

OMOCISTEINA E MENOPAUSA

Fulvia Mancini, Nicola Persico, Cesare Battaglia, e Domenico de Aloysio

Clinica Ostetrica e Ginecologica e Fisiopatologia Ginecologica della Terza Età Università di Bologna

Indirizzo per corrispondenza: Fulvia Mancini - Clinica Ostetrica e Ginecologica e Fisiopatologia Ginecologica della Terza Età Università di Bologna - Via Massarenti, 13 - 40128 Bologna

Tel: 051-6364377; Fax: 051-302974; E-mail: battaglia@med.unibo.it

ABSTRACT

Heart disease represents the most frequent cause of death in women over the age of 60. Homocysteine (Hcy) has been shown to damage the vascular endothelial cells, contributing to athero-thrombosis. The increase of homocysteine levels after menopause suggests a close relationship between Hcy metabolism and estrogenic status. Hormone replacement therapy (HRT) lowers Hcy levels in postmenopausal women. This paper gives an overview of the current understanding regarding homocysteine metabolism and the role of HRT. This is placed against the background of clinical trials on the effect of HRT on Hcy levels and addresses the importance of the interaction between Hcy, estrogens and vascular reactivity.

Key words: *homocysteine, menopause, HRT, estrogens.*

RIASSUNTO

La patologia cardiovascolare rappresenta, nel mondo occidentale, la principale causa di morte nelle donne di età superiore ai 60 anni. Recentemente è stato dimostrato che l'omocisteina danneggia le cellule vascolari endoteliali contribuendo ai processi aterosclerotici. I livelli di omocisteina sono aumentati in menopausa. L'uso della terapia ormonale sostitutiva riporta i valori di omocisteina entro i range di normalità. In questo manoscritto vengono descritti, sulla base di numerosi trials clinici, i rapporti tra menopausa, HRT e omocisteina.

Parole chiave: *omocisteina, menopausa, vasculopatie, HRT, estrogeni.*

INTRODUZIONE

Nei paesi industrializzati la patologia cardiovascolare rappresenta la causa di morte più frequente nelle donne di età superiore ai 60 anni (1).

L'ipotesi che gli ormoni sessuali influenzino la patogenesi della patologia cardiovascolare risale a più di un secolo fa. Negli ultimi 20 anni un vasto numero di studi clinici ed epidemiologici hanno fornito molte ed importanti informazioni sul ruolo giocato a livello cardiovascolare dagli estrogeni e dalla terapia

ormonale sostitutiva (HRT).

Recentemente l'omocisteina è stata individuata come fattore indipendente di rischio cardiovascolare: valori elevati di omocisteinemia si associano ad un rischio maggiore di patologia coronarica e cerebrale (2). I livelli plasmatici di omocisteina sono minori nelle donne in premenopausa o in gravidanza rispetto alle pazienti in menopausa. Gli steroidi sessuali potrebbero quindi modulare i valori di omocisteina. Studi recenti hanno dimostrato che i livelli di omocisteinemia diminuiscono nelle donne in menopausa trattate con HRT (3).

L'OMOCISTEINA

Metabolismo della omocisteina

L'omocisteina, forma transmetilata della metionina, è un aminoacido essenziale necessario per la crescita cellulare e tissutale. L'omocisteina si forma dalla S-adenosilmetionina (SAM) e dalla S-adenosilomocisteina (SAH). La trasformazione da SAM a SAH avviene mediante processi di transmetilazione. Il rapporto SAM/SAH è alla base della regolazione del metabolismo metionina-omocisteina. I livelli di omocisteina dipendono anche dalla rimetilazione a metionina o dalla trans-sulfurazione a cisteina (Figura 1) (4).

La rimetilazione richiede la vitamina B₁₂ come cofattore e il 5-metiltetraidrofolato, come donatore di un gruppo metile.

Il metiltetraidrofolato si forma dal 5,10-metilenetetraidrofolato tramite una reazione catalizzata dalla 5,10-metilenetetraidrofolato reductasi (MTHFR) (5). Di questo enzima è stata descritta una isoforma meno attiva, termolabile, che è il risultato di una mutazione da citosina a timina sul locus 677. Il livello di espressione di questa isoforma determina la quota dei valori plasmatici di omocisteina (6). La trans-sulfurazione richiede la vitamina B₆ come cofattore (4). L'enzima richiesto nel primo passaggio è una cistationina-sintetasi (CBS) che è assente in una forma ereditaria di iperomocisteinemia: l'omocistinuria (7). I pazienti iperomocistinurici muoiono generalmente nella terza decade di vita per patologia cardiovascolare dovuta agli altissimi livelli plasmatici di omocisteina. Si ritiene che i regolatori dell'attività della cistationina-sintetasi siano la SAM e la SAH (7).

Con qualche eccezione, questi processi avvengono in tutte le cellule dell'organismo.

Generalmente i livelli plasmatici di omocisteina riflettono correttamente i livelli totali di omocisteina nell'organismo e nelle cellule (8).

Omocisteina e funzione vascolare

I vasi arteriosi sono fondamentalmente costituiti da due parti funzionali: le cellule muscolari lisce e l'endotelio. Le cellule muscolari lisce possono contrarsi a seguito di un impulso nervoso, o tramite influenze dirette di varie sostanze sulle cellule muscolari lisce o indirettamente attraverso un meccanismo di reattività vasale endotelio-dipendente. In quest'ultimo caso l'endotelio rilascia alcune sostanze vasoattive. Tra i vasodilatatori, l'ossido nitrico (NO) è il più importante e viene prodotto dall'endotelio attraverso il metabolismo dell'arginina grazie ad una NO-sintetasi (NOS) (9).

Nonostante i dati siano ancora limitati, è stato dimostrato che l'omocisteina influenza la funzione vascolare mediante un'azione diretta sul tono vascolare, che induce una costrizione vascolare aumentata, o mediante un'influenza indiretta che contribuisce alla formazione della placca aterosclerotica e alla proliferazione delle cellule muscolari lisce con conseguente danno endoteliale e ridotta elasticità (10). L'esposizione alla omocisteina, sia a lungo (giorni) sia a breve (minuti) termine, porta ad una vasocostrizione o ad una ridotta capacità di dilatazione. Ciò potrebbe essere dovuto alla produzione di radicali liberi dell'ossigeno (ROS: "Reactive Oxygen Species") i quali rendono il NO biologicamente inattivo prima che abbia raggiunto le cellule muscolari lisce (11). A conforto di questa ipotesi vi è l'osservazione che è possibile inibire gli effetti dei ROS con l'utilizzo di antiossidanti (12). Nonostante ciò, i ROS non possono essere l'unica spiegazione poiché i meccanismi che richiedono reazioni di ossido-riduzione sono numerosi e dovrebbero essere anch'essi influenzati dalla omocisteina.

Un meccanismo aggiuntivo potrebbe essere il cambiamento nel metabolismo della glutatione-perossidasi indotto dalla omocisteina (11). Tale meccanismo diminuirebbe la capacità delle cellule endoteliali di sopportare lo stress indotto dalle reazioni di ossido-riduzione generate dai radicali liberi. Ciò porterebbe ad una ridotta produzione basale di NO e di NOS ed a una minore capacità di rilascio di NO (11).

Un'altra ipotesi per la vasocostrizione dipendente dalla omocisteina interessa la dimetil-arginina asimmetrica (ADMA), un inibitore endogeno del NOS, la cui produzione è aumentata in presenza di omocisteina. La presenza di ADMA ostacola la vasodilatazione endotelio-dipendente (13).

Meccanismi fisiopatologici dipendenti dalla omocisteina

I livelli plasmatici di omocisteina sono correlati alla patologia cardiovascolare sia in senso generale, sia nell'ambito di patologie cardiache specifiche. I livelli elevati di omocisteina costituiscono fattori di rischio indipendenti per la patologia occlusiva vascolare e la trombosi venosa profonda (8).

L'iperomocisteinemia determina uno sbilanciamento tra SAM e SAH, soprattutto in presenza di bassi livelli di metionina. Poiché la SAM è il donatore di un gruppo metile, que-

sto comporta una riduzione delle metilazioni del DNA. Inoltre, la SAM stessa gioca un ruolo importante come regolatore nelle reazioni di metiltransferasi del DNA e dell'RNA. Pertanto, la patogenesi del danno cardiovascolare indotto dalla omocisteina è determinata dalla diminuita metilazione del DNA con conseguente minor vitalità cellulare e proliferazione delle cellule muscolari lisce (14).

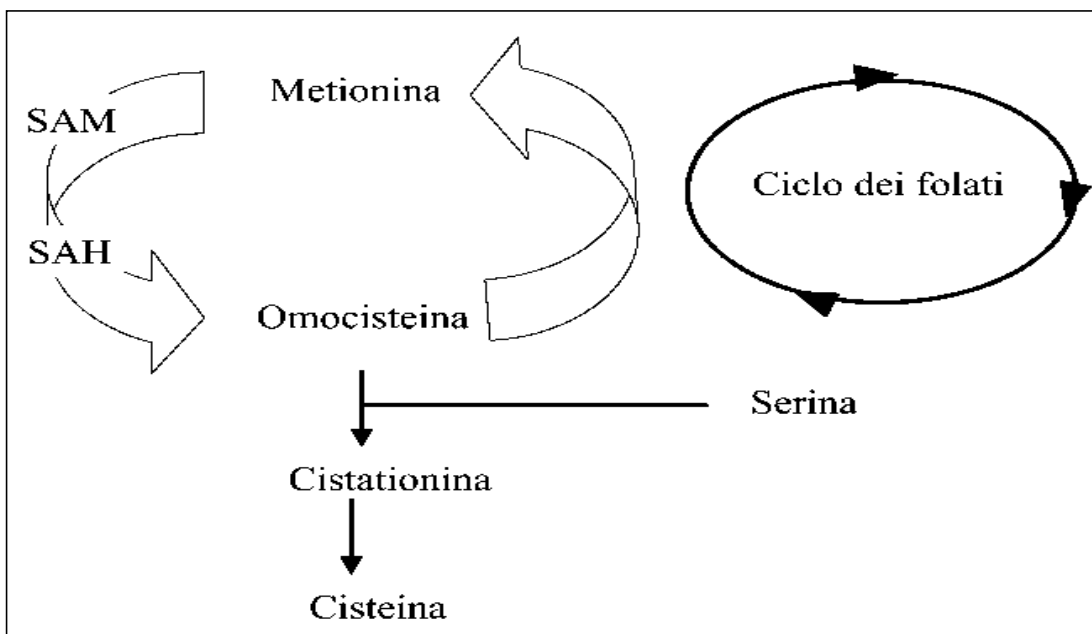
TRIAL CLINICI SU ESTROGENI E OMOCISTEINA

L'effetto degli estrogeni a livello vascolare non è ancora stato chiarito. Tuttavia, è ormai assodato che gli estrogeni hanno effetti vasodilatatori sia a lungo che a breve termine. Negli studi effettuati sull'uomo, la terapia con estrogeni aumenta la vasodilatazione endotelio-dipendente con diminuzione della rigidità arteriosa e dell'indice di pulsatilità (una misura indiretta della resistenza vascolare periferica) (15-17). Gli ormoni sessuali influenzano le concentrazioni di omocisteina. I maschi hanno livelli aumentati rispetto alle femmine della stessa età. Inoltre, le donne in postmenopausa hanno concentrazioni maggiori in paragone alle donne in premenopausa (19).

Nel 1999 Van Baal e coll. (20) hanno studiato 59 pazienti in postmenopausa dividendole, in base al tipo di trattamento, in tre gruppi: HRT sequenziale combinato (combinata 17 β -estradiolo, 2 mg/die, e di-idrogesterone, 5-10 mg/die; gruppo I); solo estradiolo, (2 mg/die, gruppo II); e placebo. Dopo 12 settimane di terapia i valori plasmatici di omocisteina erano diminuiti del 9.4% e del 5.1% rispettivamente nel gruppo I e nel gruppo II. Al contrario, i valori di omocisteina erano aumentati del 2.4% nel gruppo placebo. Lo studio indicava, inoltre, come la terapia sostitutiva in pazienti con valori basali di omocisteina più elevati ($> 14 \mu\text{mol/L}$), e quindi con alto rischio cardiovascolare, favorisse una riduzione maggiore dei livelli di omocisteinemia. Lo studio dimostrava anche gli effetti additivi del progesterone nel ridurre l'omocisteinemia. Infatti, le pazienti che assumevano HRT combinata avevano una riduzione maggiore dei valori di omocisteina. Tutti questi dati sono concordi con quelli di un altro studio più ampio (135 pazienti) di Mijatovic e coll. (21) in cui la terapia combinata veniva somministrata in modo continuo e con dosaggi diversi di di-idrogesterone (2.5, 5, 10 o 15 mg/die per 6 mesi). È interessante notare che i valori di omocisteinemia si sono ridotti significativamente (-13.5 e -14.0%; $p < 0.001$) nei primi 3 mesi di terapia e sono rimasti inalterati nei successivi 3 mesi (-13.3 e -16.1%; $p < 0.001$) indipendentemente dal dosaggio di di-idrogesterone utilizzato. Al termine dello studio gli autori hanno retrospettivamente diviso le pazienti in 4 gruppi a seconda dei valori basali di omocisteinemia (da $< 8.9 \text{ mol/L}$, gruppo 1, fino a $> 11.8 \text{ mol/L}$, gruppo 4) e hanno osservato che dopo 3 mesi di terapia i valori di omocisteina erano diminuiti significativamente e in modo uguale in tutti i gruppi. Tuttavia, al termine dello studio le pazienti del gruppo 4 avevano una riduzione significativamente maggiore delle pazienti del gruppo 1 (-20% vs -11%, $p < 0.01$).

In considerazione dei risultati ottenuti, gli stessi autori (22)

Figura 1: Metabolismo della omocisteina.



A sinistra della figura, la via metabolica della transmetilazione: la produzione di omocisteina dalla metionina. In basso nella figura, la trans-sulfurazione: produzione di cisteina per metabolizzazione della omocisteina. A destra della figura, rimetilazione: dalla omocisteina si riforma la metionina attraverso il ciclo dei folati che agiscono come donatori di un gruppo metile.

hanno valutato l'effetto sulla omocisteina del raloxifene, un derivato non steroideo del benzotiofene che agisce come agonista degli estrogeni unicamente su alcuni bersagli (osso, lipidi plasmatici), ma non sembra avere effetti negativi a carico della mammella e dell'endometrio. In questo studio durato 24 mesi, 60 pazienti in postmenopausa sono state suddivise in 4 gruppi con diversi schemi terapeutici: raloxifene 60 mg/die, raloxifene 150 mg/die, estrogeni equini coniugati 0,625 mg/die e, infine, placebo. L'effetto del raloxifene si è rivelato dose dipendente. Infatti era possibile osservare una diminuzione significativa dei valori di omocisteina solo nel gruppo delle pazienti trattate con 150 mg/die (-16%, $p < 0.001$). Tale risultato era sovrapponibile a quello degli estrogeni equini coniugati. Questo studio, il primo a riportare risultati sul raloxifene, ne dimostra i potenziali benefici a lungo termine come protezione cardiovascolare.

Anche il tibolone, uno steroide sintetico con proprietà simil-estrogeniche, androgeniche e progestiniche frequentemente usato per prevenire i sintomi climaterici e l'osteoporosi, ha rivelato un effetto omocisteina-riducente. Kaleli e coll. (23) hanno studiato 41 donne per 12 settimane. Al termine dello studio le pazienti che assumevano tibolone (2.5 mg/die) avevano valori di omocisteina significativamente inferiori ai livelli basali e tale riduzione era sovrapponibile a quella riscontrata nelle donne trattate con somministrazione continua di 17 β -estradiolo (1 mg/die) e noretisterone acetato (0.5 mg/die).

Molto recentemente, in uno studio di Marchesoni e coll. (19) non si riscontrava alcun miglioramento negli indici di omocisteinemia in pazienti in menopausa chirurgica trattate per 12 mesi con estradiolo transdermico (50 μ g/die). Secondo gli autori una possibile spiegazione potrebbe risie-

dere nella via di somministrazione dell'estradiolo. Con il sistema transdermico, infatti, viene a mancare l'effetto di primo passaggio attraverso il fegato e ciò interferirebbe con il metabolismo della metionina.

La maggior parte degli studi a lungo termine concludono che la diminuzione dei valori di omocisteina indotti dall'HRT permangono per almeno due anni dall'interruzione della terapia. Ciò indicherebbe che l'HRT possa favorire un nuovo equilibrio metabolico. Al momento attuale, tuttavia, le spiegazioni sui possibili meccanismi grazie ai quali gli

estrogeni influenzano il metabolismo della omocisteina sono solo delle ipotesi. Nei transessuali trattati con estrogeni o androgeni i cambiamenti indotti nei livelli di omocisteina sono risultati correlati ai cambiamenti nei livelli di albuminemia (24). Pertanto i cambiamenti dei livelli di omocisteina potrebbero essere anche dovuti a cambiamenti generali in senso catabolico o anabolico.

L'omocisteinemia può essere ridotta tramite la somministrazione di vitamina B (25). Conseguentemente, una delle possibili ipotesi è che gli ormoni sessuali femminili migliorino il metabolismo della vitamina B. Tuttavia, nelle donne in menopausa i livelli plasmatici di cobalamina (la vitamina B₁₂) non si modificano significativamente (26) e la somministrazione di contraccettivi orali nelle donne giovani determina addirittura una diminuzione dei livelli di vitamina B₁₂ e di folati (27).

CONCLUSIONI

L'importanza clinica nel ridurre le concentrazioni di omocisteina deve essere ancora determinata. Tuttavia, dati indiretti basati sugli effetti omocisteina-riducenti dell'acido folico, della vitamina B₆ e della vitamina B₁₂, sono promettenti. È stata dimostrata un'associazione tra riduzione dell'omocisteina e diminuzione nella formazione della placca aterosclerotica con conseguente riduzione dell'incidenza di elettrocardiogrammi da sforzo alterati, di infarti miocardici non fatali, di patologia coronarica fatale (28).

Tuttavia, non è ancora noto se questi effetti siano riconducibili a una delle vitamine del gruppo B o alla loro combinazione. Resta inoltre da dimostrare se questi effetti possono essere distinti da quelli delle altre terapie omocisteina-riducenti quali l'HRT.

BIBLIOGRAFIA

1. Eaker ED, Chesebro JH, Sacks FM, et al. Cardiovascular disease in women. *Circulation* 1993; 1999-2009.
2. Verhoef P. Hyperhomocystinemia and risk of vascular disease in women. *Semin Thromb Hemost* 2000; 26:325-34.
3. Van Der Mooren MJ, Wouters MG AJ, Blom HJ. Hormone replacement therapy may reduce high serum homocysteine in postmenopausal women. *Eur J Clin Invest* 1994; 24:733-6.
4. Finkelstein JD. The metabolism of homocysteine: pathways and regulation. *Eur J Pediatr* 1998; 157 (S2):S40-4.
5. Siri PW, Verhoef P, Kok FJ. Vitamin B₆, B₁₂, and folate: association with plasma total homocysteine and risk of coronary atherosclerosis. *J Am Coll Nutr* 1998; 17 435-1.
6. Frosst P, Blom HJ, Milos R, et al. A candidate genetic risk factor for vascular disease: a common mutation in methylenetetrahydrofolate reductase. *Nature Genet* 1995; 10:111-3.
7. Carey MC, Donovan DE, Fitzgerald O, et al. Homocystinuria. A clinical and pathological study of nine subjects in six families. *Am J Med* 1968; 45:7-25.
8. Smolders RG, Van Der Mooren MJ, Sipkema P, et al. Estrogen, homocysteine, vasodilatation and menopause: basic mechanisms interactions and clinical implications. *Gynecol Endocrinol* 2003; 17:339-54.
9. Mulvany MJ, Aalkjaer C. Structure and function of small arteries. *Am J Physiol* 1990; 70:921-61.
10. Van Guldener C, Stehouwer CDA. Hyperhomocysteinemia, vascular pathology and endothelial dysfunction. *Semin Thromb Hemost* 2000; 26:281-289.
11. Upchurch GR, Wlch GN, Fabian AJ, et al. Homocysteine decreases bioavailable nitric oxide by a mechanism involving glutathione peroxidase. *J Biol Chem* 1997; 272:17012-7.
12. Raghuvver G, Sinnkey CA, Chenard C, et al. Effect of vitamin E on resistance vessel endothelial dysfunction induced by methionine. *Am J Cardiol* 2001; 88:285-90.
13. Stuhlinger MC, Tsao PS, Her JH, et al. Homocysteine impairs the nitric oxide synthase pathway: role of asymmetric dimethylarginine. *Circulation* 2001; 104:2569-75.
14. Hultberg B, Andresson A, Isaksson A. Hypomethylation as a cause of homocysteine-induced cell damage in human cell lines. *Toxicology* 2000; 147:69-75.
15. Battaglia C, Artini PG, Bencini S, et al. Doppler analysis of uterine blood flow changes in spontaneous and medically induced menopause. *Gynecol Endocrinol* 1995; 9:143-8.
16. Battaglia C, Regnani G, Artini PG, et al. Uterine and cerebral vascularization in postmenopausal women treated with hormone-replacement therapy. *Gynecol Endocrinol* 1999; 13:223-9.
17. Battaglia C, Salvatori M, Gallinelli A, et al. Color Doppler and hormone replacement therapy: the role of thromboxane and plasma viscosity. *Gynecol Endocrinol*. 1999; 13:183-8.
18. Latin Hermoso RL, Rosenfeld CR, Yuhanna IS, et al. Estrogen acutely stimulates nitric oxide synthase activity in fetal pulmonary artery endothelium. *Am J Physiol* 1997; 273:119-26.
19. Marchesini D, Driul L, Plaino L, et al. Menopause rather than estrogen modifies plasma homocysteine levels. *Int J Gynecol Obstet* 2003; 81:293-97.
20. Van Baal WM, Smolders RGV, Van Der Mooren MJ, et al. Hormone replacement therapy and plasma homocysteine levels. *Obstet Gynecol* 1999; 94:485-491.
21. Mijatovic V, Kenemans P, Netelenbos C, et al. Postmenopausal oral 17beta-estradiol continuously combined with dydrogesterone reduces fasting serum homocysteine levels. *Fertil Steril* 1998; 69:876-82.
22. Mijatovic V, Netelenbos C, van der Mooren MJ, et al. Randomized, double-blind, placebo-controlled study of the effects of raloxifene and conjugated equine estrogen on plasma homocysteine levels in healthy postmenopausal women. *Fertil Steril* 1998; 70:1085-9.
23. Kaleli B, Yildirim B, Demir S, et al. Effects of low-dose 17-beta-estradiol plus norethisterone acetate and tibolone on fasting plasma homocysteine levels in postmenopausal women. *Acta Obstet Gynecol Scand* 2003; 82:1107-11.
24. Giltay EJ, Toorians AW, Sarabdjitsingh AR, et al. Established risk factors for coronary heart disease are unrelated to androgen-induced baldness in female-to-male transsexuals. *J Endocrinol* 2004; 180:107-12.
25. de Bree A, Verschuren WM, Blom HJ, et al. Association between B vitamin intake and plasma homocysteine concentration in the general Dutch population aged 20-65 y. *Am J Clin Nutr* 2001; 73:1027-33.
26. Carmel R, Howard JM, Green R, et al. Hormone replacement therapy and cobalamin status in elderly women. *Am J Clin Nutr* 1996; 64:856-9.
27. Steegers-Theunissen RP, Boers GH, Steegers EA, et al. Effects of sub-50 oral contraceptives on homocysteine metabolism: a preliminary study. *Contraception* 1992;45:129-39.
28. Vermeulen EG, Stehouwer CD, Twisk JW, et al. Effect of homocysteine-lowering treatment with folic acid plus vitamin B₆ on progression of subclinical atherosclerosis: a randomised, placebo-controlled trial. *Lancet* 2000; 355:517-22.