard to gender-based pathophysiology of atherosclerosis and macrovascular and microvascular coronary disease. *J Am Coll Cardiol.* 2006;47(3 Suppl): S21-9.
12. Lerner DJ, Kannel WB. Patterns of coronary heart disease morbidity and mortality in the sexes: a 26-year follow-up of the Framingham population. *Am Heart J.* 1986;111(2):383-90.

13. Pilote L, Dasgupta K, Guru V, Humphries KH, McGrath J, Norris C, Rabi D, Tremblay J, Alamian A, Barnett T, Cox J, Ghali WA, Grace S, Hamet P, Ho T, Kirkland S, Lambert M, Libersan D, O'Loughlin J, Paradis G, Petrovich M, Tagalakis V. A comprehensive view of sex-specific issues related to cardiovascular disease. *CMAJ*. 2007;176(6): S1-44.
14. Wong ND, Pio J, Valencia R, Thakal G. Distribution of C-reactive protein and its relation to risk factors and coronary heart disease risk estimation in the National Health and Nutrition Examination Survey (NHANES) III. *Prev Cardiol*. 2001;4(3):109-114.
15. Bairey Merz CN, Johnson BD, Sharaf BL, Bittner V, Berga SL, Braunstein GD, Hodgson TK, Matthews KA, Pepine CJ, Reis SE, Reichek N, Rogers WJ, Pohost GM, Kelsey SF, Sopko G; WISE Study Group. Hypoestrogenemia of hypothalamic origin and coronary artery disease in premenopausal women: a report from the NHLBI-sponsored WISE study. *J Am Coll Cardiol*. 2003;41(3):413-9.
16. Tannenbaum C, Barrett-Connor E, Laughlin GA, Platt RW. A longitudinal study of dehydroepiandrosterone sulphate (DHEAS) change in older men and women: the Rancho Bernardo Study. *Eur J Endocrinol*. 2004;151(6):717-25.
17. Shaw LJ, Bugiardini R, Merz CN. Women and ischemic heart disease: evolving knowledge. *J Am Coll Cardiol*. 2009;54(17):1561-75.
18. Raggi P, Shaw LJ, Berman DS, Callister TQ. Gender-based differences in the prognostic value of coronary calcification. *J Womens Health (Larchmt)*. 2004;13(3):273-83.
19. Shufelt CL, Bairey Merz CN. Contraceptive hormone use and cardiovascular disease. *J Am Coll Cardiol*. 2009;53(3):221-31.

20. Ridker PM, Cook NR, Lee IM, Gordon D, Gaziano JM, Manson JE, Hennekens CH, Buring JE. A randomized trial of low-dose aspirin in the primary prevention of cardiovascular disease in women. *N Engl J Med.* 2005;352(13):1293-304.
21. Barkfeldt J, Virkkunen A, Dieben T. The effects of two progestogen-only pills containing either desogestrel (75 microg/day) or levonorgestrel (30 microg/day) on lipid metabolism. *Contraception.* 2001;64(5):295-9.
22. Gol M, Akan P, Dogan E, Karas C, Saygili U, Posaci C. Effects of estrogen, raloxifene, and hormone replacement therapy on serum C-reactive protein and homocysteine levels. *Maturitas.* 2006;53(3):252-9.
23. Coppinger JA, Cagney G, Toomey S, Kislinger T, Belton O, McRedmond JP, Cahill DJ, Emili A, Fitzgerald DJ, Maguire PB. Characterization of the proteins released from activated platelets leads to localization of novel platelet proteins in human atherosclerotic lesions. *Blood.* 2004 Mar 15;103(6):2096-104.
24. Becker DM, Segal J, Vaidya D, Yanek LR, Herrera-Galeano JE, Bray PF, Moy TF, Becker LC, Faraday N. Sex differences in platelet reactivity and response to low-dose aspirin therapy. *JAMA.* 2006;295(12):1420-7.
25. Faraday N, Goldschmidt-Clermont PJ, Bray PF. Gender differences in platelet GPIIb-IIIa activation. *Thromb Haemost.* 1997;77(4):748-54.
26. Roshan TM, Normah J, Rehman A, Naing L. Effect of menopause on platelet activation markers determined by flow cytometry. *Am J Hematol.* 2005;80(4):257-61.

27. Hobson AR, Qureshi Z, Banks P, Curzen N. Gender and responses to aspirin and clopidogrel: insights using short thrombelastography. *Cardiovasc Ther*. 2009;27(4):246-52.
28. Wang TY, Angiolillo DJ, Cushman M, Sabatine MS, Bray PF, Smyth SS, Dauerman HL, French PA, Becker RC. Platelet biology and response to antiplatelet therapy in women: implications for the development and use of antiplatelet pharmacotherapies for cardiovascular disease. *J Am Coll Cardiol*. 2012;59(10):891-900.
29. Ridker PM, Hennekens CH, Buring JE, Rifai N. C-reactive protein and other markers of inflammation in the prediction of cardiovascular disease in women. *N Engl J Med*. 2000;342(12):836-43.
30. Cushman M, Arnold AM, Psaty BM, Manolio TA, Kuller LH, Burke GL, Polak JF, Tracy RP. C-reactive protein and the 10-year incidence of coronary heart disease in older men and women: the cardiovascular health study. *Circulation*. 2005;112(1):25-31.
31. Buckley DI, Fu R, Freeman M, Rogers K, Helfand M. C-reactive protein as a risk factor for coronary heart disease: a systematic review and meta-analyses for the U.S. Preventive Services Task Force. *Ann Intern Med*. 2009;151(7):483-95.
32. Angiolillo DJ, Fernandez-Ortiz A, Bernardo E, Ramírez C, Sabaté M, Jimenez-Quevedo P, Hernández R, Moreno R, Escaned J, Alfonso F, Bañuelos C, Costa MA, Bass TA, Macaya C. Clopidogrel withdrawal is associated with proinflammatory and prothrombotic effects in patients with diabetes and coronary artery disease. *Diabetes*. 2006;55(3):780-4.

33. Khetawat G, Faraday N, Nealen ML, Vijayan KV, Bolton E, Noga SJ, Bray PF. Human megakaryocytes and platelets contain the estrogen receptor beta and androgen receptor (AR): testosterone regulates AR expression. *Blood*. 2000;95(7):2289-96.
34. Kurrelmeyer K, Becker L, Becker D, Yanek L, Goldschmidt-Clermont P, Bray PF. Platelet hyperreactivity in women from families with premature atherosclerosis. *J Am Med Womens Assoc (1972)*. 2003;58(4):272-7.
35. Tarantino MD, Kunicki TJ, Nugent DJ. The estrogen receptor is present in human megakaryocytes. *Ann N Y Acad Sci*. 1994; 714:293-6.
36. Eidelman O, Jozwik C, Huang W, Srivastava M, Rothwell SW, Jacobowitz DM, Ji X, Zhang X, Guggino W, Wright J, Kiefer J, Olsen C, Adimi N, Mueller GP, Pollard HB. Gender dependence for a subset of the low-abundance signaling proteome in human platelets. *Hum Genomics Proteomics*. 2010:164906.
37. Cushman M, Legault C, Barrett-Connor E, Stefanick ML, Kessler C, Judd HL, Sakkinen PA, Tracy RP. Effect of postmenopausal hormones on inflammation-sensitive proteins: The Postmenopausal Estrogen/Progestin Interventions (PEPI) Study. *Circulation*. 1999;100(7):717-22.
38. Rossouw JE, Cushman M, Greenland P, Lloyd-Jones DM, Bray P, Kooperberg C, Pettinger M, Robinson J, Hendrix S, Hsia J. Inflammatory, lipid, thrombotic, and genetic markers of coronary heart disease risk in the women's health initiative trials of hormone therapy. *Arch Intern Med*. 2008;168(20):2245-53.
39. Bray PF. Platelet glycoprotein polymorphisms as risk factors for thrombosis. *Curr Opin Hematol*. 2000;7(5):284-9.

40. Del Principe D, Ruggieri A, Pietraforte D, Villani A, Vitale C, Straface E, Malorni W. The relevance of estrogen/estrogen receptor system on the gender difference in cardiovascular risk. *Int J Cardiol.* 2015; 187:291-8.
41. Goodman MP. Are all estrogens created equal? A review of oral vs. transdermal therapy. *J Womens Health (Larchmt).* 2012;21(2):161-9.
42. Baigent C, Blackwell L, Collins R, Emberson J, Godwin J, Peto R, Buring J, Hennekens C, Kearney P, Meade T, Patrono C, Roncaglioni MC, Zanchetti A, Antithrombotic Trialists' (ATT) Collaboration. Aspirin in the primary and secondary prevention of vascular disease: collaborative meta-analysis of individual participant data from randomised trials. *Lancet.* 2009;373(9678):1849-60.
43. Patti G, De Caterina R, Abbate R, Andreotti F, Biasucci LM, Calabrò P, Cioni G, Davì G, Di Sciascio G, Golia E, Golino P, Malatesta G, Mangiacapra F, Marcucci R, Nusca A, Parato VM, Pengo V, Prisco D, Pulcinelli F, Renda G, Ricottini E, Ruggieri B, Santilli F, Sofi F, Zimarino M; Working Group on Thrombosis of the Italian Society of Cardiology. Platelet function and long-term antiplatelet therapy in women: is there a gender-specificity? A 'state-of-the-art' paper. *Eur Heart J.* 2014;35(33):2213-23b.
44. Berger JS, Bhatt DL, Cannon CP, Chen Z, Jiang L, Jones JB, Mehta SR, Sabatine MS, Steinhubl SR, Topol EJ, Berger PB. The relative efficacy and safety of clopidogrel in women and men a sex-specific collaborative meta-analysis. *J Am Coll Cardiol.* 2009 Nov 17;54(21):1935-45.
45. Wiviott SD, Braunwald E, McCabe CH, Montalescot G, Ruzyllo W, Gottlieb S, Neumann FJ, Ardissino D, De Servi S, Murphy SA, Riesmeyer J, Weerakkody G, Gibson CM, Antman EM; TRITON-TIMI 38 Investigators.

- Prasugrel versus clopidogrel in patients with acute coronary syndromes. *N Engl J Med.* 2007;357(20):2001-15.
46. Wallentin L, Becker RC, Budaj A, Cannon CP, Emanuelsson H, Held C, Horrow J, Husted S, James S, Katus H, Mahaffey KW, Scirica BM, Skene A, Steg PG, Storey RF, Harrington RA; PLATO Investigators, Freij A, Thorsén M. Ticagrelor versus clopidogrel in patients with acute coronary syndromes. *N Engl J Med.* 2009;361(11):1045-57.
47. Sibbing D, Koch W, Gebhard D, Schuster T, Braun S, Stegherr J, Morath T, Schömig A, von Beckerath N, Kastrati A. Cytochrome 2C19*17 allelic variant, platelet aggregation, bleeding events, and stent thrombosis in clopidogrel-treated patients with coronary stent placement. *Circulation.* 2010;121(4):512-8.
48. Mega JL, Close SL, Wiviott SD, Shen L, Hockett RD, Brandt JT, Walker JR, Antman EM, Macias W, Braunwald E, Sabatine MS. Cytochrome p-450 polymorphisms and response to clopidogrel. *N Engl J Med.* 2009;360(4):354-62.
49. Boersma E, Harrington RA, Moliterno DJ, White H, Théroux P, Van de Werf F, de Torbal A, Armstrong PW, Wallentin LC, Wilcox RG, Simes J, Califf RM, Topol EJ, Simoons ML. Platelet glycoprotein IIb/IIIa inhibitors in acute coronary syndromes: a meta-analysis of all major randomised clinical trials. *Lancet.* 2002;359(9302):189-98.
50. Valéra MC, Gratacap MP, Gourdy P, Lenfant F, Cabou C, Toutain CE, Marcellin M, Saint Laurent N, Sié P, Sixou M, Arnal JF, Payrastre B. Chronic estradiol treatment reduces platelet responses and protects mice from

- thromboembolism through the hematopoietic estrogen receptor α . *Blood*. 2012;120(8):1703-12.
51. Pignatelli P, Carnevale R, Cangemi R, Loffredo L, Sanguigni V, Stefanutti C, Basili S, Violi F. Atorvastatin inhibits gp91phox circulating levels in patients with hypercholesterolemia. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2010;30(2):360-7.
52. Ueda K, Karas RH. Emerging evidence of the importance of rapid, non-nuclear estrogen receptor signaling in the cardiovascular system. *Steroids*. 2013;78(6):589-96.
53. Giovannetti A, Maselli A, Colasanti T, Rosato E, Salsano F, Pisarri S, Mezzaroma I, Malorni W, Ortona E, Pierdominici M. Autoantibodies to estrogen receptor α in systemic sclerosis (SSc) as pathogenetic determinants and markers of progression. *PLoS One*. 2013;8(9): e74332.
54. Ortona E, Maselli A, Delunardo F, Colasanti T, Giovannetti A, Pierdominici M. Relationship between redox status and cell fate in immunity and autoimmunity. *Antioxid Redox Signal*. 2014;21(1):103-22.
55. Moro L, Reineri S, Piranda D, Pietrapiana D, Lova P, Bertoni A, Graziani A, Defilippi P, Canobbio I, Torti M, Sinigaglia F. Nongenomic effects of 17beta-estradiol in human platelets: potentiation of thrombin-induced aggregation through estrogen receptor beta and Src kinase. *Blood*. 2005;105(1):115-21.
56. Nakano Y, Oshima T, Ozono R, Ueda A, Oue Y, Matsuura H, Sanada M, Ohama K, Chayama K, Kambe M. Estrogen replacement suppresses function of thrombin stimulated platelets by inhibiting Ca (2+) influx and raising cyclic adenosine monophosphate. *Cardiovasc Res*. 2002;53(3):634-41.

57. Maccarrone M, Bari M, Battista N, Finazzi-Agrò A. Estrogen stimulates arachidonoyl ethanolamide release from human endothelial cells and platelet activation. *Blood*. 2002;100(12):4040-8.
58. Shi C, Zhu X, Wang J, Long D. Estrogen receptor α promotes non-amyloidogenic processing of platelet amyloid precursor protein via the MAPK/ERK pathway. *J Steroid Biochem Mol Biol*. 2014;144(B):280-5.
59. Reineri S, Bertoni A, Sanna E, Baldassarri S, Sarasso C, Zanfa M, Canobbio I, Torti M, Sinigaglia F. Membrane lipid rafts coordinate estrogen-dependent signaling in human platelets. *Biochim Biophys Acta*. 2007;1773(2):273-8.
60. Farré AL, Modrego J, Zamorano-León JJ. Effects of hormones on platelet aggregation. *Horm Mol Biol Clin Investig*. 2014;18(1):27-36.