

## **Linee di indirizzo per l'applicazione della Medicina di Genere nella ricerca e negli studi preclinici e clinici**

### *Parte 1*

*Documento approvato in seduta plenaria dall'Osservatorio dedicato alla Medicina di Genere in data: 17/01/2023, ultima revisione 28/02/2023*

*Redazione a cura del Gruppo di Lavoro "Ricerca e innovazione" con la collaborazione dei/delle seguenti esperti/e:*

- *Dott.ssa Anna Maria Cattaneo, Unità di Psichiatria biologica, IRCCS Fatebenefratelli, Brescia*
- *Dott.ssa Eliana Ferroni, U.O.C. Servizio Epidemiologico Regionale, Azienda Zero. Regione Veneto, Padova*
- *Dott.ssa Cristina Mangia, Istituto di Scienze dell'Atmosfera e del Clima, Consiglio Nazionale delle Ricerche, Lecce*

## Sommario

|                                                                                                 |           |
|-------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------|
| <b>1. PREFAZIONE .....</b>                                                                      | <b>3</b>  |
| <b>2. FATTORI ALLA BASE DELLE DIFFERENZE DI SESSO, GENERE ED ETÀ.....</b>                       | <b>4</b>  |
| 2.1 FATTORI GENETICI, EPIGENETICI .....                                                         | 4         |
| 2.2 FATTORI ORMONALI .....                                                                      | 4         |
| 2.3 MICROBIOTA .....                                                                            | 6         |
| 2.4 IMMUNITÀ E INFIAMMAZIONE .....                                                              | 6         |
| 2.5 STRESS .....                                                                                | 7         |
| 2.6 FATTORI AMBIENTALI, CULTURALI, ETNICI .....                                                 | 8         |
| 2.7 FATTORI PSICOLOGICI .....                                                                   | 8         |
| 2.8 STILI DI VITA .....                                                                         | 9         |
| <b>3. STUDI PRECLINICI .....</b>                                                                | <b>10</b> |
| 3.1 IL SESSO DELLE CELLULE NEGLI STUDI IN VITRO E EX VIVO .....                                 | 10        |
| 3.2 CULTURE CELLULARI E MEDIA .....                                                             | 11        |
| 3.3 STUDI IN VIVO SU ANIMALI DA ESPERIMENTO .....                                               | 13        |
| 3.4 IL RUOLO DEGLI ORMONI GONADICI DOPO LA PUBERTÀ .....                                        | 13        |
| 3.5 FOUR CORE GENOTYPES.....                                                                    | 14        |
| <b>4. STUDI EPIDEMIOLOGICI, L'IMPORTANZA DI DISAGGREGARE I DATI PER SESSO, GENERE ED ETÀ.14</b> |           |
| 4.1 APPROCCIO DI GENERE NELLA PREVENZIONE .....                                                 | 15        |
| 4.2 LE DIMENSIONI SESSO E GENERE IN EPIDEMIOLOGIA.....                                          | 16        |
| <b>5. STUDI CLINICI .....</b>                                                                   | <b>18</b> |
| 5.1 PITFALL DI GENERE NEGLI STUDI CLINICI .....                                                 | 18        |
| 5.2 IDENTIFICAZIONE E VALIDAZIONE DI BIOMARCATORI GENERE SPECIFICI .....                        | 19        |
| <b>BIBLIOGRAFIA .....</b>                                                                       | <b>20</b> |
| <b>TABELLA 1. FATTORI ALLA BASE DELLE DIFFERENZE DI SESSO, GENERE ED ETÀ.....</b>               | <b>29</b> |
| <b>TABELLA 2. STUDI IN VITRO .....</b>                                                          | <b>31</b> |
| <b>TABELLA 3. STUDI IN VIVO .....</b>                                                           | <b>31</b> |

## 1. Prefazione

La necessità di una attenta valutazione e considerazione di sesso/genere in medicina, sanità e ricerca è sempre più evidente e riconosciuta (Sá et al., 2020). È ormai appurato come sia importante considerare nella ricerca preclinica e clinica gli aspetti relativi sia al sesso, cioè quelli di natura più squisitamente biologica (espressione genica sesso-specifica), sia al genere, con riferimento agli aspetti psico-sociali, culturali ed economici che differenziano uomo e donna nella percezione di una determinata società (Miller 2014; Schiebinger et al., 2018; Bartz et al., 2020).

Questo documento ha lo scopo di fornire indicazioni e suggerimenti per la stesura di studi/protocolli di ricerca che tengano conto dei determinanti sesso e genere.

Dopo una descrizione dei diversi fattori responsabili delle differenze di sesso e genere si approfondiscono le criticità riguardanti gli studi preclinici, epidemiologici e clinici in ottica di genere.

Alcuni aspetti generali sono comuni a tutti i progetti di ricerca che vogliano tenere conto delle differenze di sesso e genere, e sono di seguito elencati:

1. formulare ipotesi sugli effetti che sesso/genere possano avere su un determinato fenomeno in studio;
2. individuare se differenze di sesso/genere siano già descritte in letteratura;
3. valutare se sesso/genere debbano essere considerati come variabili indipendenti, modificatori dell'effetto o fattori confondenti e quale sia la motivazione;
4. valutare/calcolare la numerosità campionaria per aumentare il valore statistico delle analisi;
5. raccogliere e analizzare i dati disaggregati per sesso;
6. considerare se sia necessario procedere alla validazione dei dati in studi di replica utilizzando coorti indipendenti stratificate per sesso/genere;
7. assicurarsi che nel documento scientifico finale le differenze tra sesso/genere siano visualizzate/riportate nelle tabelle, figure e conclusioni.

## **2. Fattori alla base delle differenze di sesso, genere ed età**

### **2.1 Fattori genetici, epigenetici**

I meccanismi genetici hanno un ruolo fondamentale nelle differenze tra maschi e femmine. Le differenze di sesso genetiche ed epigenetiche sono correlate con la presenza di due cromosomi X nelle femmine e una singola copia dei cromosomi X e Y nei maschi (Bartz et al., 2020). Il cromosoma Y ospita principalmente geni coinvolti nella determinazione del sesso maschile, geni coinvolti nella regolazione del ciclo cellulare, trasduzione del segnale, stabilità proteica e nella regolazione dell'espressione genica (Wijchers et al., 2011). Nelle cellule "femminili" uno dei due cromosomi X viene inattivato, ma tale inattivazione può non essere completa. Esistono infatti delle zone che sfuggono all'inattivazione, pertanto, se un gene è localizzato in queste zone, il suo prodotto proteico può essere espresso maggiormente nelle femmine rispetto ai maschi. Inoltre, molti geni autosomici sono espressi in modo differente tra maschi e femmine, contribuendo ulteriormente alle differenze di sesso (Martin et al., 2021).

I meccanismi epigenetici controllano l'espressione genica attraverso la metilazione del DNA, la modifica degli istoni, la regolazione e il silenziamento genico mediato dagli RNA non codificanti o microRNA. Per esempio, nel DNA dei linfociti del sangue periferico di uomini e donne sono stati identificati più di 1000 siti CpG con differenti livelli di metilazione che possono potenzialmente contribuire alle differenze di sesso nella risposta immunitaria (Grant et al., 2022). Bisogna notare inoltre che il cromosoma X contiene un numero elevato di microRNA, circa 120, che possono essere quindi overespressi nelle femmine se localizzati nelle zone che sfuggono all'inattivazione, mentre il cromosoma Y ne contiene solo 4 (Wijchers et al., 2011).

### **2.2 Fattori ormonali**

Gli ormoni sessuali, come gli estrogeni, il progesterone e il testosterone, inducono importanti modificazioni fisiologiche nell'uomo e nella donna che variano anche per le oscillazioni dei loro livelli nei diversi periodi della vita (Spoletini et al., 2013). Questi ormoni, infatti, influenzano diversi aspetti fisiologici, tra cui quelli legati alla sfera cognitiva e socio-emotiva e quelli legati al metabolismo lipidico e glicidico, idrosalino, muscolo scheletrico, la funzione cardiovascolare, epatica, polmonare e molte altre ancora (Nunez et al., 2020; Ebner et al., 2015; Maiorino et al., 2018). Anche la risposta immunitaria è fortemente influenzata dagli ormoni sessuali. In particolare, gli estrogeni agiscono come immunostimolanti anche se hanno un effetto diverso che dipende dalla loro concentrazione (Taneja et al., 2018). Ad alti livelli, come quelli riscontrabili nella fase follicolare del ciclo mestruale o in gravidanza, hanno un effetto anti-infiammatorio, mentre a bassi livelli, come quelli riscontrabili nelle altre fasi del ciclo mestruale, hanno un effetto pro-infiammatorio (Straub et al., 2007).

È necessario anche considerare il ruolo svolto da alcuni interferenti endocrini presenti nell'ambiente o nel cibo e dalle terapie ormonali, contraccettive o sostitutive, che possono avere un effetto fisiopatologico sesso-specifico (Csaba et al., 2000; Csaba et al., 2011; Roy et al., 2009). Allo stesso modo, anche gli inibitori dell'aromatasi, i bloccanti

degli estrogeni, gli inibitori dell'enzima 5-alfa-reduttasi di tipo I e II possono determinare importanti effetti collaterali sesso-specifici.

Un'altra categoria di ormoni da tenere in considerazione sono quelli che vengono prodotti in situazioni di stress, come il cortisolo, che, se prodotti in maniera prolungata, possono avere effetti negativi sulla salute aumentando il rischio per disturbi mentali, come la depressione e l'ansia, e per disturbi metabolici e cardiovascolari. Dati di letteratura riportano che le donne sono più a rischio di queste patologie rispetto agli uomini (Verma et al., 2011). Maschi e femmine hanno un diverso modo di reagire a differenti situazioni stressanti. Per esempio, una differenza riguarda la produzione di adrenalina, un ormone che innesca le tipiche reazioni attacco o fuga. I suoi livelli, ovviamente, aumentano in entrambi i sessi ma nei maschi è stata osservata una correlazione positiva con la motivazione al successo e negativa con l'ansia, mentre nelle femmine si associano con una bassa autostima e una mancanza di soddisfazione alle aspettative sociali (Wright et al., 1981). Assieme all'adrenalina aumenta anche il livello di cortisolo: nei maschi questo ormone raggiunge livelli quasi doppi rispetto a quelli osservati nelle femmine; oltre al fatto che i maschi mostrano un aumento nell'anticipazione agli eventi stressanti che, al contrario, non avviene nelle femmine (Kirschbaum et al., 1992).

L'asse ipotalamo-ipofisario-surrenale (HPA) è il principale componente del sistema neuroendocrino che risponde a stimoli interni ed esterni. Il corretto funzionamento dell'asse è fondamentale per il mantenimento della salute fisica e mentale poiché una sua alterazione è stata associata a diversi disturbi mentali e fisici (Oyola e Handa, 2017). Recenti revisioni della letteratura (Oyola e Handa, 2017; Leistner e Menke, 2020) riportano numerose evidenze che supportano il coinvolgimento di differenze sesso-specifiche nella regolazione dell'asse HPA in risposta allo stress e si suppone che queste differenze possano in parte spiegare la predominanza del genere femminile nei disturbi mentali legati allo stress. I modelli preclinici hanno chiaramente dimostrato che l'asse HPA nelle femmine viene attivato più rapidamente determinando una maggiore produzione di ormoni dello stress rispetto ai maschi. Sono, infatti, i livelli degli ormoni steroidei nelle femmine durante il ciclo mestruale che contribuiscono alle differenze di sesso nell'attività dell'asse. Al contrario, studi clinici hanno prodotto risultati contrastanti, probabilmente dovuti a differenti tipi di eventi stressanti, età dei partecipanti, uso di contraccettivi e alle diverse fasi del ciclo mestruale. Ad oggi, sono necessari ulteriori studi per approfondire e chiarire i meccanismi di questi processi legati allo stress cronico sull'umano (Leistner e Menke, 2020).

Quindi, tenere conto dei livelli ormonali endogeni e della potenziale esposizione a ormoni esogeni o ai loro inibitori è fondamentale per valutare il ruolo degli ormoni sui parametri analizzati, eseguendo anche studi di replica per la validazione dei risultati ottenuti. E' opportuno sottolineare che non tutte le differenze sessuali sono legate agli ormoni, poiché alcune differenze nel trascrittoma sono presenti nelle primissime fasi della vita prenatale, prima della comparsa degli ormoni sessuali (Garsett et al., 2022).

### **2.3 Microbiota**

Con il termine microbiota umano si intende l'insieme di microrganismi (batteri, archea, protozoi, funghi e alghe), concentrati in prevalenza nell'intestino, che, in maniera fisiologica e talvolta patologica, vivono in simbiosi con l'organismo con caratteristiche di unicità per ogni individuo (Berg et al., 2020). Il microbiota è un sistema in continuo cambiamento ed è influenzato da diversi fattori: età, stile di vita, ambiente, alimentazione, indice di massa corporea (BMI), terapie farmacologiche, incluse quelle ormonali, etnia ed anche sesso e genere (Mueller et al., 2006). Sebbene le differenze nella composizione del microbiota intestinale fra uomini e donne siano poco conosciute (Kim et al., 2020), sembra che queste differenze emergano durante la pubertà e che siano associate ai cambiamenti nei livelli ormonali sessuali che caratterizzano questo periodo (Vemuri et al., 2019). Tuttavia, alcuni autori hanno messo in evidenza che differenze di genere sono presenti anche nel microbiota dei prematuri (Chen et al., 2021). Questi cambiamenti si riscontrano soprattutto nella donna in particolari periodi della vita, come la gravidanza (Yurkovetskiy et al., 2013). Dalla letteratura emerge inoltre che il microbiota è strettamente connesso al sistema immunitario e che le differenze fra uomini e donne nella sua composizione possono influenzare la risposta immunitaria (Markle et al., 2013). Recenti evidenze scientifiche hanno inoltre dimostrato che il microbiota intestinale è interconnesso con il funzionamento del sistema nervoso centrale, influenzando lo sviluppo cognitivo e alcuni aspetti emotivo-comportamentali. In questo contesto, il genere potrebbe giocare un ruolo fondamentale nello sviluppo di malattie psichiatriche o e neurodegenerative (Holingue et al., 2020).

Alla luce di tutte queste evidenze, risulta di fondamentale importanza capire come il sesso sia in grado di influenzare la composizione del microbiota intestinale che, a sua volta, si ripercuote sulla risposta immunitaria e sul funzionamento del sistema nervoso centrale. Tuttavia, ad oggi, gli studi riguardanti il microbiota focalizzati sulle differenze di genere sono ancora pochi. Nei futuri progetti di ricerca sarà quindi importante studiare la composizione del microbiota in modelli animali che includano entrambi i sessi, nello stesso rapporto numerico. Allo stesso modo, negli studi che prevedono un trapianto fecale da paziente a modello animale, il sesso del paziente e del modello animale trapiantato dovrebbe essere lo stesso. Infine, negli studi clinici, oltre a tenere in considerazione il sesso dei pazienti, bisognerebbe valutare anche il ruolo di fattori comportamentali, dello stile di vita e delle abitudini alimentari genere-specifiche nell'influencare la composizione del microbiota.

### **2.4 Immunità e infiammazione**

Molti studi suggeriscono che specifici fattori associati al sesso siano fondamentali nel regolare la risposta immunitaria e i processi infiammatori. Il sistema immunitario agisce infatti in modo differente tra uomini e donne. Mentre gli uomini sono generalmente più suscettibili alle infezioni date da patogeni, le donne sono più frequentemente colpite dalle malattie autoimmuni e rispondono maggiormente ai vaccini (Klein et al., 2012; Lasrado et al., 2020). Queste diversità nella risposta infiammatoria/immunitaria possono dipendere da numerosi fattori, tra cui lo stile di vita, l'ambiente, fattori ormonali, genetici ed epigenetici. Come già detto, gli estrogeni ad alte concentrazioni possono avere un ruolo anti-infiammatorio e a basse concentrazioni un ruolo pro-

infiammatorio (Ortona et al., 2019). In particolari periodi della vita della donna, inoltre, gli ormoni possono variare la loro produzione determinando alterazioni nella risposta immunitaria. Ad esempio, la gravidanza rappresenta un periodo critico per l'evoluzione ed il decorso delle patologie autoimmuni. A seguito dei cambiamenti nei livelli ormonali che si verificano in questo periodo, i sintomi di alcune patologie autoimmuni migliorano, mentre quelli di altre patologie peggiorano o si manifestano per la prima volta (Ortona et al., 2019; McCombe et al., 2018).

Considerate le numerose differenze di genere nella risposta immunitaria, diventa estremamente importante tenere conto di tutte queste variabili all'interno delle diverse fasi della ricerca sia nelle sperimentazioni precliniche che cliniche: dalla pianificazione del progetto, alla raccolta e all'analisi dei dati fino alla presentazione e all'interpretazione dei risultati. Quindi, anche nell'ambito dell'immunità e dell'infiammazione sarebbe opportuno considerare in che fase del ciclo riproduttivo si trova la donna (età fertile, gravidanza, menopausa) in quanto il cambiamento ormonale tipico di queste fasi potrebbe incidere sui risultati ottenuti.

## **2.5 Stress**

In un'analisi prospettica condotta su ampia scala nella popolazione adulta e' stata osservata un'associazione tra stress e un maggiore rischio di sviluppare patologie psichiatriche, come ansia e depressione, ma anche patologie metaboliche e cardiovascolari (Iwata et al., 2013; Kivimaki et al., 2018; Dragano et al., 2017). La depressione, in particolare, è due volte più frequente nelle donne rispetto agli uomini, e si manifesta più frequentemente in comorbidità con le patologie cardiovascolari (Albert et al., 2015; Bucciarelli et al., 2020). È nota, infatti, la correlazione positiva tra disturbo depressivo e infarto miocardico acuto, scompenso cardiaco o stroke (Gafarov et al., 2015). Inoltre, l'ansia, un altro fattore di rischio cardiovascolare, si manifesta più frequentemente nelle donne nel corso della vita, con un rapporto uomini: donne di 1:1.7 e correla con sindromi coronariche acute in pazienti con malattia coronarica (McLean et al., 2011; Ueyama et al., 2008). La cardiomiopatia di Takotsubo (TS), caratterizzata da disfunzione contrattile transitoria del ventricolo sinistro, è l'esito di uno stress psicologico intenso che determina il rilascio di catecolamine circolanti e un'alterata vasodilatazione coronarica. La riduzione dei tassi di estrogeni nelle donne in post-menopausa aumenta la suscettibilità a sviluppare la sindrome di Takotsubo, e le donne di età superiore ai 55 anni hanno una probabilità 5 volte maggiore di sviluppare TS rispetto a donne più giovani (Deshmukh et al., 2012). Lo stress mentale nelle donne può indurre più emozioni negative rispetto agli uomini e innescare maggiore aggregabilità piastrinica e più casi di ischemia miocardica (Samad et al., 2014). Inoltre, lo stress può ridurre la risposta ai vaccini e modificare la farmacocinetica e farmacodinamica di diversi farmaci (Campesi et al., 2021).

Negli studi in cui si valuta lo stress come fattore di vulnerabilità bisogna quindi considerare come le risposte ad eventi stressanti possano innescare processi biologici distinti nei due sessi e quindi indurre una vulnerabilità' differente anche per patologie in comorbidità come quelle cardiovascolari.

## ***2.6 Fattori ambientali, culturali, etnici***

Alcune delle differenze tra uomini e donne sono di natura sociale e culturale e contribuiscono a plasmare il concetto di genere (Busoni et al., 2000). L'identità di genere si acquisisce durante il processo di socializzazione ed è il risultato dell'interrelazione tra le attitudini dei genitori, l'educazione ricevuta e l'ambiente socioculturale (Neil et al., 2011). Il genere risulta essere complesso e multidimensionale, non facilmente riconducibile a variabili che si possono analizzare in ambito scientifico se non con la collaborazione di studiosi in scienze sociali. Nella maggior parte degli studi clinici il campione di riferimento è rappresentato dal soggetto maschio, caucasico, tra i 18 e 65 anni che sappiamo non essere rappresentativo della popolazione generale (Di Blasio et al., 2021). Oltre alla sottorappresentazione femminile, la forte globalizzazione alla quale si è assistito negli ultimi anni ha aumentato la complessità del sistema, o meglio, l'effetto dei cambiamenti strutturali creati dalla globalizzazione hanno avuto conseguenze sui tassi di occupazione delle donne rispetto all'economia nel suo complesso. Per esempio, la quota di lavoro maschile, che è direttamente e indirettamente dipendente dal commercio (quindi da ciò che è alla base della globalizzazione), è molto più alta di quella delle donne. Inoltre, nella quasi totalità degli studi non vengono considerate le misure di altre variabili sociali (cultura, stato socioeconomico, etnia, orientamento sessuale, religioni, ecc.) e il modo in cui queste si intersecano fra di loro e con il sesso e/o il genere (Assari et al., 2020).

Su queste basi diviene fondamentale durante la stesura di un progetto di ricerca o di uno studio clinico considerare tutti i fattori che a vari livelli possono influenzare le differenze di genere. Gli studi futuri, oltre ad un arruolamento il più possibile bilanciato di uomini e donne, dovranno tenere presente l'opportunità di includere rappresentanti delle diverse etnie presenti sul territorio nazionale.

## ***2.7 Fattori psicologici***

Oltre agli aspetti socioculturali e ambientali, anche gli aspetti psicologici devono essere considerati come fattori che influenzano e determinano le differenze di genere. Dai dati scientifici riportati in letteratura, emergono delle differenze psicologiche statisticamente significative, tra uomini e donne. In relazione agli aspetti cognitivi, ad esempio, le donne sembrano più competenti nelle abilità linguistico-verbali e nella comunicazione di tipo non verbale e nell'espressione e riconoscimento delle emozioni; gli uomini sarebbero più abili nei compiti visuo-spaziali, come orientamento e rotazione mentale degli oggetti (Jancke et al., 2018; Chen et al., 2018). Prendendo in considerazione, invece, gli aspetti comportamentali, le donne tendono a manifestare le proprie emozioni più apertamente, hanno forti disposizioni relazionali, mostrano una maggiore capacità empatica e sono inclini a chiedere aiuto più facilmente in relazione a problemi di salute fisica e mentale (Taras et al., 2021; Marialaura et al., 2020; Thompson et al., 2016). In relazione alla salute mentale, alcune patologie, come depressione e ansia, come già detto precedentemente, sono più rappresentate nel genere femminile e mostrano un quadro sintomatologico e un decorso differente nei due sessi (Kuehner et al., 2017).



Risulta quindi importante, nella realizzazione dei progetti di ricerca, avere una conoscenza di questi aspetti al fine di proporre degli strumenti di valutazione psicologica adeguati, cercando di tenere in considerazione le differenze di genere durante le valutazioni cliniche, eliminando ogni tipo di stereotipo che a volte considera la donna più vulnerabile e fragile dell'uomo. In un'ottica di medicina di genere è importante coinvolgere a livello di ricerca diverse figure professionali, medici, psicologi, ricercatori, al fine di creare una equipe multidisciplinare per proporre protocolli di diagnosi, valutazione e riabilitazione genere-specifici e adottare il principio dell'intersettorialità.

## **2.8 Stili di vita**

L'epigenetica regola l'espressione genica in risposta a stimoli ambientali. Sono note le differenze di sesso nei processi epigenetici indotti da fattori biologici endogeni (es., ormoni ed enzimi) (Shepherd et al., 2021), da fattori ambientali e socioculturali associati al genere (es., dieta, esercizio fisico, fumo di sigaretta, tossine ambientali, farmaci, vitamine, agenti infettivi, rischi professionali e stress psicosociale) (Govender et al., 2022; Landen et al., 2019; Koo et al., 2021;). La dimensione di genere è strettamente connessa a norme e atteggiamenti legati alle aspettative e alle relazioni sociali che modificano non solo l'identità di genere di una persona (Maierà and Pagnotta, 2022), ma anche la qualità dell'accesso all'assistenza sanitaria e il diritto a vivere una vita sana, come ad esempio le relazioni con medici e strutture sanitarie o modi diversi di interiorizzare una diagnosi (Bacigalupe et al., 2020). Tuttavia, nella pratica medica quotidiana e nell'esperienza soggettiva della salute e della malattia non è facile separare l'influenza del sesso da quella del genere. I fattori legati al sesso possono influenzare la salute modificando il comportamento: il testosterone, ad esempio, può causare reazioni aggressive associate all'esposizione al rischio e al mancato rispetto delle raccomandazioni mediche. Inoltre, i comportamenti di genere possono modificare i fattori biologici e quindi la salute: l'esposizione a stress, tossine, alimentazione o scelte di vita possono indurre modificazioni genomiche ed epigenetiche negli adulti e nei bambini (Regitz-Zagrosek et al., 2012).

La peculiarità più interessante di una modificazione epigenetica è che essa può avere luogo in risposta a stimoli ambientali esterni che riguardano non solo l'ambiente che ci circonda, ma anche i comportamenti e lo stato di salute. Altre importanti caratteristiche delle modificazioni epigenetiche sono la reversibilità e l'ereditarietà; possono essere trasmesse da una cellula all'altra, possono subire ulteriori cambiamenti nel tempo, sempre in risposta a stimoli esterni, e possono avvenire in diverse fasi della vita, non solo a livello embrionale, ma anche quando l'organismo è già sviluppato.

Nel programmare la ricerca è quindi necessario considerare anche i comportamenti come variabili in grado di modificare i risultati sperimentali ottenuti in modo genere-specifico.

Nella **Tabella 1** sono riassunti, per argomento, i suggerimenti e le indicazioni per un corretto protocollo di ricerca che consideri i determinanti di sesso e genere.

### 3. Studi preclinici

Vengono chiamati studi preclinici tutti quegli studi che, prima di qualsiasi sperimentazione sulla specie umana, consentono, mediante l'uso di differenti modelli, di individuare meccanismi patogenetici, di identificare biomarcatori diagnostici, prognostici e predittivi e/o bersagli terapeutici appropriati, di valutare nuovi composti con attività farmacologica o dispositivi medici. Gli studi preclinici possono essere studi *in vitro* (su cellule isolate e coltivate in laboratorio, o organi isolati e tessuti isolati), *in vivo* (su animali da laboratorio) ed *ex vivo* (su materiale o cellule isolate di fresco da animali da esperimento o da soggetti umani volontari, ad esempio dal sangue periferico) (Becker et al., 2005; Buoncervello et al., 2017) e in silico (modelli di simulazione e visualizzazione computerizzata di processi biologici).

Tuttavia, in questi studi il sesso del donatore viene spesso ignorato: nella maggioranza degli studi su linee cellulari o cellule fresche isolate da tessuti non viene riportato il sesso di origine dell'organismo da cui derivano e per quanto riguarda gli studi *in vivo* su modelli animali, nella maggioranza dei casi vengono usati animali di sesso maschile.

#### 3.1 Il sesso delle cellule negli studi *in vitro* e *ex vivo*

Per quanto riguarda gli studi *in vitro* sulle cellule, molte linee cellulari utilizzate sono in coltura ormai da decenni ed è noto come i vari passaggi nelle fiasche di coltura possano portare a modifiche importanti del patrimonio genetico, incluse alterazioni del cariotipo e la perdita o la presenza di cromosomi sessuali soprannumerari (De Souza Santos et al., 2018). Inoltre, tra i possibili artefatti derivanti da anni di manipolazioni in laboratorio, le cellule in coltura possono mostrare modifiche anche delle loro caratteristiche fenotipiche, inclusa la presenza di specifici recettori come quelli ormonali, cosicché in molti casi la stessa linea cellulare è risultata diversa tra un laboratorio e l'altro. Ad esempio, la linea cellulare polmonare CRL-5873, originariamente ottenuta da una donatrice, ora ospita frammenti del cromosoma Y, mentre in alcuni casi è stata osservata la perdita del cromosoma Y da linee cellulari originariamente ottenute dai maschi. L'American Type Culture Collection (ATCC) riporta che nella loro collezione circa 100 linee cellulari originariamente derivate da uomini o topi maschi hanno ora "perso" il cromosoma Y e questo fenomeno è particolarmente comune nelle linee cellulari tumorali. L'instabilità cromosomica è comune anche nelle linee cellulari trasformate. L'introduzione di oncogeni virali è un metodo consolidato per produrre una linea immortalizzata; tuttavia, man mano che i passaggi si accumulano, si verificano cambiamenti fondamentali nel genotipo e nel fenotipo e le linee cellulari trasformate sono suscettibili alla perdita sia dei cromosomi autosomici che di quelli sessuali. È importante sottolineare che queste perdite non si verificano in modo uniforme e che le culture di linee trasformate tendono ad essere un mosaico di schemi cromosomici. Pertanto, le linee cellulari trasformate non consentono la valutazione del sesso come variabile biologica. Tenere conto del sesso del donatore nelle analisi su cellule isolate, sia negli studi *in vitro* che *ex vivo*, è invece certamente importante poiché è noto che molti tipi di cellule maschili e femminili (per esempio le cellule endoteliali, le muscolari lisce, ecc.) rispondono diversamente a stimoli chimici e ad alterazioni del microambiente.

a causa di differenze intrinseche, sia genetiche che fenotipiche (Shah et al., 2014; Durkin et al., 2000). Le differenze cellulari determinate dalla presenza dei cromosomi sesso-specifici (XX, XY) hanno mostrato come le cause delle differenze nell'insorgenza o nella progressione di molte malattie possano risiedere nei meccanismi associati a risposte diverse delle cellule XX e XY: a parità di "stress" (stress ossidativo, ad esempio) alcuni tipi di cellule femminili sembrano capaci di contrastare le alterazioni indotte (ad esempio le ossidazioni delle proteine) meglio di quelle maschili, mostrano maggiore "plasticità" e sanno adattarsi ai cambiamenti ambientali (Maselli et al., 2009). Se sottoposti a stress, alcuni tipi di cellule maschili vanno incontro a morte cellulare per apoptosi più facilmente delle corrispondenti cellule femminili che sono invece in grado di innescare più efficacemente i processi di citoprotezione (antiossidanti, autofagici) che consentono alla cellula di sopravvivere (Straface et al., 2012). Questa diversità dipende almeno in parte da un sistema di detossificazione più o meno efficiente. Alcuni tipi di cellule maschili hanno minore potere anti-ossidante e, in particolare, minori livelli di glutazione. Queste differenze sono riscontrabili in cellule di diverso istotipo come cellule vasali (muscolari lisce, endoteliali) e fibroblasti, ma dopo 7-10 passaggi queste caratteristiche vengono perse, e le cellule, indipendentemente dal sesso di origine, divengono tutte uguali (Maselli et al., 2009).

Poiché, come detto sopra, l'utilizzo di linee cellulari rappresenta uno strumento indispensabile per tutti gli studi preclinici di laboratorio, dallo "screening" di nuovi farmaci alle valutazioni di tossicità, è importante utilizzare cellule isolate, rigorosamente controllate a livello genetico e molecolare. È quindi importante che i ricercatori siano consapevoli del sesso delle loro cellule e progettino studi di coltura cellulare che tengano conto dei possibili contributi dei cromosomi sessuali, includendo e comparando cellule di ciascun sesso. Quando possibile, inoltre, sarebbe ottimale predisporre una scheda che riassume le caratteristiche di ciascun donatore per quanto riguarda il genere, il sesso e l'età (Franconi et al., 2015).

Nella **Tabella 2** sono riassunti alcuni aspetti importanti da considerare nelle sperimentazioni precliniche *in vitro* e *ex vivo*.

### **3.2 Culture cellulari e media**

Esistono molte formulazioni di terreni con miscele variabili di componenti nutritivi e non nutritivi, tra cui glucosio, amminoacidi, vitamine e minerali, nonché sali inorganici e tamponi per mantenere l'osmolarità e il pH dell'ambiente extracellulare. Sebbene le formulazioni classiche del mezzo sintetico supportino la vitalità di un'ampia gamma di tipi di cellule, è importante ricordare che il mezzo fornisce un ambiente artificiale rispetto alle condizioni fisiologiche. Ad esempio, un confronto tra i mezzi sintetici "classici" più utilizzati, il Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) e il Roswell Park Memorial Institute 1640 (RPMI1640), con il normale plasma umano o di topo ha rivelato differenze significative nelle concentrazioni di glucosio, micronutrienti ed elettroliti (Arigony et al., 2013). Allo stesso modo, molti terreni contengono componenti che esercitano azioni simili agli estrogeni e possono legarsi ai recettori degli estrogeni (ER) presenti nella maggior parte dei tipi di cellule, avviando segnali sia genomici che non

genomici che influenzano la proliferazione, la differenziazione e il metabolismo cellulare (Sikora et al., 2016). È importante quindi un'attenta valutazione di come i mezzi di coltura possano di per sé cambiare l'esito degli esperimenti influenzando i parametri che rispondono agli ormoni sessuali *in vitro*. Di seguito, discutiamo tre comuni costituenti dei media che possono influenzare l'ambiente degli ormoni sessuali delle cellule in coltura.

### *Siero*

I terreni di coltura cellulare disponibili in commercio spesso richiedono un'integrazione con siero di origine animale per supportare la vitalità cellulare. Il siero contiene ormoni (inclusi gli steroidi sessuali), proteine, carboidrati, lipidi, vitamine e fattori di crescita necessari per la crescita cellulare, il metabolismo, l'adesione e la proliferazione. Il siero fetale bovino (FBS) e il siero bovino di vitello sono i tipi di siero più comunemente usati (Brunner et al., 2010). L'uso del siero nei terreni di coltura cellulare è problematico per diversi motivi. Innanzitutto, la composizione del siero è variabile a seconda dell'età della madre, della composizione del mangime, della stagione della macellazione e della posizione geografica del macello. Inoltre, i lotti di FBS vengono prodotti combinando il siero di più feti. In passato, si presumeva che questa miscelazione avrebbe "appianato" la variabilità nella composizione del siero; tuttavia, i ricercatori raramente analizzano o tengono conto della composizione chimica dei loro lotti di siero a causa di tempi e costi. Al fine di evitare la potenziale influenza degli ormoni sierici, le concentrazioni di ormoni sessuali vengono ridotte al minimo mediante filtraggio a carbone. Molti fornitori commerciali distribuiscono Charcoal Stripped Fetal Bovine Serum, ma una variabilità da lotto a lotto è stata osservata. È necessario, pertanto che i ricercatori segnalino la marca del siero e il numero di lotto per migliorare il rigore scientifico e la trasparenza delle proprie ricerche (Van der Valk et al., 2017; McKee et al., 2017).

### *Rosso fenolo*

Il rosso fenolo è un comune indicatore di pH presente nella maggior parte dei terreni disponibili in commercio. Apparendo rosso vivo in una coltura cellulare a un pH di 7,4, il rosso fenolo diventa giallo in risposta all'acidificazione del terreno durante la crescita cellulare. La struttura della molecola assomiglia ad alcuni estrogeni non steroidei ed è in grado di legare e attivare gli ER in modo dose-dipendente (Moreno-Cuevas et al., 2000). L'effetto del rosso fenolo sui fenotipi cellulari è stato dimostrato in diverse linee cellulari anche tumorali. Ad esempio, le cellule MCF-7 sono più proliferative nei terreni contenenti maggiori livelli di rosso, suggerendo un effetto sulla crescita cellulare simile agli estrogeni (Wesierska-Gadek et al., 2007). Gli effetti estrogenici del rosso fenolo non sono limitati alle cellule cancerose. I marcatori di proliferazione e differenziazione nelle colture primarie di cellule ipofisarie immature e cellule uterine di ratto sono aumentati quando le cellule sono coltivate in terreni contenenti rosso fenolo rispetto a cellule coltivate in terreni privi di rosso fenolo. Inoltre, il rosso fenolo inibisce la depolarizzazione neuronale in modo simile a quando le cellule sono esposte al 17  $\beta$ -estradiolo (Berthois et al., 1986). È importante notare che i preparati di terreno disponibili in commercio contengono diverse concentrazioni di rosso fenolo, ad esempio, DMEM contiene circa 40  $\mu$ M di rosso fenolo, mentre DMEM/F12 e RPMI 1640 ne contengono rispettivamente circa 22  $\mu$ M e 13  $\mu$ M. Un altro fattore da considerare è

che il siero aggiunto al terreno lega il rosso fenolo, riducendone così l'attività. Pertanto, i ricercatori devono essere consapevoli delle concentrazioni di rosso fenolo nei terreni, nonché dei possibili effetti confondenti che possono verificarsi a causa della sua presenza, e riportare sia la marca che il numero di lotto di tutti i terreni utilizzati. Esistono in commercio terreni senza rosso fenolo, utili per testare se i parametri da analizzare possano essere influenzati dal rosso fenolo (Wesierska-Gadek et al., 2007).

#### *La plastica*

La plastica utilizzata per la maggior parte delle colture cellulari contiene polistirene, che rilascia composti fenolici nel mezzo in grado di agire come deboli estrogeni e di attenuare gli effetti degli estrogeni esogeni. Pertanto, anche il materiale plastico per colture cellulari deve essere considerato come un possibile elemento estrogenico confondente (Soto et al., 1991). I ricercatori sono incoraggiati a testare una gamma di plastiche con le loro cellule di interesse ed evidenziare possibili differenze nei fenotipi dipendenti dagli estrogeni, inclusa la capacità di proliferazione e differenziazione.

### **3.3 Studi in vivo su animali da esperimento**

Nel programmare uno studio sperimentale che coinvolga animali è essenziale prevedere l'inclusione di animali di entrambi i sessi. Le possibili differenze legate al sesso dovrebbero essere osservate in animali adulti, maschi e femmine della stessa età riproduttiva con gonadi intatte. Infatti, è importante accertare che la differenza di sesso sia presente in normali condizioni di laboratorio. Per essere comparabili è anche importante che gli animali studiati, maschi e femmine, siano compagni della stessa cucciolata. Infatti, l'uso di roditori con lo stesso background genetico, ma allevati in siti e ambienti diversi può introdurre differenze fenotipiche nella prole non correlate al sesso (Buoncervello et al., 2017; Karp et al., 2019).

Un ulteriore aspetto da tenere in considerazione riguarda le fonti esogene di estrogeni che potrebbero influenzare alcuni parametri in modo sessualmente dimorfico. Alcuni esempi di fonti esogene di estrogeni sono il cibo per roditori (fitoestrogeni di soia), le lettiere (pannocchia), le gabbie e bottiglie d'acqua (bisfenolo-A della plastica) (Mauvais-Jarvis et al., 2017; Soto et al., 1991).

Altri aspetti da considerare sono il sesso degli sperimentatori che potrebbe influenzare la risposta al dolore dei roditori e l'ora e la stagione in cui vengono effettuati gli esperimenti per tenere conto delle oscillazioni ormonali conseguenti (Sorge et al., 2014). Una volta controllati tutti questi importanti parametri, è possibile utilizzare diversi approcci per trovare le variabili che influenzano in modo differenziale il tratto nei due sessi.

Tutte queste variabili devono essere considerate quando si pianificano studi preclinici *in vitro* e *ex vivo* e nella **Tabella 3** sono riassunti gli aspetti più importanti.

### **3.4 Il ruolo degli ormoni gonadici dopo la pubertà**

Una domanda importante da porsi se si osservano differenze di sesso è fino a che punto queste siano dovute all'azione dell'estradiolo (E2) nelle femmine o all'azione del testosterone nei maschi. Risposte a queste domande si possono ottenere, ad esempio, eseguendo l'ovariectomia (OVX) nelle femmine, per sopprimere le secrezioni ovariche, inclusi E2 e progesterone (P4), e l'orchiectomia nei maschi, per determinare l'impatto del testosterone. È importante sottolineare che la chirurgia provoca alterazioni prolungate dell'asse ipotalamo-ipofisi-surrene e quindi influenza gli ormoni dello stress. Pertanto, se viene eseguita la gonadectomia, il gruppo di controllo deve essere sottoposto a chirurgia simulata (senza gonadectomia). Per fare l'esempio del ruolo di E2, se OVX nelle femmine abolisce la differenza di sesso in un particolare tratto, allora dovrebbe essere eseguita la terapia sostitutiva con E2 a concentrazioni fisiologiche, per determinare se E2 ripristina il fenotipo della femmina intatta. Questo esperimento viene solitamente eseguito in un disegno a tre gruppi: controlli con gonadi intatte, OVX con somministrazione di terreno più E2 e OVX con somministrazione di terreno senza aggiunta di E2. Se E2 ripristina il fenotipo al livello dei controlli, si può concludere che E2 contribuisce alla differenza di sesso osservata. Possono essere utilizzati diversi metodi di terapia sostitutiva con E2 che includono l'iniezione sottocutanea quotidiana (SC) di E2 in olio o impianto SC di pellet contenenti E2 disponibili in commercio. Una volta accertato il ruolo di E2, può essere importante determinare quale recettore per gli estrogeni (ER) medi l'effetto. Un metodo consiste nell'utilizzare agonisti selettivi disponibili in commercio per ER $\alpha$  (PPT) o ER $\beta$  (DPN), che possono essere somministrati nei topi OVX come descritto per E2. I risultati della manipolazione farmacologica sono quindi confermati dall'eliminazione genetica dell'ER bersaglio in topi femmina knockout di questi recettori.

Per ulteriori dettagli consultare il documento *European Commission, Directorate-General for Research and Innovation, Gendered innovations: how inclusive analysis contributes to research and innovation, Publications Office, 2020, <https://data.europa.eu/doi/10.2777/619077>*.

### **3.5 Four core genotypes**

Il modello murino dei "Four core genotypes" (FCG) permette di verificare se le differenze fenotipiche tra i sessi siano causate principalmente dai cromosomi sessuali (XX vs. XY), dagli ormoni gonadici o da entrambi. Il modello prevede l'eliminazione del gene Sry dal cromosoma Y e l'inserimento di un transgene Sry su un autosoma. Si otterranno quindi topi XX e XY con testicoli e topi XX e XY con ovaie, e si potranno comparare i topi XX e XY con lo stesso tipo di gonade per valutare gli effetti dei cromosomi sessuali sul fenotipo di cellule e tessuti (Arnold et al., 2008).

## **4. Studi epidemiologici, l'importanza di disaggregare i dati per sesso, genere ed età**

L'epidemiologia ha avuto un grande ruolo nel far emergere differenze tra uomini e donne nello sviluppo, nella sintomatologia e nel decorso di molte patologie, facendo slittare il paradigma di una norma maschile verso un'idea di medicina genere-specifica.

Uomini e donne non si ammalano, infatti, allo stesso modo, incidenza e prevalenza delle patologie sono diverse nei due sessi e, di conseguenza, anche il loro impatto, in termini di utilizzo di risorse sanitarie è differente (Bertakis et al., 2000). Da un'analisi della popolazione con malattie croniche stratificata per sesso è emerso come le donne abbiano un impatto maggiore, in termini di complessità assistenziale, e quindi di consumo di risorse sanitarie, in diverse patologie, come lo scompenso cardiaco e la demenza, mentre in patologie come diabete e BPCO sono gli uomini ad assorbire maggiormente le risorse sanitarie (Thompson et al., 2016). La fascia di popolazione più anziana in Italia è in prevalenza di sesso femminile: le donne vivono più a lungo degli uomini – secondo il rapporto Istat 2021 la speranza di vita è di 79,7 anni per gli uomini e 84,4 per le donne – tuttavia, questi 4 anni di vita “guadagnati” spesso sono anni vissuti con disabilità. Un recente studio, basato sui dati dei paesi Ocse, conferma come le donne, sebbene più longeve rispetto agli uomini, siano esposte a un maggior rischio di sviluppare malattie croniche, che incidono in maniera drammatica sulla salute e sulla qualità della vita. Le donne, inoltre, trascorrono più anni in solitudine e con redditi più bassi. Sebbene sussistano queste importanti differenze, la variabile “genere” non viene sempre considerata in modo appropriato negli studi epidemiologici, le analisi vengono spesso presentate riportando un dato complessivo, che comprende sia gli uomini che le donne, non dando la possibilità a eventuali differenze di poter emergere.

Il sesso andrebbe pertanto tenuto in considerazione non solo nella presentazione delle analisi, ma anche in fase di progettazione dello studio. Questo aspetto è molto importante soprattutto quando si tratta di studi di farmaco-epidemiologia, mirati a valutare efficacia e sicurezza di un trattamento farmacologico. Le donne, tuttavia, sono sotto-rappresentate nei trial clinici randomizzati: la percentuale di donne arruolate supera di poco il 20% negli studi clinici di fase 1; ne risulta, quindi, che in alcuni casi l'approvazione dei farmaci si basa su risultati ottenuti su una popolazione prevalentemente di sesso maschile (Steinberg et al., 2000).

#### ***4.1 Approccio di genere nella prevenzione***

La stratificazione per genere è importante, inoltre, per una attenta lettura dello stato di salute della popolazione

Nel Piano nazionale della prevenzione 2020-2025 (PNP) l'approccio di genere è visto come cambio culturale e di prospettiva, affinché la valutazione delle variabili biologiche, ambientali e sociali, dalle quali possono dipendere le differenze dello stato di salute, diventi una pratica ordinaria in ogni ambito di intervento sanitario, per evitare stereotipi e al contempo definire strategie volte a contrastare le disuguaglianze e ad aumentare l'appropriatezza di interventi e prestazioni. La dimensione di genere non consiste solo in un focus sulla donna e sulle patologie e condizioni esclusivamente femminili, bensì viene considerata come un approccio da prevedere e sostenere in ogni ambito di intervento sanitario, dalla prevenzione e promozione della salute alla cura. Attraverso la definizione del profilo di salute ed equità della comunità, le Regioni, nel declinare i propri obiettivi, hanno potuto identificare priorità e azioni sulle quali attivare le risorse della prevenzione e al tempo stesso misurare i cambiamenti del contesto e dello stato

di salute, confrontando l'offerta dei servizi con i bisogni della popolazione, anche in relazione alle differenze di genere.

I Piani Regionali della Prevenzione, adottati da tutte le Regioni e le PA con proprie delibere entro il dicembre 2021, nei sei macro obiettivi in cui il PNP è strutturato (Malattie croniche non trasmissibili; Dipendenze; Incidenti domestici e stradali; Infortuni e incidenti sul lavoro, malattie professionali; Ambiente, clima e salute; Malattie infettive prioritarie) sono stati definiti anche tenendo conto di differenze di genere, documentate dai dati delle sorveglianze di popolazione, che mostrano differenze nella distribuzione dei determinanti di malattia e nell'impatto in relazione ad altri possibili fattori correlati (individuali o di contesto). Ad esempio nell'ambito del macro obiettivo 1 - Malattie croniche non trasmissibili - attraverso interventi caratterizzati da un approccio intersettoriale, *life-course* e per *setting* (a scuola, nell'ambiente di lavoro, nella comunità e nei servizi sanitari), sono stati inclusi gli aspetti di genere nella pianificazione. Anche nel macro obiettivo 4 "Infortuni e incidenti sul lavoro, malattie professionali" si tiene conto in alcuni PRP delle differenze legate alle conseguenze degli agenti chimici, fisici, biologici, ecc., con i quali lavoratori/lavoratrici sono in contatto ma anche delle caratteristiche fisiche (peso, altezza media e forza, in generale inferiori nelle donne). Inoltre, nel perseguire l'obiettivo trasversale di contrasto alle disuguaglianze di salute, in diversi programmi, predefiniti (ossia vincolanti e comuni a tutte le Regioni) o liberi, sono state previste cosiddette "*azioni equity oriented*" che affrontano problematiche specifiche in un'ottica di genere. Sarà, pertanto, interessante, in fase di monitoraggio annuale dei PRP, verificarne il concreto impatto.

#### **4.2 Le dimensioni sesso e genere in epidemiologia**

Se la stratificazione per sesso in epidemiologia rappresenta una procedura di semplice esecuzione, ben altra cosa è tenere in considerazione la variabile "genere".

La confusione tra la dimensione del sesso con quella del genere negli studi epidemiologici, dove i due termini vengono spesso usati in modo intercambiabile, è da considerarsi una importante criticità. Confondendo le categorie di genere con il sesso, la ricerca non solo comporta il rischio di compromettere la validità dell'analisi di genere, ma limita la comprensione di quanto possano essere rilevanti le due tipologie di fattori, con implicazioni sia sul piano terapeutico che su quello della prevenzione (Sa et al., 2020).

In epidemiologia la questione della distinzione tra "genere" e "sesso" era stata posta già nei primi anni del Novecento da Alice Hamilton, pioniera dell'epidemiologia occupazionale e dell'igiene industriale. Gli studi di quegli anni avevano messo in evidenza come le lavoratrici avessero livelli di piombo nel sangue molto più elevati rispetto ai lavoratori uomini, concludendo come tali differenze potessero essere attribuite alla maggiore suscettibilità al metallo da parte delle donne. In realtà, Hamilton dimostrò come, a parità di mansione e di condizione socio economica, i livelli di piombo nel sangue fossero uguali per entrambi i generi e che le differenze osservate tra i due sessi erano legate ai settori a maggiore esposizione (ed a più bassa retribuzione), nei quali le donne erano prevalentemente impiegate. Si comprende, quindi, come in epidemiologia, la distinzione tra le caratteristiche biologiche e fisiologiche che



determinano il “sesso”, e quelle associate a ruoli e comportamenti legati alla cultura e ai condizionamenti sociali che definiscono il “genere”, consenta di interpretare al meglio il ruolo delle due categorie sullo stato di salute, anche ai fini della prevenzione. Probabilmente una intersezione tra studi sociologici e tecnico epidemiologici potrebbe consentire una migliore comprensione dell’impatto della dimensione di genere sullo stato di salute di uomini e donne.

Nonostante sia la stessa epidemiologia a mettere in evidenza differenze tra uomini e donne, parte della comunità scientifica continua a trascurare queste disparità, annullandole nella presentazione di un dato neutro o limitandosi a stratificare per genere un dato neutro in un’analisi che nella sua impostazione non prevedeva alcun approccio di genere.

La stratificazione dei dati sesso/genere a valle di uno studio può essere un buon inizio, ma non è sufficiente. È necessario un cambio di paradigma che tenga conto delle differenze di genere e di sesso nell’impostare il disegno dello studio ponendo fin da subito le domande giuste ed individuando gli strumenti più adeguati per comprenderle ed analizzarle.

La raccolta dei dati e delle informazioni, i questionari alla base delle indagini o le variabili rilevanti ai fini dello studio devono comprendere un’analisi di genere a monte dello studio. Ma anche la stessa presentazione dei risultati richiede un’attenzione al genere. In molti studi, ad esempio, i risultati presentati per sesso sono stratificati in base alle fasce di età maggiormente rappresentative della vita lavorativa piuttosto che per evoluzioni fisiologiche nella vita di uomini e donne. Si pensi, ad esempio, a come la fascia di età legata alla menopausa sia trascurata anche quando si analizzano esiti di tipo cardiologico, pur essendo noti gli effetti protettivi sul sistema cardiocircolatorio degli ormoni femminili. Un evidente bias di genere esiste anche nella stessa definizione di vita lavorativa che considera tale solo la prestazione retribuita e non il lavoro domestico non retribuito, e non riconosce come fattori occupazionali i rischi ai quali sono esposte le donne dentro casa (inquinamento indoor, incidenti domestici ecc.). Inoltre, il maggiore tempo speso nel lavoro domestico non pagato porta le donne in molte aree ad essere più stanziali e probabilmente a risentire maggiormente di eventuali contaminazioni presenti nel proprio territorio di residenza. Negli studi di epidemiologia ambientale questi aspetti possono portare a sottostimare i problemi di salute legati all’esposizione in uno o in entrambi i generi con il rischio che quei problemi possano essere attribuiti ad altre cause e non essere affrontati nell’ambito di politiche di salute pubblica. Nel disegno di studio bisognerebbe quindi chiedersi se le domande di ricerca iniziali siano adeguate a valutare l’esposizione di uomini e donne, se siano state prese in considerazione le differenze fisiologiche nella scelta dei biomarcatori, se la scelta degli esiti sanitari sia appropriata per entrambi i generi e infine se le indicazioni di sanità pubblica incideranno analogamente su entrambi i generi.

In conclusione, la ricerca epidemiologica in ottica di genere richiede la consapevolezza di come uomini e donne, oltre ad essere diversi sul piano della fisiologia, abbiano ruoli sociali e culturali differenti, che si intrecciano con il dato biologico in modo variabile nel corso della vita, e sono soggetti a condizionamenti e pregiudizi che vanno ad impattare in modo più o meno consapevole sul loro stato di salute. Una ricerca epidemiologica può

introdurre gli strumenti statistici più raffinati, ma non può fornire risposte adeguate se il disegno di studio o le domande poste non considerano l'ottica di genere.

## **5. Studi clinici**

### ***5.1 Pitfall di genere negli studi clinici***

Nel corso dei secoli le donne sono state escluse o poco rappresentate negli studi clinici, in quanto considerate non idonee a causa di alcune variabili, in particolare relative al ciclo ormonale (Labots et al., 2018). Di conseguenza il genere femminile poteva ricevere diagnosi errate, perdere opportunità di trattamento, ricevere dosi non appropriate di farmaci o, addirittura, ricevere prescrizioni farmacologiche "errate" (Uhl et al., 2007). Tutto questo ha ridotto la possibilità di generalizzare i risultati degli studi clinici all'intera popolazione. Col passare degli anni si è evidenziata una forte correlazione tra sesso e incidenza, prevalenza, sintomi, età di esordio e gravità di certe patologie (Vegeto et al., 2020; Romano et al., 2016), nonché una diversa risposta ai farmaci (Romanescu et al., 2022). Studi preclinici e clinici hanno dimostrato che esistono differenze basate sul sesso a livello genetico, cellulare, biochimico e fisiologico (Sugimoto et al., 2019). Pertanto, è ormai abbastanza chiaro che i risultati delle sperimentazioni sui trattamenti sono più rigorosi dal punto di vista scientifico se includono equamente donne e uomini, in modo da sfruttare le conoscenze atte a migliorare la diagnosi, e i trattamenti farmacologici ai rispettivi gruppi target di pazienti (Sugimoto et al., 2019).

Numerosi sforzi sono stati fatti per aumentare la rappresentatività delle donne negli studi clinici negli ultimi 30 anni. Nonostante ciò, i risultati dello studio di Steinberg e collaboratori suggeriscono che questo bias relativo al sesso sussiste tutt'ora, almeno per gli studi nordamericani (Steinberg et al., 2021). Infatti, analizzando circa 20.000 studi clinici pubblicati dal 2000 al 2020, si è rilevato che in oncologia, neurologia, immunologia e nefrologia si aveva una bassa rappresentatività delle donne; al contrario, negli studi riguardanti interventi di natura preventiva si aveva una maggiore rappresentatività delle donne. Un problema aggiuntivo, ma comunque legato alla bassa rappresentatività delle donne negli studi clinici, è costituito dal basso numero di studi aventi la finalità di ottenere risultati dettagliati in base al sesso o alle caratteristiche legate al genere. Lo studio di Sugimoto e collaboratori (Sugimoto et al., 2019), analizzando articoli pubblicati tra il 1980 e il 2016, ha rilevato che la percentuale degli studi in sanità pubblica contenenti esplicite analisi disaggregate per sesso è cresciuta dal 36% al 69%. Tuttavia, l'incremento è stato di molto inferiore sul versante degli studi clinici (da 59% a 67%), e nella ricerca di laboratorio le analisi disaggregate sesso risultano ancora sottorappresentate (31% nel 2016). In assenza di un'adeguata pianificazione degli studi clinici, prevedendo a priori analisi che tengano conto delle differenze derivanti da attributi biologici piuttosto che da ruoli, identità e comportamenti socialmente costruiti di donne e uomini, è molto difficile estrapolare ex post i risultati ottenuti dall'analisi di dati aggregati (Tannenbaum et al., 2016). Riguardo ai principi di carattere generale cui attenersi nelle fasi di pianificazione ed elaborazione dei dati degli studi clinici, ci si può basare sui lavori di Tannenbaum e McGregor (McGregor et al., 2016) e sulle linee guida SAGER (De Castro et al., 2016; Heidari et al., 2016).

## **5.2 Identificazione e validazione di biomarcatori genere specifici**

Un biomarcatore è per definizione un indicatore biologico, genetico o biochimico misurabile nei tessuti umani, nelle cellule, o nei fluidi (come siero, urine e saliva), che può essere messo in relazione con l'insorgenza o lo sviluppo di una patologia, o con l'efficacia o eventi avversi dei trattamenti per quella patologia (Califf, 2018; Biomarkers Definitions Working Group – National Institute of Health 2001).

Le caratteristiche richieste a un buon biomarcatore per poter essere utilizzato nella pratica clinica sono: i) correlazione con la patologia (biomarcatore diagnostico), con il suo andamento (biomarcatore prognostico), con la risposta o eventi avversi del trattamento (biomarcatore predittivo); ii) caratteristiche operative ottimali (sensibilità, specificità, area sotto la curva ROC - per biomarcatori espressi come valori numerici), e alto valore predittivo (esempio, capacità di individuare la malattia o di escluderla); iii) possibilità di effettuarne la determinazione con precisione, in tempi brevi e attraverso metodi non invasivi; iv) basso costo (Califf, 2018; Biomarkers Definitions Working Group – National Institute of Health 2001).

I biomarcatori possono essere usati singolarmente, oppure combinati tra loro, in modo da migliorarne le proprietà; tipici esempi si hanno in genomica, con la determinazione di biomarker multi-gene, chiamate anche “signatures” genomiche (Vanderstichele et al., 2017) .

Generalmente un biomarcatore non assume contemporaneamente tutti e tre i ruoli diagnostico, prognostico, predittivo, e inoltre i biomarcatori sono patologia-specifici e trattamento-specifici (Califf, 2018). Ci sono sempre delle eccezioni; in ambito oncologico, ad esempio, il Ki-67 ha un ruolo prognostico, ma anche predittivo e viene utilizzato insieme a parametri clinici, come stadio e grado del tumore, e stato endocrino per la scelta del trattamento sistemico del tumore alla mammella. Inoltre, esistono biomarcatori genetici associati alla prognosi in diversi tipi di tumori (Arora et al., 2021; Ow et al., 2015).

Dal punto di vista della medicina di genere, è quindi molto utile identificare biomarcatori con caratteristiche operative ottimali e alto valore predittivo che, in maniera differenziale tra donne e uomini, possano rilevare le diverse patologie, che possano riconoscere i pazienti che avranno una prognosi sfavorevole a causa della malattia, o che consentano di sviluppare piani terapeutici personalizzati.

L'identificazione di biomarcatori è un processo complesso in quanto si deve considerare il possibile effetto indotto da diverse variabili come i fattori ambientali che non vengono spesso considerati nel disegno sperimentale né nell'analisi dei dati (Pusztai, L. et al. 2013). Inoltre, nell'identificazione di biomarcatori bisogna anche considerare altre variabili, quali l'ora di raccolta del campione biologico, il tempo trascorso tra il prelievo e la misurazione, il tempo dall'assunzione del cibo, il luogo di residenza, l'età, l'abitudine al fumo e all'alcol, e molti altri fattori (Mayeux, 2004).

Non bisogna inoltre dimenticare che alcune caratteristiche dei biomarcatori possono essere sesso-specifiche, cioè alcuni marcatori possono avere un valore diagnostico, prognostico o predittivo in un sesso, ma non nell'altro (Trentini et al., 2022; Daniels e Maisel, 2015) e questo si può evincere solo analizzando i dati disaggregati per sesso. Questo è supportato da evidenze che indicano come alcune molecole potenzialmente biomarcatori di malattia o di prognosi siano sesso specifiche, perché ad esempio

influenzate da fattori ormonali o fattori fisici (Ramsey et al., 2016; Magnussen et al. 2017; Morera-Fumero et al. 2018; Mittelstrass et al., 2011).

Nelle patologie cardiovascolari, in termini di predizione di malattia, si è osservato che il colesterolo ha un potere predittivo maggiore negli uomini che nelle donne, per le quali invece la combinazione ipertensione arteriosa e diabete sembrano i fattori predisponenti principali (Pietraforte et al., 2016).

Anche nelle malattie neurodegenerative si è osservata una differenza di sesso nei livelli di alcuni marcatori nel sangue. Ad esempio, alfa-sinucleina biomarcatore per la malattia di Parkinson, oltre ad essere presente nel CSF e i cui livelli correlano con la severità di malattia, può essere anche misurabile nel sangue (plasma) dove sono stati riportati valori significativamente differenti tra uomini e donne e che potrebbero essere legati al potere protettivo degli ormoni nelle donne (Caranci et al., 2013). Altro esempio di biomarcatori sesso specifici, in questo caso di natura genetica, li possiamo trovare nella ALS dove, ad esempio, alcuni polimorfismi nel gene MTHFR sembrano aumentare il rischio di malattia nelle donne (Pietraforte et al., 2016).

Altro esempio interessante di biomarcatori sesso-specifici è quello riportato in uno studio recente di Pagano e collaboratori (Pagano et al., 2021). In questo studio in pazienti maschi e femmine con COVID19 al momento del ricovero sono stati analizzati alcuni marcatori circolanti (ferritina, D-Dimero, la conta dei neutrofili e dei linfociti, il testosterone, l'estradiolo ACE2 solubile e angiotensina 1-7) per valutare il loro valore predittivo di insorgenza di sindrome respiratoria acuta durante l'ospedalizzazione. Tutti i marcatori sono risultati in grado di predire l'insorgenza della sindrome respiratoria quando analizzati insieme in modo neutro, ma quando i dati sono stati disaggregati per sesso è emerso che un'alta conta di neutrofili e bassi livelli di [aAngiotensina 1-7](#) erano in grado di predire la sindrome respiratoria solo nelle donne e non negli uomini. Al contrario, una bassa conta di linfociti e bassi livelli di testosterone circolante sono emersi come predittori della sindrome respiratoria esclusivamente negli uomini. Gli altri marcatori mantenevano un valore predittivo in entrambi i sessi. E' evidente quindi la necessità di valutare la sesso-specificità dei marcatori utilizzati per appropriatezza clinica e rigore scientifico.

Dal punto di vista della medicina di genere è quindi utile scoprire biomarcatori con caratteristiche operative ottimali e alto valore predittivo che, in maniera differenziale tra donne e uomini, possano rilevare le diverse patologie, riconoscere i pazienti che avranno una prognosi sfavorevole a causa della malattia, e permettere di sviluppare piani terapeutici su misura.

## **Bibliografia**

Albert PR. Why is depression more prevalent in women?. J Psychiatry Neurosci. 2015;40(4):219-221. doi:10.1503/jpn.150205.

Arigony AL, de Oliveira IM, Machado M, et al. The influence of micronutrients in cell culture: a reflection on viability and genomic stability. Biomed Res Int. 2013;2013:597282. doi:10.1155/2013/597282.

Arnold AP, Chen X. What does the "four core genotypes" mouse model tell us about sex differences in the brain and other tissues? *Front Neuroendocrinol.* 2009;30(1):1-9. doi:10.1016/j.yfrne.2008.11.001.

Arora C, Kaur D, Raghava GPS. Universal and cross-cancer prognostic biomarkers for predicting survival risk of cancer patients from expression profile of apoptotic pathway genes. *Proteomics.* 2022;22(3):e2000311. doi:10.1002/pmic.202000311.

Assari S. Family Socioeconomic Status and Exposure to Childhood Trauma: Racial Differences. *Children (Basel).* 2020;7(6):57. doi:10.3390/children7060057.

Bacigalupe A, Cabezas A, Bueno MB, Martín U. Gender as a determinant of mental health and its medicalization. *SESPAS Report 2020. Gac Sanit.* 2020;34( Suppl 1):61-67. doi:10.1016/j.gaceta.2020.06.013.

Bartz D, Chitnis T, Kaiser UB, et al. Clinical Advances in Sex- and Gender-Informed Medicine to Improve the Health of All: A Review. *JAMA Intern Med.* 2020;180(4):574-583. doi:10.1001/jamainternmed.2019.7194.

Becker JB, Arnold AP, Berkley KJ, et al. Strategies and methods for research on sex differences in brain and behavior. *Endocrinology.* 2005;146(4):1650-1673. doi:10.1210/en.2004-1142.

Berg G, Rybakova D, Fischer D, et al. Microbiome definition re-visited: old concepts and new challenges [published correction appears in *Microbiome.* 2020 Aug 20;8(1):119]. *Microbiome.* 2020;8(1):103. doi:10.1186/s40168-020-00875-0.

Bertakis KD, Azari R, Helms LJ, Callahan EJ, Robbins JA. Gender differences in the utilization of health care services. *J Fam Pract.* 2000;49(2):147-152.

Berthois Y, Katzenellenbogen JA, Katzenellenbogen BS. Phenol red in tissue culture media is a weak estrogen: implications concerning the study of estrogen-responsive cells in culture. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1986;83(8):2496-2500. doi:10.1073/pnas.83.8.2496.

Biomarkers Definitions Working Group. Biomarkers and surrogate endpoints: preferred definitions and conceptual framework. *Clin Pharmacol Ther.* 2001;69(3):89-95. doi:10.1067/mcp.2001.113989.

Brunner D, Frank J, Appl H, Schöffl H, Pfaller W, Gstraunthaler G. Serum-free cell culture: the serum-free media interactive online database. *ALTEX.* 2010;27(1):53-62. doi:10.14573/altex.2010.1.53.

Bucciarelli V, Caterino AL, Bianco F, et al. Depression and cardiovascular disease: The deep blue sea of women's heart. *Trends Cardiovasc Med.* 2020;30(3):170-176. doi:10.1016/j.tcm.2019.05.001.

Buoncervello M, Marconi M, Carè A, Piscopo P, Malorni W, Matarrese P. Preclinical models in the study of sex differences. *Clin Sci (Lond).* 2017;131(6):449-469. doi:10.1042/CS20160847.

Busoni M. *Genere, sesso, cultura. Uno sguardo antropologico.* 2000, Roma: Carocci.

Califf RM. Biomarker definitions and their applications. *Exp Biol Med (Maywood).* 2018;243(3):213-221. doi: 10.1177/1535370217750088.

- Campesi I, Racagni G, Franconi F. Just a Reflection: Does Drug Repurposing Perpetuate Sex-Gender Bias in the Safety Profile?. *Pharmaceuticals (Basel)*. 2021;14(8):730. doi:10.3390/ph14080730.
- Campesi I, Montella A, Seghieri G, Franconi F. The Person's Care Requires a Sex and Gender Approach. *J Clin Med*. 2021;10(20):4770. doi:10.3390/jcm10204770.
- Caranci G, Piscopo P, Rivabene R, Traficante A, Rizzo B, Castellano AE, Ruggieri S, Vanacore N, Confaloni A. Gender differences in Parkinson's disease: focus on plasma  $\alpha$ -synuclein. *J Neural Transm (Vienna)*. 2013;120(8):1209-15. doi: 10.1007/s00702-013-0972-6.
- Chen X, Yuan H, Zheng T, Chang Y, Luo Y. Females Are More Sensitive to Opponent's Emotional Feedback: Evidence From Event-Related Potentials. *Front Hum Neurosci*. 2018;12:275. doi:10.3389/fnhum.2018.00275.
- Chen Y, Zhou J, Wang L. Role and Mechanism of Gut Microbiota in Human Disease. *Front Cell Infect Microbiol*. 2021;11:625913. doi: 10.3389/fcimb.2021.625913.
- Csaba G. Hormonal imprinting: its role during the evolution and development of hormones and receptors [published correction appears in *Cell Biol Int* 2000;24(10):767]. *Cell Biol Int*. 2000;24(7):407-414. doi:10.1006/cbir.2000.0507
- Csaba G. The biological basis and clinical significance of hormonal imprinting, an epigenetic process. *Clin Epigenetics*. 2011;2(2):187-196. doi:10.1007/s13148-011-0024-8
- Daniels LB, Maisel AS. Cardiovascular biomarkers and sex: the case for women. *Nat Rev Cardiol*. 2015;12(10):588-96. doi: 10.1038/nrcardio.2015.105
- De Castro P, Heidari S, Babor TF. Sex And Gender Equity in Research (SAGER): reporting guidelines as a framework of innovation for an equitable approach to gender medicine. Commentary. *Ann Ist Super Sanita*. 2016;52(2):154-157. doi:10.4415/ANN\_16\_02\_05
- De Souza Santos R, Frank AP, Palmer BF, Clegg DJ. Sex and media: Considerations for cell culture studies. *ALTEx*. 2018;35(4):435-440. doi:10.14573/altex.1806151
- Deshmukh A, Kumar G, Pant S, Rihal C, Murugiah K, Mehta JL. Prevalence of Takotsubo cardiomyopathy in the United States. *Am Heart J*. 2012;164(1):66-71.e1. doi:10.1016/j.ahj.2012.03.020
- Di Blasio N & Visco C. Un uomo o una donna che differenza fa? Nella ricerca tanta. *Politica ed economia*. 2021. <https://sentichiparla.it/politica-ed-economia/gap-genere-ricerca/>
- Di Tella M, Miti F, Ardito RB, Adenzato, M. Social cognition and sex: Are men and women really different? *Personality and Individual Differences*. 2020;162:110045. doi.org/10.1016/j.paid.2020.110045
- Dragano N, Siegrist J, Nyberg ST, et al. Effort-Reward Imbalance at Work and Incident Coronary Heart Disease: A Multicohort Study of 90,164 Individuals. *Epidemiology*. 2017;28(4):619-626. doi:10.1097/EDE.0000000000000666

Durkin AS, Cedrone E, Sykes G, Boles D, Reid YA. Utility of gender determination in cell line identity. *In Vitro Cell Dev Biol Anim.* 2000;36(6):344-347. doi:10.1290/1071-2690(2000)036<0344:UOGDIC>2.0.CO;2

Ebner NC, Kamin H, Diaz V, Cohen RA, MacDonald K. Hormones as "difference makers" in cognitive and socioemotional aging processes. *Front Psychol.* 2015;5:1595. doi:10.3389/fpsyg.2014.01595

Franconi F, Rosano G, Campesi I. Need for gender-specific pre-analytical testing: the dark side of the moon in laboratory testing. *Int J Cardiol.* 2015;179:514-535. doi:10.1016/j.ijcard.2014.11.019

Gafarov VV, Panov DO, Gromova EA, Gagulin IV, Gafarova AV. The influence of depression on risk development of acute cardiovascular diseases in the female population aged 25-64 in Russia. *Int J Circumpolar Health.* 2013;72. doi:10.3402/ijch.v72i0.21223

Garsetti DE, Sahay K, Wang Y, Rogers MB. Sex and the basal mRNA synthesis machinery. *Wiley Interdiscip Rev RNA.* 2022;e1765. doi: 10.1002/wrna.1765

Grant OA, Wang Y, Kumari M, Zabet NR, Schalkwyk L. Characterising sex differences of autosomal DNA methylation in whole blood using the Illumina EPIC array. *Clin Epigenetics.* 2022;14(1):62. doi:10.1186/s13148-022-01279-7

Govender P, Ghai M, Okpeku M. *Mol Genet Genomics.* Sex-specific DNA methylation: impact on human health and development. 2022;297(6):1451-1466. doi: 10.1007/s00438-022-01935-w

Heidari S., Babor T.F., De Castro P., Tort S., Curno M. (2016). Sex and Gender Equity in Research: rationale for the SAGER guidelines and recommended use. *Res Integr Peer Rev.* 2016; 1: 2

Holingue C, Budavari AC, Rodriguez KM, Zisman CR, Windheim G, Fallin MD. Sex Differences in the Gut-Brain Axis: Implications for Mental Health. *Curr Psychiatry Rep.* 2020;22(12):83. doi:10.1007/s11920-020-01202-y

Oyola MG, Handa RJ. Hypothalamic-pituitary-adrenal and hypothalamic-pituitary-gonadal axes: sex differences in regulation of stress responsivity. *Stress.* 2017;20(5):476-494. doi: 10.1080/10253890.2017.1369523

Iwata M, Ota KT, Duman RS. The inflammasome: pathways linking psychological stress, depression, and systemic illnesses. *Brain Behav Immun.* 2013;31:105-114. doi:10.1016/j.bbi.2012.12.008

Jäncke L. Sex/gender differences in cognition, neurophysiology, and neuroanatomy. *F1000Res.* 2018;7:F1000 Faculty Rev-805. doi:10.12688/f1000research.13917.1

Karp NA, Reavey N. Sex bias in preclinical research and an exploration of how to change the status quo. *Br J Pharmacol.* 2019;176(21):4107-4118. doi:10.1111/bph.14539

Kim YS, Unno T, Kim BY, Park MS. Sex Differences in Gut Microbiota. *World J Mens Health.* 2020;38(1):48-60 doi: 10.5534/wjmh.190009

- Kirschbaum, C., Wüst, S., & Hellhammer, D. Consistent sex differences in cortisol responses to psychological stress. *Psychosomatic medicine*. 1992;54(6):648-657. doi: 10.1097/00006842-199211000-00004
- Kivimäki M, Steptoe A. Effects of stress on the development and progression of cardiovascular disease. *Nat Rev Cardiol*. 2018;15(4):215-229. doi:10.1038/nrcardio.2017.189
- Klein SL. Sex influences immune responses to viruses, and efficacy of prophylaxis and treatments for viral diseases. *Bioessays*. 2012;34(12):1050-1059. doi:10.1002/bies.201200099
- Koo HK, Morrow J, Kachroo P, Tantisira K, Weiss ST, Hersh CP, Silverman EK, DeMeo DL. Sex-specific associations with DNA methylation in lung tissue demonstrate smoking interactions. *Epigenetics*. 2021;16(6):692-703. doi: 10.1080/15592294.2020.1819662
- Kuehner C. Why is depression more common among women than among men?. *Lancet Psychiatry*. 2017;4(2):146-158. doi:10.1016/S2215-0366(16)30263-2.
- Labots G, Jones A, de Visser SJ, Rissmann R, Burggraaf J. Gender differences in clinical registration trials: is there a real problem?. *Br J Clin Pharmacol*. 2018;84(4):700-707. doi:10.1111/bcp.13497
- Landen S, Voisin S, Craig JM, McGee SL, Lamon S, Eynon N. Genetic and epigenetic sex-specific adaptations to endurance exercise. *Epigenetics*. 2019;14(6):523-535. doi: 10.1080/15592294.2019.1603961
- Lasrado N, Jia T, Massilamany C, Franco R, Illes Z, Reddy J. Mechanisms of sex hormones in autoimmunity: focus on EAE. *Biol Sex Differ*. 2020;11(1):50. doi:10.1186/s13293-020-00325-4
- Leistner C, Menke A. Hypothalamic–pituitary–adrenal axis and stress. *Handb Clin Neurol*. 2020;175:55-64. doi: 10.1016/B978-0-444-64123-6.00004-7
- Magnussen C, Niiranen TJ, Ojeda FM, et al. Sex Differences and Similarities in Atrial Fibrillation Epidemiology, Risk Factors, and Mortality in Community Cohorts: Results From the BiomarcCaRE Consortium (Biomarker for Cardiovascular Risk Assessment in Europe). *Circulation*. 2017;136(17):1588-1597
- Maierà E, Pagnotta FP. Gender Identity in the Contemporary Age: It Is Often a Suffered Conquest. *Psychiatr Danub*. 2022;34(Suppl 8):50-55.
- Maiorino MI, Bellastella G, Casciano O, et al. Gender-differences in glycemic control and diabetes related factors in young adults with type 1 diabetes: results from the METRO study. *Endocrine*. 2018;61(2):240-247. doi:10.1007/s12020-018-1549-9
- Markle JG, Frank DN, Mortin-Toth S, et al. Sex differences in the gut microbiome drive hormone-dependent regulation of autoimmunity. *Science*. 2013;339(6123):1084-1088. doi:10.1126/science.1233521
- Martin J, Asjadi K, Hubbard L, et al. Examining sex differences in neurodevelopmental and psychiatric genetic risk in anxiety and depression. *PLoS One*. 2021;16(9):e0248254. doi:10.1371/journal.pone.0248254.



Maselli A, Matarrese P, Straface E, Canu S, Franconi F, Malorni W. Cell sex: a new look at cell fate studies. *FASEB J.* 2009 Apr;23(4):978-84. doi: 10.1096/fj.08-114348. Epub 2008 Dec 12.

Mauvais-Jarvis F, Arnold AP, Reue K. A Guide for the Design of Pre-clinical Studies on Sex Differences in Metabolism. *Cell Metab.* 2017;25(6):1216-1230. doi:10.1016/j.cmet.2017.04.033

Mazzucco CA, Walker HA, Pawluski JL, Lieblich SE, Galea LA. ERalpha, but not ERbeta, mediates the expression of sexual behavior in the female rat. *Behav Brain Res.* 2008;191(1):111-7. doi: 10.1016/j.bbr.2008.03.016

Mayeux R. Biomarkers: potential uses and limitations. *NeuroRx.* 2004;1(2):182-188. doi:10.1602/neurorx.1.2.182

McCombe PA. The Short and Long-Term Effects of Pregnancy on Multiple Sclerosis and Experimental Autoimmune Encephalomyelitis. *J Clin Med.* 2018;7(12):494. doi:10.3390/jcm7120494

McGregor AJ, Hasnain M, Sandberg K, Morrison MF, Berlin M, Trott J. How to study the impact of sex and gender in medical research: a review of resources. *Biol Sex Differ.* 2016;7(Suppl 1):46. doi:10.1186/s13293-016-0099-1

McKee TJ, Komarova SV. Is it time to reinvent basic cell culture medium?. *Am J Physiol Cell Physiol.* 2017;312(5):C624-C626. doi:10.1152/ajpcell.00336.2016

McLean CP, Asnaani A, Litz BT, Hofmann SG. Gender differences in anxiety disorders: prevalence, course of illness, comorbidity and burden of illness. *J Psychiatr Res.* 2011;45(8):1027-1035. doi:10.1016/j.jpsychires.2011.03.006

Mittelstrass K, Ried JS, Yu Z, et al. Discovery of sexual dimorphisms in metabolic and genetic biomarkers. *PLoS Genet.* 2011;7(8):e1002215. doi:10.1371/journal.pgen.1002215

Moreno-Cuevas JE, Sirbasku DA. Estrogen mitogenic action. III. is phenol red a "red herring"? *In Vitro Cell Dev Biol Anim.* 2000;36(7):447-464. doi:10.1290/1071-2690(2000)036<0447:EMAIP>2.0.CO;2.

Morera-Fumero AL, Abreu-Gonzalez P, Henry-Benitez M, et al. Day/Night and Summer/Winter Changes in Serum Total Antioxidant Capacity. *Med Chem.* 2018;14(3):225-229. doi:10.2174/1573406413666171002123158

Mueller S, Saunier K, Hanisch C, et al. Differences in fecal microbiota in different European study populations in relation to age, gender, and country: a cross-sectional study. *Appl Environ Microbiol.* 2006;72(2):1027-1033. doi:10.1128/AEM.72.2.1027-1033.2006.

Smelser NJ, Baldini M. *Manuale di sociologia.* 2011, V ed., Bologna: il Mulino.

Núñez, F., Maraver, M.J. & Colzato, L.S. Sex Hormones as Cognitive Enhancers?. *J Cogn Enhanc.* 2020;4:228–233. doi.org/10.1007/s41465-019-00156-1

Ortona E, Pierdominici M, Rider V. Editorial: Sex Hormones and Gender Differences in Immune Responses. *Front Immunol.* 2019;10:1076. doi:10.3389/fimmu.2019.01076

Ouellette MM, McDaniel LD, Wright WE, Shay JW, Schultz RA. The establishment of telomerase-immortalized cell lines representing human chromosome instability syndromes. *Hum Mol Genet.* 2000; 9(3):403-11. doi: 10.1093/hmg/9.3.403

Ow GS, Kuznetsov VA. Multiple signatures of a disease in potential biomarker space: Getting the signatures consensus and identification of novel biomarkers. *BMC Genomics.* 2015;16 Suppl 7(Suppl 7):S2. doi:10.1186/1471-2164-16-S7-S2

Pagano MT, Peruzzu D, Busani L, et al. Predicting respiratory failure in patients infected by SARS-CoV-2 by admission sex-specific biomarkers. *Biol Sex Differ.* 2021;12(1):63. doi:10.1186/s13293-021-00407-x

Pietraforte D, Straface E, Piscopo P, Vona R, Confaloni A. Sex-related biomarkers in cardiovascular and neurodegenerative disorders. *Ann Ist Super Sanita.* 2016;52(2):230-239. doi:10.4415/ANN\_16\_02\_15

Pusztai L, Hatzis C, Andre F. Reproducibility of research and preclinical validation: problems and solutions. *Nat Rev Clin Oncol.* 2013;10(12):720-724. doi:10.1038/nrclinonc.2013.171

Ramsey JM, Cooper JD, Penninx BW, Bahn S. Variation in serum biomarkers with sex and female hormonal status: implications for clinical tests. *Sci Rep.* 2016;6:26947. doi:10.1038/srep26947

Regitz-Zagrosek V. Sex and gender differences in health. *Science & Society Series on Sex and Science. EMBO Rep.* 2012;13(7):596-603. doi:10.1038/embor.2012.87

Romanescu M, Buda V, Lombrea A, Andor M, Ledeti I, Suci M, Danciu C, Dehelean CA, Dehelean L. Sex-Related Differences in Pharmacological Response to CNS Drugs: A Narrative Review. *J Pers Med.* 2022;12(6):907. doi: 10.3390/jpm12060907

Romano E, Cosentino L, Laviola G, De Filippis B. Genes and sex hormones interaction in neurodevelopmental disorders. *Neurosci Biobehav Rev.* 2016;67:9-24. doi: 10.1016/j.neubiorev.2016.02.019

Roy JR, Chakraborty S, Chakraborty TR. Estrogen-like endocrine disrupting chemicals affecting puberty in humans--a review. *Med Sci Monit.* 2009;15(6):RA137-RA145

Sá C, Cowley S, Martinez M, Kachynska N, Sabzalieva E. Gender gaps in research productivity and recognition among elite scientists in the U.S., Canada, and South Africa. *PLoS One.* 2020;15(10):e0240903. doi:10.1371/journal.pone.0240903

Samad Z, Boyle S, Erbsoll M, et al. Sex differences in platelet reactivity and cardiovascular and psychological response to mental stress in patients with stable ischemic heart disease: insights from the REMIT study [published correction appears in *J Am Coll Cardiol.* 2014 Dec 9;64(22):2438]. *J Am Coll Cardiol.* 2014;64(16):1669-1678. doi:10.1016/j.jacc.2014.04.087

Schiebinger L, Klinge I. Gendered Innovation in Health and Medicine. *Adv Exp Med Biol.* 2018;1065:643-654. doi:10.1007/978-3-319-77932-4\_39

Shah K, McCormack CE, Bradbury NA. Do you know the sex of your cells?. *Am J Physiol Cell Physiol*. 2014;306(1):C3-C18. doi:10.1152/ajpcell.00281.2013

Shepherd R, Cheung AS, Pang K, Saffery R, Novakovic B. Sexual Dimorphism in Innate Immunity: The Role of Sex Hormones and Epigenetics. *Front Immunol*. 2021;21;11:604000. doi: 10.3389/fimmu.2020.604000

Sikora MJ, Johnson MD, Lee AV, Oesterreich S. Endocrine Response Phenotypes Are Altered by Charcoal-Stripped Serum Variability. *Endocrinology*. 2016;157(10):3760-3766. doi:10.1210/en.2016-1297

Sorge RE, Martin LJ, Isbester KA, et al. Olfactory exposure to males, including men, causes stress and related analgesia in rodents. *Nat Methods*. 2014;11(6):629-632. doi:10.1038/nmeth.2935

Soto AM, Justicia H, Wray JW, Sonnenschein C. p-Nonyl-phenol: an estrogenic xenobiotic released from "modified" polystyrene. *Environ Health Perspect*. 1991;92:167-173. doi:10.1289/ehp.9192167

Spoletini I, Vitale C, Malorni W, Rosano GM. Sex differences in drug effects: interaction with sex hormones in adult life. *Handb Exp Pharmacol*. 2012;(214):91-105. doi:10.1007/978-3-642-30726-3\_5

Steinberg JR, Turner BE, Weeks BT, et al. Analysis of Female Enrollment and Participant Sex by Burden of Disease in US Clinical Trials Between 2000 and 2020. *JAMA Netw Open*. 2021;4(6):e2113749. doi:10.1001/jamanetworkopen.2021.13749.

Straface E, Gambardella L, Brandani M, Malorni W. Sex differences at cellular level: "cells have a sex". *Handb Exp Pharmacol*. 2012;(214):49-65. doi: 10.1007/978-3-642-30726-3\_3.

Straub RH. The complex role of estrogens in inflammation. *Endocr Rev*. 2007;28(5):521–574. doi: 10.1210/er.2007-0001.

Ström JO, Theodorsson A, Ingberg E, Isaksson IM, Theodorsson E. Ovariectomy and 17 $\beta$ -estradiol replacement in rats and mice: a visual demonstration. *J Vis Exp*. 2012;7(64):e4013. doi: 10.3791/4013.

Sugimoto CR, Ahn YY, Smith E, Macaluso B, Larivière V. Factors affecting sex-related reporting in medical research: a cross-disciplinary bibliometric analysis. *Lancet*. 2019;393(10171):550-559. doi:10.1016/S0140-6736(18)32995-7.

Taneja V. Sex Hormones Determine Immune Response. *Front Immunol*. 2018;27;9:1931. doi: 10.3389/fimmu.2018.01931.

Tannenbaum C, Greaves L, Graham ID. Why sex and gender matter in implementation research. *BMC Med Res Methodol*. 2016;16(1):145. doi:10.1186/s12874-016-0247-7.

Taras, MA; Pellegrini A. (2021). Sex/Gender Psychological Differences in the Adult Diabetic Patient and How a Child's Response to Chronic Disease Varies with Age and Can Be Influenced by Technology. *Diabetology*. 2021;2:215–225. doi.org/10.3390/diabetology2040019.

Thompson AE, Anisimowicz Y, Miedema B, Hogg W, Wodchis WP, Aubrey-Bassler K. The influence of gender and other patient characteristics on health care-seeking behaviour: a QUALICOPC study. *BMC Fam Pract.* 2016;17:38. doi:10.1186/s12875-016-0440-0.

Trentini A, Manfrinato MC, Castellazzi M, Bellini T. Sex-Related Differences of Matrix Metalloproteinases (MMPs): New Perspectives for These Biomarkers in Cardiovascular and Neurological Diseases. *J Pers Med.* 2022;12(8):1196. doi: 10.3390/jpm12081196.

Ueyama T, Kasamatsu K, Hano T, Tsuruo Y, Ishikura F. Catecholamines and estrogen are involved in the pathogenesis of emotional stress-induced acute heart attack. *Ann N Y Acad Sci.* 2008;1148:479-485. doi:10.1196/annals.1410.079.

Uhl K, Parekh A, Kweder S. Females in clinical studies: where are we going? *Clin Pharmacol Ther.* 2007;81(4):600-2. doi: 10.1038/sj.clpt.6100112.

Vanderstichele A, Busschaert P, Olbrecht S, Lambrechts D, Vergote I. Genomic signatures as predictive biomarkers of homologous recombination deficiency in ovarian cancer. *Eur J Cancer.* 2017;86:5-14. doi: 10.1016/j.ejca.2017.08.029.

van der Valk J, Bieback K, Buta C, et al. Fetal Bovine Serum (FBS): Past - Present - Future. *ALTEX.* 2018;35(1):99-118. doi:10.14573/altex.1705101.

Vemuri R, Sylvia KE, Klein SL, Forster SC, Plebanski M, Eri R, Flanagan KL. The microgenderome revealed: sex differences in bidirectional interactions between the microbiota, hormones, immunity and disease susceptibility. *Semin Immunopathol.* 2019;41(2):265-275. doi: 10.1007/s00281-018-0716-7.

Vegeto E, Villa A, Della Torre S, Crippa V, Rusmini P, Cristofani R, Galbiati M, Maggi A, Poletti A. The Role of Sex and Sex Hormones in Neurodegenerative Diseases. *Endocr Rev.* 2020;41(2):273-319. doi: 10.1210/endrev/bnz005.

Verma R, Balhara YP, Gupta CS. Gender differences in stress response: Role of developmental and biological determinants. *Ind Psychiatry J.* 2011;20(1):4-10. doi:10.4103/0972-6748.98407.

Wesierska-Gadek J, Schreiner T, Maurer M, Waringer A, Ranftler C. Phenol red in the culture medium strongly affects the susceptibility of human MCF-7 cells to roscovitine. *Cell Mol Biol Lett.* 2007;12(2):280-293. doi:10.2478/s11658-007-0002-5.

Wesierska-Gadek J, Schreiner T, Maurer M, Waringer A, Ranftler C. Phenol red in the culture medium strongly affects the susceptibility of human MCF-7 cells to roscovitine. *Cell Mol Biol Lett.* 2007;12(2):280-293. doi:10.2478/s11658-007-0002-5.

Wijchers PJ, Festenstein RJ. Epigenetic regulation of autosomal gene expression by sex chromosomes. *Trends Genet.* 2011;27(4):132-140. doi:10.1016/j.tig.2011.01.004.

Wright, M. R. V., Wright, J. V., & Frankenhaeuser, M. Relationships between sex-related psychological characteristics during adolescence and catecholamine excretion during achievement stress. *Psychophysiology.* 1981;18(4):362-370. doi: 10.1111/j.1469-8986.1981.tb02467.x.

Yurkovetskiy L, Burrows M, Khan AA, et al. Gender bias in autoimmunity is influenced by microbiota. *Immunity.* 2013;39(2):400-412. doi:10.1016/j.immuni.2013.08.013.

| <b>Tabella 1. Fattori alla base delle differenze di sesso, genere ed età</b> |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                        |
|------------------------------------------------------------------------------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| <b>Topic</b>                                                                 | <b>Cosa fare nella pratica clinica</b>                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                 |
| FATTORI GENETICI, EPIGENETICI                                                | <p>Considerare se i geni o microRNA che si analizzano siano espressi sul cromosoma X in zone che sfuggono alla inattivazione o vengano regolati dagli ormoni sessuali</p> <p>In relazione ai meccanismi genetici e epigenetici, considerare il sesso del donatore da cui provengono le cellule per le analisi che si vogliono concludere.</p>                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                          |
| FATTORI ORMONALI                                                             | <p>Durante la fase iniziale dello studio e di reclutamento predisporre una adeguata raccolta della storia medica del/della paziente, ponendo attenzione all'uso di contraccettivi o terapie ormonali che potrebbero interferire con le analisi richieste dallo studio.</p> <p>Progettare studi specifici per le diverse fasi ormonali, al fine di rilevare differenze tra maschi e femmine nelle diverse fasi della vita, per rendere i processi di diagnosi e cura genere-specifici.</p> <p>Nelle ricerche farmacologiche aumentare il numero delle donne arruolate in tutte le fasi degli studi clinici, tenendo in considerazione l'influenza degli ormoni sessuali sugli effetti dei farmaci.</p>                                                                                                                                                                                                                  |
| STILI DI VITA                                                                | <p>Introdurre nel disegno sperimentale un metodo di misura per valutare come il genere, che spesso viene rappresentato da variabili psicosociali difficili da analizzare statisticamente, si relazioni allo stato di salute del soggetto.</p> <p>Delineare in modo più preciso i criteri di inclusione ed esclusione, soffermandosi su un'analisi accurata di quali fattori ambientali (es. dieta, fumo, sport) prendere in considerazione per lo studio clinico e quali escludere.</p> <p>Delineare strumenti di misura efficaci, validati e standardizzati per raccogliere informazioni relative allo stile di vita al fine di agevolare l'analisi dei dati e la replicazione degli studi.</p> <p>Considerare nelle fasi iniziali del disegno dello studio le influenze genere-specifiche dei fattori ambientali e calcolare, in base a questo, un adeguato numero di soggetti da reclutare distinti per genere.</p> |
| MICROBIOTA                                                                   | <p>Negli studi preclinici studiare la composizione del microbiota in modelli animali di entrambi i sessi e nello stesso rapporto numerico.</p> <p>Negli studi di trapianto fecale da persona ad animale far combaciare il genere.</p> <p>Negli studi clinici considerare anche le informazioni sullo stile di vita, anamnesi medica e abitudini genere specifici.</p>                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                  |

|                                                |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                             |
|------------------------------------------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
|                                                | <p>Negli studi clinici e preclinici introdurre un'analisi dei dati disaggregata per sesso e genere.</p> <p>Gli studi clinici dovrebbero tenere in considerazione la fase del ciclo riproduttivo della donna al momento del reclutamento.</p>                                                                                                                                                                                                                                                                                |
| IMMUNITA',<br>INFIAMMAZI<br>ONE                | <p>Nella progettazione degli studi clinici relativi ad infiammazione e sistema immunitario tenere in considerazione i fattori ormonali di uomini e donne.</p> <p>Considerare in tutte le fasi del progetto di ricerca in che fase del ciclo riproduttivo si trova la donna.</p> <p>Motivare in modo scientifico le limitazioni/esclusioni negli studi che non considerano soggetti femminili in età fertile o in gravidanza.</p> <p>Proporre piani di ricerca che includono un rapporto numerico adeguato uomini/donne.</p> |
| STRESS                                         | <p>Comprendere quale tipologia di persona può essere affetta da una determinata patologia e quando si riconosce che le donne rappresentano la percentuale preminente, disegnare lo studio clinico con una accurata proporzione uomo/donna.</p> <p>Considerare la condizione ormonale, la fase di vita e l'età della donna, perché questi fattori hanno un impatto importante sulla condizione patologica e sul possibile sviluppo terapeutico e trattamento farmacologico.</p>                                              |
| ASPETTI<br>PSICOLOGICI                         | <p>Comprendere le differenze di genere legate all'aspetto emotivo e psicologico e tenerle in considerazione durante le fasi di ricerca relative al reclutamento e alla somministrazione di test e/o colloquio clinici.</p> <p>Durante la stesura del progetto inserire test cognitivi e clinici considerando le diverse abilità genere-specifiche.</p>                                                                                                                                                                      |
| FATTORI<br>AMBIENTALI,<br>CULTURALI,<br>ETNICI | <p>Considerare l'impatto socio-economico e culturale della salute delle persone in base al genere.</p> <p>Reclutare soggetti rappresentanti le diverse etnie in uguale proporzione numerica tenendo in considerazione il genere.</p>                                                                                                                                                                                                                                                                                        |

**Tabella 1.** Fattori da considerare quando si pianificano studi mirati a valutare differenze di genere.

**Tabella 2. Studi *in vitro***

Per ogni esperimento, è necessario riportare il sesso dell'organismo dal quale sono stati prelevati tessuti o cellule per garantire che gli esperimenti siano riproducibili e che i risultati, ottenuti in un sesso, non siano generalizzati all'altro sesso.

È importante considerare che l'espressione dei geni (localizzati sui cromosomi sessuali o sugli autosomi) di una cellula o di un tessuto oggetto di studio possa essere influenzata dagli ormoni sessuali. Ormoni steroidei possono infatti essere presenti nei terreni di coltura cellulare o derivare dall'ambiente ormonale dell'organismo donatore.

Le cellule coltivate *in vitro* possono comportarsi in modo diverso rispetto a quelle *in vivo*. I terreni di coltura possono influenzare il comportamento cellulare. Ad esempio, il siero, il rosso fenolo ed il materiale plastico utilizzato per colture cellulari sono estrogenici e come tali possono alterare le risposte cellulari.

**Tabella 2.** Punti importanti da considerare negli studi *in vitro* (modificato da “European Commission, Directorate-General for Research and Innovation, Gendered innovations: how inclusive analysis contributes to research and innovation, Publications Office, 2020, <https://data.europa.eu/doi/10.2777/619077>”)

**Tabella 3. Studi *in vivo***

Gli animali maschi e femmine devono essere abbinati per ceppo (o per ceppo e genotipo) e per età, e dovrebbero essere allevati in condizioni identiche (gabbie, lettieri, dieta, temperatura, ecc.).

Il sesso degli sperimentatori/sperimentatrici influenza la risposta al dolore di ratti e topi. In presenza di uno sperimentatore maschio è stata osservata una ridotta risposta al dolore rispetto a una sperimentatrice femmina, sia in roditori maschi sia in roditori femmine (in queste ultime la differenza è più evidente).

Il testosterone varia stagionalmente e con ritmi circadiani. Allo stesso modo, le concentrazioni ormonali nelle femmine possono fluttuare nel corso di un solo giorno del ciclo estrale. È necessario specificare il fotoperiodo nella colonia e l'ora del giorno in cui vengono effettuate le misurazioni.

**Tabella 3.** Punti importanti da considerare negli studi *in vivo* (modificato da “European Commission, Directorate-General for Research and Innovation, Gendered innovations: how inclusive analysis contributes to research and innovation, Publications Office, 2020, <https://data.europa.eu/doi/10.2777/619077>”)