

UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI NAPOLI FEDERICO II

DOTTORATO DI RICERCA IN RIPRODUZIONE, SVILUPPO E

ACCRESCIMENTO DELL'UOMO

XXV CICLO



Coordinatore: Prof. Claudio Pignata

TESI DI DOTTORATO

Terapie ormonali in ginecologia

Tutor

Prof. Costantino Di Carlo

Candidata

Dott.ssa Stefania Sparice

(Anno Accademico 2011/2012)

INDICE

	Pagina
Abstract	8
Parole chiave	8
Capitolo 1	9
Terapie ormonali: aspetti generali	
Lavori scientifici pubblicati nel corso del Dottorato di Ricerca inerenti la linea di ricerca:	
<i>“Bleeding patterns during replacement therapy with continuous transdermal estradiol in association with oral or vaginal sequential natural progesterone: a prospective, randomized trial”.</i>	15
C. Di Carlo, S. Sparice , A. Fabozzi, V. Gargano, N. De Rosa, R. Santoro, M. Massaro, C. Nappi.	
Abstract 13th World Congress on the Menopause – Climacteric, Volume 14 Suppl. 1, June 2011.	

Capitolo 2

Progetto di ricerca: Effetti di differenti progestinici sui livelli sierici di adiponectina e leptina nei contraccettivi orali combinati (COC) e nella terapia ormonale sostitutiva (TOS).

Introduzione **18**

Drospirenone **19**

Adiponectina **22**

Leptina **23**

Il drospirenone e le adipochine: l'interessante interazione tra attività anti-mineralcorticoide e livelli sierici di leptina e adiponectina **26**

Lavori scientifici pubblicati nel corso del Dottorato di Ricerca inerenti la linea di ricerca:

- *“Plasma leptin and adiponectin levels in hormone replacement therapy and contraception: effects of different progestogens”*. **27**

Costantino Di Carlo, M.D., Giovanni A. Tommaselli, Ph.D., Nicoletta De Rosa, M.D., Annamaria Fabozzi, M.D., Romina Santoro, M.D., Giuseppe Bifulco, M.D., **Stefania Sparice, M.D.**, and Carmine Nappi, M.D.

Fertility and Sterility Vol. 96, No. 1, July 2011

Materiali e metodi	33
Risultati	38
Tabelle	41
Discussione	43
• <i>“Effetti del drospirenone sui livelli di adiponectina sierica in donne fertili che assumono contraccettivo orale”</i>	54

Fabozzi A., De Rosa N., Santoro R., Di Carlo C., Tommaselli G.A., **Sparice S.**,
Gargano V., Nappi C.

Abstract 18° Congresso Nazionale AGUI – 27-29 Settembre 2010 - Roma

• <i>“Effetti di diversi progestinici sui livelli sierici di adipochine in postmenopausa”</i>	56
---	-----------

De Rosa N., Fabozzi A., Santoro R., Di Carlo C., Tommaselli G.A., **Sparice S.**,
Gargano V., Nappi C.

Abstract 18° Congresso Nazionale AGUI – 27-29 Settembre 2010 - Roma

Capitolo 3

Progetto di ricerca: Terapie ormonali e metabolismo osseo	58
Effetti degli estrogeni sull'osso	58
Il picco di massa ossea	63
COC e metabolismo osseo	65

Lavori scientifici pubblicati nel corso del Dottorato di Ricerca inerenti la linea di ricerca:

- *“Effects of an oral contraceptive containing estradiol valerate and dienogest on bone metabolism and bone mineral density: an observational study”.* **68**

Costantino Di Carlo, Virginia Gargano, **Stefania Sparice**, Giuseppe Bifulco, Giovanni A. Tommaselli, Daniela Schettino, Carmine Nappi – *Submitted (Gynecological Endocrinology)*

Background	70
Methods	73
Results	77
Discussion	77
Conclusions	80

Figures **86**

Tables **89**

• **POSTER:** *“Effects of a combined dienogest/estradiol valerate contraceptive pill on bone turnover in young fertile women”*. **92**

Santoro Romina; Fabozzi Annamaria; Gargano Virginia; **Sparice Stefania**; Di Carlo Costantino; Tommaselli Giovanni A.; Nappi Carmine.

XX FIGO WORLD Congress of Gynecology and Obstetrics – 7-12 Ottobre - Roma

Capitolo 4

Progetto di ricerca: Iperandrogenismo e COC **95**

Lavori scientifici pubblicati nel corso del Dottorato di Ricerca inerenti la linea di ricerca:

• *“Effects of an oral contraceptive containing estradiol valerate and dienogest on androgenic levels and acne in patients with PCOS”*. **98**

Costantino Di Carlo, **Stefania Sparice**, Virginia Gargano, Giuseppe Bifulco, Giovanni A. Tommaselli, Carmine Nappi - *Submitted (Gynecological Endocrinology)*

Introduction **99**

Methods	101
Results	104
Discussion	104

Bibliografia	110
Breve Curriculum Vitae	136
Partecipazione a corsi/congressi nel corso dei 3 anni di Dottorato di Ricerca	138

ABSTRACT

Nel corso degli anni, la ricerca scientifica si è concentrata sulla valutazione dei diversi preparati ormonali somministrati sia a scopo contraccettivo che a scopo sostitutivo, analizzando in modo critico tutte le problematiche inerenti tali terapie.

Questa tesi nasce dalla valutazione dei risultati di tre progetti di ricerca svolti nel corso dei tre anni di Dottorato di Ricerca in “Riproduzione, Sviluppo e Accrescimento dell’Uomo” presso il Dipartimento Universitario di Scienze Ostetrico-Ginecologiche, Urologiche e Medicina della Riproduzione dell’Università di Napoli Federico II.

Il primo progetto di ricerca ha valutato gli effetti di differenti progestinici sui livelli sierici di adiponectina e leptina nei contraccettivi orali combinati (COC) e nella terapia ormonale sostitutiva (TOS).

Il secondo progetto di ricerca è stato rivolto allo studio degli effetti del contraccettivo contenente estradiolo valerato e dienogest sul metabolismo osseo e sulla densità minerale ossea. In letteratura sono presenti molti studi che valutano gli effetti dei preparati ormonali sul metabolismo osseo. In particolare, è importante sottolineare che differenti dosi di estrogeni e progestinici possono avere effetti diversi sul metabolismo osseo. Comunque, i dati presenti in letteratura, in questo ambito, risultano molto contrastanti.

PAROLE CHIAVE: adiponectina, contraccezione ormonale, densità minerale ossea, dienogest, drospirenone, estradiolo valerato, leptina, menopausa, metabolismo osseo, terapia ormonale sostitutiva.

CAPITOLO 1

Terapie ormonali: aspetti generali

La contraccezione ormonale si basa essenzialmente sull'uso di estrogeni e progestinici, che possono essere somministrati in vario modo, sotto forma di (Tabella 1):

- Combinazioni di un estrogeno e di un progestinico;
- Solo progestinico (cosiddetta minipillola).

Tabella 1. Contraccettivi ormonali

- Pillola monofasica
- Pillola bifasica
- Pillola trifasica
- Minipillola (solo progestinico)
- Pillola del giorno dopo (intercettazione della gravidanza o contraccezione di emergenza)
- Contraccettivi iniettabili (long acting)
- Impianti di steroidi sottocutanei
- Anelli vaginali liberanti steroidi

La pillola classica, con estro-progestinici associati, per la sua efficacia e l'ottima tollerabilità rappresenta la forma più utilizzata di contraccezione orale. Sin dall'introduzione della terapia combinata estroprogestinica per via orale (COC), negli anni sessanta, la dose di estrogeni, è stata ridotta progressivamente. I COC contenenti 50 µg di estrogeni o più erano oltre il 99 per cento delle prescrizioni negli Stati Uniti nel 1968. Vent'anni dopo, queste prescrizioni erano meno del due per cento. La riduzione della dose di estrogeno si è avuta per importanti dati scientifici. Principalmente, la preoccupazione per gli eventi avversi estrogeno-correlati ha portato alla riduzione del dosaggio di estrogeni nei COC. L'uso di COC è stato correlato, in studi epidemiologici, con il cancro al seno e con altri eventi avversi, tra cui complicanze cerebrovascolari, incidenti tromboembolici e infarto del miocardio. Sono stati formulati, pertanto, COC a bassa dose di estrogeni, nel tentativo di ridurre il rischio di questi eventi avversi. In secondo luogo, la scoperta dell'azione sinergica degli estrogeni e progestinici nell'inibire l'ovulazione, ha reso possibile l'utilizzo di dosi più basse di ciascuna componente. Negli anni '70 furono disponibili COC contenenti 20 µg EE e, dal 1998, quest'ultimi hanno rappresentato l'otto per cento delle prescrizioni di COC negli Stati Uniti. I più recenti COC con 15 µg di estrogeni contengono la più bassa dose disponibile degli estrogeni. Riducendo la dose di estrogeni per migliorare la sicurezza, si potrebbe rischiare anche di ridurre il controllo del ciclo e l'efficacia contraccettiva. Determinare la dose ottimale di estrogeni necessaria

per l'efficacia è complicato. Sono state individuate variazioni interindividuali e intraindividuali dei livelli ematici di ormoni esogeni. Di conseguenza, la più bassa dose di estrogeni necessaria per prevenire la gravidanza - pur mantenendo un controllo del ciclo accettabile e minimi effetti collaterali - potrebbe variare sostanzialmente nelle donne e all'interno della singola donna in tempi diversi.

Tuttavia, oltre ai notevoli vantaggi caratterizzati dall'elevata efficacia contraccettiva ed un ripristino immediato della fertilità dopo l'interruzione dell'assunzione, i preparati estro-progestinici offrono anche numerosi vantaggi di tipo non contraccettivo.

Un effetto immediato è rappresentato dal miglioramento del controllo del ciclo mestruale con attenuazione della dismenorrea e riduzione della quantità e della durata del flusso mestruale grazie ad una diminuita proliferazione endometriale.

All'inibizione dell'ovulazione va invece ascritta la riduzione del rischio di sviluppare cisti ovariche funzionali.

Una terapia con estro-progestinici in somministrazione continua potrebbe essere indicata anche in pazienti con dolore pelvico ed endometriosi.

Le formulazioni contenenti progestinici ad azione antiandrogenica, come lo spironolattone, in particolare risultano efficaci nel trattamento di acne, seborrea ed irsutismo.

Le problematiche derivanti dal deficit ormonale postmenopausale sono trattate con la terapia ormonale sostitutiva (TOS). L'analisi dei risultati dei recenti trial clinici controllati ha mostrato che la TOS, se prescritta, rispettandone le indicazioni e controindicazioni, se iniziata precocemente e a basse dosi, limitata nel tempo e attentamente controllata, resta una terapia fondamentale per molte pazienti in postmenopausa. La TOS è efficace nel trattamento dei sintomi vasomotori, previene la perdita di massa ossea, aumenta la densità ossea, è associata ad un rischio aumentato di carcinoma della mammella e dell'endometrio, se alla terapia estrogenica viene aggiunto il progestinico diminuisce il rischio di carcinoma dell'endometrio, ma aumenta quello della mammella. Inoltre, con la TOS c'è un rischio maggiore di trombolismo venoso - soprattutto nel primo anno di utilizzo - di infarto del miocardio, di ictus ischemico, di demenza.

Le indicazioni alla TOS sono: terapia dei sintomi menopausali invalidanti, prevenzione del rischio osteoporotico già nelle prime fasi della menopausa e prevenzione delle fratture da osteoporosi. La prevenzione di queste ultime però richiede un trattamento a lungo termine, per cui si deve valutare periodicamente il rapporto rischio/beneficio.

Il bilancio rischi/benefici va valutato annualmente e ridiscusso con la paziente, soprattutto con la scomparsa dei sintomi menopausali e con l'aumentato rischio di tumore mammario dopo 5 anni di TOS.

Contrariamente a quanto pensato fino a pochi anni fa, la TOS non dovrebbe essere prescritta con le sole finalità di prevenzione primaria o secondaria della malattia cardiovascolare.

Volume 14 Supplement 1
June 2011
ISSN 1369-7137



INTERNATIONAL MENOPAUSE SOCIETY

CLIMACTERIC

THE JOURNAL OF ADULT WOMEN'S HEALTH & MEDICINE

Abstracts of the 13th World Congress on the Menopause

informa
healthcare

This journal is covered in
Index Medicus, MEDLINE and
Current Contents

ABSTRACT: Bleeding patterns during replacement therapy with continuous transdermal estradiol in association with oral or vaginal sequential natural progesterone: a prospective, randomized trial.

C. Di Carlo, S. Sparice, A. Fabozzi, V. Gargano, N. De Rosa, R. Santoro, M. Massaro, C. Nappi

Background. Progestins are administered in postmenopausal women, during estrogen-progestogen replacement therapy (RT), in order to prevent endometrial hyperplasia. Micronized natural progesterone (NP) is chemically identical to progesterone of ovarian origin and has been shown to be as effective as the synthetic progestins (SP) for controlling endometrial growth, offering fewer metabolic side effects. However, we recently observed a lower incidence of regular bleeding and a higher incidence of irregular bleeding and spotting in patients receiving oral NP in comparison to the other oral SP.

Objective. Given the hypothetic advantages of NP over other SP, we evaluated the effects on bleeding pattern of two different doses of NP administered orally or per vagina in association with transdermal estradiol in a continuous sequential estrogen-progestin therapy.

Setting. Menopause Clinic of Department of Gynecology and Obstetrics, and Pathophysiology of Human Reproduction, University of Naples “Federico II”.

Materials and Methods. A prospective, randomized trial was conducted on 100 patients randomized into 4 groups. Each group (n=25) received 50 µg/day of transdermal 17β-estradiol. Groups A and B received respectively 100 and 200 mg/day of NP orally. Groups C and D received respectively 100 and 200 mg/day of NP per vagina.

Results. After 12 cycles of treatment, no significant differences were observed in endometrial thickness between groups, suggesting that all treatments are effective in controlling endometrial growth. Regarding to bleeding control, patient in group C and D showed higher episodes of regular bleeding than patient in groups A and B and fewer episodes of spotting. The better control of bleeding was associated with an higher treatment compliance in patients who received vaginal NP with a larger percentage of women ending the study.

Conclusion. Transdermal estrogen RT combined to 100 mg of micronized NP, administered per vagina from the 14th to the 25th day of each cycle of 28 days, leads to a good cycle control and provides an excellent patient satisfaction without serious side effects. This therapy could be a treatment of first choice in early postmenopausal patients.

Capitolo 2

PROGETTO DI RICERCA

“Effetti di differenti progestinici sui livelli sierici di adiponectina e leptina nei contraccettivi orali combinati (COC) e nella terapia ormonale sostitutiva (TOS)”

Introduzione

I progestinici utilizzati nella terapia contraccettiva e nella terapia ormonale sostitutiva (TOS) esercitano numerosi effetti a livello di vari organi ed apparati. Mentre tuttavia i benefici legati all'assunzione di questi ormoni sono ben noti, i dati in letteratura riguardo i rischi connessi al loro utilizzo sono ancora controversi, e numerosi studi recenti sottolineano l'importanza della scelta del giusto progestinico in termini di rapporto rischi-benefici.

Infatti, i progestinici di sintesi differiscono enormemente tra loro, sia per la struttura chimica sia per le proprietà farmacocinetiche e farmacodinamiche. Inoltre, molti progestinici di sintesi esercitano, accanto alla classica attività progestinica, ulteriori attività legate alla capacità di interagire con i recettori per altri ormoni. Gli effetti dei diversi progestinici variano al variare delle proprietà intrinseche alle differenti molecole. Ad esempio, i progestinici con attività androgenica, interferiscono significativamente sulle modifiche del profilo lipidico determinate dagli estrogeni, mentre i progestinici privi di attività

androgenica o dotati di attività antiandrogenica, sembrano essere neutri dal punto di vista metabolico.

Il drospirenone

Il drospirenone (DRSP) è un nuovo progestinico simile per struttura al progesterone naturale ma dotato anche di attività antiandrogenica e antimineralcorticoide. Proprio questa attività antimineralcorticoide distingue tale molecola dagli altri progestinici di sintesi utilizzati nei preparati estroprogestinici (tabella 1).

Tabella 1. Profilo farmacologico de DRSP e di altri progestinici in modelli animali

	Progestinico	Androgenico	Antiandrogenico	Antimineralcorticoide	Glucocorticoide
Progesterone	+	—	(+)	+	—
Drospirenone	+	—	+	+	—
Desogestrel	+	(+)	—	—	—
Gestodene	+	(+)	—	(+)	—
Levonogestrel	+	(+)	—	—	—

+ *effetto evidente a dosi terapeutiche*

(+) *effetto trascurabile a dosi terapeutiche*

— *nessun effetto*

L'assenza di attività antimineralcorticoide degli altri progestinici è responsabile di una mancata inibizione della ritenzione idrica indotta dagli estrogeni e, in larga parte, degli effetti collaterali associati all'utilizzo della terapia progestinica, quali l'aumento del peso e della pressione arteriosa.

Gli estrogeni, infatti, aumentano la renina plasmatica e, conseguentemente, promuovono l'attivazione del sistema renina-angiotensina-aldosterone. Normalmente il progesterone endogeno contrasta l'effetto di quest'ultimo grazie alla sua capacità di antagonizzare il recettore dell'aldosterone attraverso un legame competitivo: pertanto, nella seconda metà del ciclo mestruale, il progesterone contrasta la ritenzione sodica estrogeno-mediata attraverso la sua proprietà natriuretica.

Tuttavia la somministrazione di etinilestradiolo eleva le concentrazioni plasmatiche di sodio coinvolto negli scambi elettrolitici più di quanto faccia l'estrogeno naturale.

Durante la somministrazione di un contraccettivo orale, il maggiore effetto sodio ritentivo determinato dall'etinilestradiolo può pertanto essere contrastato soltanto se tale composto è associato ad un progestinico che, come quello endogeno, è dotato di attività anti-mineralcorticoide come, ad esempio, il DRSP.

Studi recenti, inoltre, hanno messo in luce una possibile interazione esistente tra l'attività antimineralcorticoide del DRSP e i livelli plasmatici di due proteine prodotte dal tessuto adiposo: l'adiponectina e la leptina.

Studi recenti, inoltre, hanno messo in luce una possibile interazione esistente tra l'attività antimineralcorticoide del DRSP e i livelli plasmatici di due proteine prodotte dal tessuto adiposo: l'adiponectina e la leptina.

Il tessuto adiposo viene oggi considerato come un organo endocrino altamente specializzato che secreta ormoni e citochine coinvolti nella regolazione di un'ampia gamma di processi che vanno dallo stimolo della fame alla sensibilità all'insulina, dall'infiammazione all'aterogenesi, tanto che recentemente è stata proposta la teoria dell'esistenza di un vero e proprio "asse adipovascolare". Ipotizzando dunque una possibile interazione del progestinico con l'asse adipovascolare, restano da valutare gli effetti di tale interazione e se in particolare l'assunzione di DRSP sia associata ad una riduzione del rischio di patologie cardiovascolari, effetto ancor più cruciale se pensiamo alle donne che assumono TOS.

Il tessuto adiposo è considerato un organo endocrino metabolicamente attivo che, in risposta a stimoli extra-cellulari specifici o a cambiamenti delle condizioni metaboliche, secreta differenti sostanze biologicamente attive, indicate complessivamente come adipochine. Questo gruppo di sostanze include, oltre alle citochine classiche come l'interleuchina 1 (IL-1), l'interleuchina 6 (IL-6) e il *Tumor necrosis factor* α (TNF α), molecole altamente attive di più recente scoperta, come la leptina e l'adiponectina (Fig. 1).

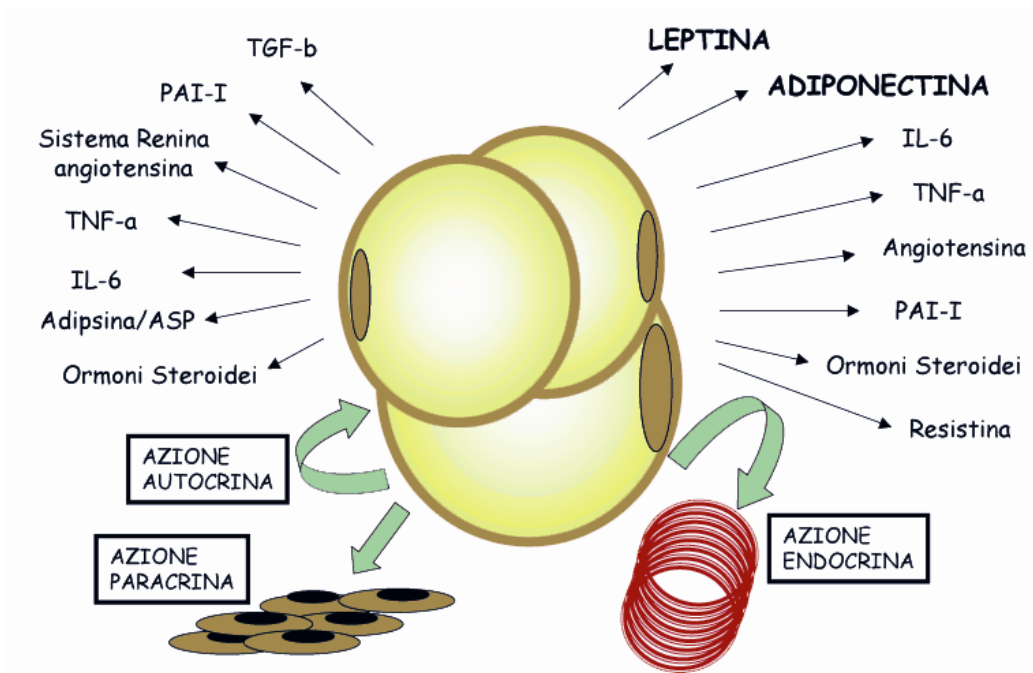


Figura 1. L'attività autocrina, paracrina ed endocrina del tessuto adiposo è mediata dalle adipochine

L'Adiponectina

L'espressione e la secrezione dell'AdipoQ sono di pertinenza del tessuto adiposo, sia bianco sia bruno. Non vi sono differenze nella secrezione tra tessuto adiposo sottocutaneo e viscerale, sebbene questa possa essere regolata in modo differente nei due distretti.

Recentemente è stato dimostrato che l'AdipoQ è espressa anche in tessuti diversi da quello adiposo: nel tessuto muscolare ad esempio, dove è indotta in risposta ad uno stimolo infiammatorio in un processo che coinvolge la sintesi di

ossido nitrico; nel tessuto epatico di ratto, in seguito alla somministrazione di tetracloruro di carbonio, e ancora nel fegato steatosico umano e negli osteoblasti. In soggetti sani normopeso i livelli circolanti di AdipoQ sono compresi tra 2 e 30 $\mu\text{g/ml}$ e mostrano un andamento pulsatile e circadiano, con un declino del 30% durante la notte. Queste variazioni si annullano in soggetti obesi o diabetici e si ristabiliscono dopo perdita di peso. L'espressione di AdipoQ è ridotta in caso di obesità. La regolazione ormonale dei livelli di AdipoQ coinvolge in primo luogo gli ormoni sessuali e in particolare estrogeni ed androgeni che sembrano esercitare un effetto inibitorio sulla secrezione dell'adipochina.

La Leptina

La leptina (LEP) è una proteina prodotta principalmente dal tessuto adiposo, anche se risulta espressa in una vasta varietà di tessuti quali la placenta, le ovaie, l'epitelio mammario, l'osso e i tessuti linfoidei. Tale citochina, inoltre, gioca un ruolo cruciale nella regolazione di diversi processi fisiologici tra cui la maturazione sessuale, la funzione riproduttiva e il metabolismo glicidico e interagisce con l'asse ipotalamo-ipofisi-surrene e ipotalamo-ipofisi-tiroide, con l'ematopoiesi e con il sistema immunitario (Fig. 2).

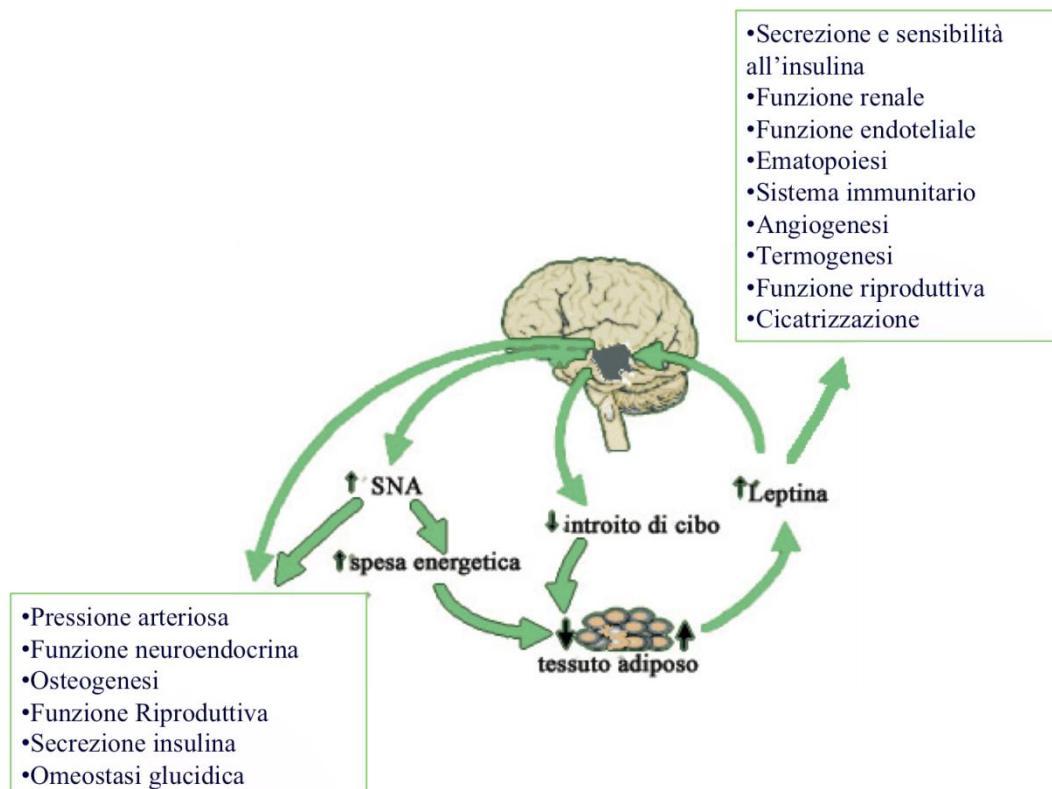


Figura 2. Effetti pleiotropici della LEP

È stato ampiamente dimostrato che le concentrazioni sieriche di LEP riflettono l'entità della riserva energetica presente nel grasso corporeo. La proteina è infatti principalmente secreta dagli adipociti e i suoi livelli circolanti sono direttamente proporzionali alla massa grassa totale e ad altri parametri ad essa correlati come la percentuale di massa grassa e il BMI.

L'espressione genica e la secrezione di LEP sono regolate da fattori ambientali e fattori endogeni. La sua induzione è mediata da insulina, glucocorticoidi, endotossine e citochine ed è direttamente dipendente

dall'aumento del peso corporeo e da una dieta ad alto contenuto di grassi. Al contrario il digiuno, gli androgeni, gli ormoni tiroidei, l'esposizione al freddo esercitano un effetto inibitorio sulla secrezione di LEP (Fig. 3).

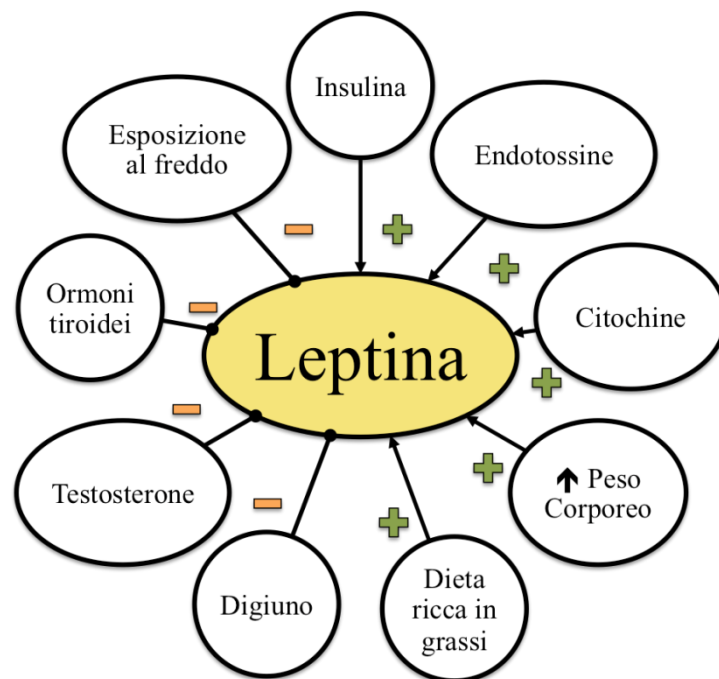


Fig. 3 Fattori ambientali ed ormonali che regolano l'espressione della LEP

Gli ormoni sessuali sembrano quindi svolgere un ruolo importante nella secrezione di LEP da parte degli adipociti: gli estrogeni hanno infatti un effetto inducente, come dimostrato da Kristensen et al che hanno osservato che i livelli ematici di LEP sono ridotti in ratti ovariectomizzati e corretti dalla somministrazione di estradiolo. Al contrario gli androgeni sembrano inibire la

secrezione di LEP: è stato infatti osservato che il testosterone riduce l'espressione del gene Ob e che uomini ipogonadici mostrano livelli elevati di LEP, che vengono corretti dalla somministrazione di testosterone.

Durante il ciclo mestruale si osservano fluttuazioni fisiologiche dei livelli di LEP con una più bassa concentrazione all'inizio della fase follicolare ed un aumento di questa di circa il 30% durante la fase luteale del ciclo e durante il picco preovulatorio. In donne in terapia contraccettiva i livelli di LEP sono costanti e in concentrazioni analoghe rispetto alla donne non in terapia.

Il drospirenone e le adipochine: l'interessante interazione tra attività anti-mineralcorticoide e livelli sierici di leptina e adiponectina

Da quanto esposto finora si evince che numerosi studi hanno messo in luce da un lato la correlazione inversa esistente tra livelli di AdipoQ e grasso corporeo e tra livelli di AdipoQ e insulino-resistenza, dall'altro la correlazione diretta esistente tra i livelli di LEP e gli stessi parametri. Pertanto è possibile affermare che l'AdipoQ agisce come adipochina ad azione antinfiammatoria esercitando un effetto benefico sul profilo lipidico e cardiovascolare; i livelli di LEP sierica, invece, sono correlati ad un maggiore rischio metabolico e cardiovascolare, risultando essi aumentati in quelle condizioni particolarmente gravative per tali sistemi, prima tra tutte l'obesità.

Plasma leptin and adiponectin levels in hormone replacement therapy and contraception: effects of different progestogens

Costantino Di Carlo, M.D., Giovanni A. Tommaselli, Ph.D., Nicoletta De Rosa, M.D., Annamaria Fabozzi, M.D., Romina Santoro, M.D., Giuseppe Bifulco, M.D., Stefania Sparice, M.D., and Carmine Nappi, M.D.

Department of Obstetrics and Gynecology, University of Naples "Federico II", Naples, Italy

Objective: To evaluate the impact of hormone replacement therapy and oral contraceptives containing different progestogens on adiponectin and leptin serum levels.

Design: Prospective, longitudinal, semi-randomized study.

Setting: General gynecology clinic of a university hospital.

Patient(s): Forty-five healthy postmenopausal and 45 healthy premenopausal women.

Intervention(s): Thirty postmenopausal women were randomized to receive either drospirenone (DRSP) 2 mg + E₂ 1 mg (n = 15) or norethisterone acetate (NETA) 0.5 mg + E₂ 1 mg (n = 15). Thirty premenopausal women were randomized to receive either ethinilestradiol (EE) 0.020 mg + DRSP 3 mg (n = 15) or EE 0.020 mg + desogestrel 0.15 mg (n = 15). Furthermore, 15 postmenopausal and 15 premenopausal untreated women served as controls.

Main Outcome Measure(s): Adiponectin and leptin serum levels before and after 6 months of hormonal therapy. **Result(s):** No significant differences in leptin levels were detected in any group after 6 months. Adiponectin levels were significantly reduced in the NETA + E₂ group and increased in the EE + DRSP group, while remaining unmodified in all other groups.

Conclusion(s): Hormone replacement therapy with NETA, but not with DRSP, decreases serum adiponectin levels. Oral contraceptives containing DRSP increase serum adiponectin levels. (Fertil Steril® 2011; ■: ■-■. ©2011 by American Society for Reproductive Medicine.)

Key Words: Leptin, adiponectin, drospirenone, hormone replacement therapy, combined oral contraceptives

Hormones and adipokines secreted by adipose tissue regulate a number of processes, ranging from appetite regulation and insulin sensitivity to inflammation and atherogenesis, both centrally (central nervous system), and peripherally (skeletal muscle and liver). The influence of adipose tissue on the cardiovascular system has led to the concept of the adipovascular axis (1).

Leptin (LEP) is a 167-amino acid protein expressed mainly by adipocytes and released in the blood in proportion to the size of adipose tissue as a signal of energy stores. Its role in the regulation of food intake and energy balance is well known. It may be involved in glucose metabolism, as well as in normal sexual maturation and reproduction (2). It also interacts with the hypothalamic-pituitary-adrenal, thyroid, and growth hormone axes and even with hematopoiesis and the immune system (3).

Adiponectin (AdipoQ) circulates in plasma as multimeric complexes and has pleiotropic beneficial effects upon obesity-related complications. In contrast to other adipokines, with their levels increasing with fat mass, AdipoQ levels decrease in obesity (4); the levels increase after weight loss (5). On top of its well-defined insulin-sensitizing and metabolic regulatory effects, AdipoQ mediates different vascular processes (6) and has a predominantly

anti-inflammatory action, in contrast with most other adipokines (7, 8). The expression of AdipoQ seems to be regulated by aldosterone through the activation of mineralcorticoid receptor, and treatment with a mineralcorticoid receptor antagonist in *db/db* mice increases circulating AdipoQ (9).

Progestins used in hormonal therapies have been shown to interfere with the cardiovascular system and metabolic profile. Progesterone (P) increases nitric oxide synthesis. Androgenic progestins interfere with the modification of the lipid profile induced with estrogens, whereas nonandrogenic and antiandrogenic progestins seem to be metabolically neutral (10). The most frequently used progestogens in hormonal therapies (e.g., 19-nortestosterone- and 17 α -hydroxyprogesterone-derived progestins) lack antimineralcorticoid activity. This could account for the weight gain, water retention, and increased blood pressure that has been reported in some women using postmenopausal hormone replacement therapies (HRT) or combined oral contraceptives (COCs) (11–13).

Drospirenone (DRSP) is a novel progestin similar to natural P, combining potent progestogenic and antiandrogenic activities with antimineralcorticoid actions that could influence the metabolic profile and adipovascular axis activity.

The aim of this study was to evaluate the impact of HRT and COCs containing DRSP or a different progestogen (norethisterone acetate [NETA] or desogestrel) on AdipoQ and LEP serum levels in healthy postmenopausal and premenopausal women, respectively.

MATERIALS AND METHODS

From January to December 2009, we evaluated 237 postmenopausal women in the menopause clinic and 256 premenopausal women in the general gynecology clinic of our department for inclusion in this prospective

Received February 8, 2011; revised April 22, 2011; accepted May 4, 2011. C.D.C. has nothing to disclose. G.A.T. has nothing to disclose. N.D.R. has nothing to disclose. A.F. has nothing to disclose. R.S. has nothing to disclose. G.B. has nothing to disclose. S.S. has nothing to disclose. C.N. has nothing to disclose.

Reprint requests: Costantino Di Carlo, M.D., Department of Obstetrics and Gynecology, University of Naples "Federico II", Via S. Pansini, 5, 80131 Naples, Italy (E-mail: costantino.dicarlo@unina.it).



semirandomized study. Enrollment was stopped when 45 postmenopausal and 45 premenopausal women had been recruited.

Inclusion criteria for postmenopausal women were: age >45 years, spontaneous menopause retrospectively defined as the lack of menses for 12 consecutive months and FSH \geq 40 UI/L and E₂ \leq 20 pg/mL, last menstrual period dating back no more than 2 years before enrollment, no contraindications to HRT, no history of previous HRT, body mass index (BMI) <30 kg/m², and signature of informed consent. Among the 45 recruited postmenopausal women, 30 were willing to receive HRT and 15 were not.

Criteria for inclusion for premenopausal woman were: age between 18 and 35 years, age of menarche between 12 and 14 years, demonstrable ovulation during the pretreatment cycle by means of serial ultrasonography, BMI between 18 and 25 kg/m², regular menstrual cycles, normal diet without low- or high-caloric ingestion, and signature of informed consent. Among the 45 recruited premenopausal women, 30 were willing to receive COCs and 15 were not.

Patients receiving HRT were randomized to receive either DRSP 2 mg + E₂ 1 mg (Angeliq; Bayer-Schering) (group A; n = 15) or NETA 0.5 mg + E₂ 1 mg (Activelle; Novo Nordisk) (group B; n = 15). The 15 women who refused HRT did not receive any treatment and served as controls (group C).

Patients receiving COC therapy were randomized to receive either ethinyllestradiol (EE) 0.020 mg + DRSP 3 mg (Yasminelle; Bayer-Schering) (group D; n = 15), or EE 0.020 mg + desogestrel 0.15 mg (Mercilon; Organon-Schering Plough) (group E; n = 15). The 15 women who refused COCs did not receive any treatment and served as controls (group F).

Treatment was administered for 6 months. Patients were requested to maintain their usual exercise habits and diet during treatment.

During enrollment, all patients underwent gynecologic examinations including cervical cytology. Postmenopausal women underwent transvaginal ultrasonography for the evaluation of endometrial thickness, mammography, and routine blood evaluation; and premenopausal women underwent transvaginal ultrasonography between days 10 to 16 of their menstrual cycle to demonstrate ovulation.

Before starting treatment and after 6 months of treatment, BMI and waist to hip ratio (WHR) were recorded. Blood samples for determination of LEP and AdipoQ levels were drawn in the morning after an overnight fast. After centrifugation, serum samples were stored at -80°C for subsequent assays.

LEP concentrations were measured with a radioimmunoassay with coated tubes kit (Mediagnost); the assay has a detection limit of 0.1 ng/mL, and the interassay and intra-assay coefficients of variation were 5.0% to 5.3% and 4.4% to 4.8%, respectively. AdipoQ concentrations were measured by a high-sensitivity radioimmunoassay kit (DRG International Inc.); the assay has a detection limit of 1 ng/mL, and the interassay and intra-assay coefficients of variation were 6.90% to 9.15% and 1.78% to 6.21%, respectively.

The primary end point was the difference in LEP levels between basal values and values after 6 months of therapy. The secondary end point was the difference in AdipoQ levels between basal values and values after 6 months of therapy.

Because serum LEP levels showed a nonnormal distribution, they were normalized for BMI values (LEP/BMI), and LEP/BMI values were used to compare baseline with 6-month values. To detect a difference of 3 ng/mL in LEP levels, it was necessary to enroll a total of 30 patients (15 per group), both for premenopausal and postmenopausal women.

Data analyses were performed using the SPSS 15.0 software package (SPSS Inc.). The level of significance for all tests was set at $P < .05$. Data were evaluated for distribution by the Shapiro Wilks test. For data with a normal distribution, a Student's *t* test for paired data was used to compare baseline values with values observed at the follow-up visit within each group. For those parameters that did not present a normal distribution, the variables were compared using a Wilcoxon test. All data are reported as means \pm SD, with the exception of LEP levels, reported as median (range).

RESULTS

Among the 45 postmenopausal women and 45 premenopausal women enrolled, 41 (group A, n = 14; group B, n = 12; and group C, n = 15) and 40 patients (group D, n = 12; group E, n = 14; and group F, n = 14), respectively, completed the study. Anagraphic, anthropometric, and biochemical parameters of the patients are reported in Table 1.

Group ^a	Age (y)	BMI (kg/m ²)		WHR		LEP (ng/dL)/BMI (kg/m ²) ^b		AdipoQ (ng/mL)		P value
		Basal	After 6 mo	Basal	After 6 mo	Basal	After 6 mo	Basal	After 6 mo	
A	49.8 \pm 2.1	24.8 \pm 3.2	24.8 \pm 2.9	0.81 \pm 0.05	0.81 \pm 0.07	0.42 \pm 0.19	0.51 \pm 0.27	9.64 \pm 4.2	9.46 \pm 4.4	.76
B	50 \pm 2.6	26.0 \pm 2.5	25.9 \pm 2.6	0.94 \pm 0.25	0.94 \pm 0.25	0.61 \pm 0.49	0.62 \pm 0.52	12.8 \pm 5.5	9.6 \pm 5.5	.001
C	51 \pm 1.6	24.7 \pm 1.8	24.55 \pm 2.6	0.83 \pm 0.07	0.81 \pm 0.07	0.37 \pm 0.19	0.42 \pm 0.27	7.8 \pm 3.6	7.8 \pm 2.9	.96

Note: Values are reported as mean \pm SD.
^a Group A, DRSP + E₂; group B, NETA + E₂; group C, postmenopausal control group.
^b Leptin value normalized for BMI.
 Di Carlo. Leptin and adiponectin levels in HRT and OCs. *Fertil Steril* 2011.

No significant differences for age, BMI, WHR, LEP levels, and AdipoQ levels were found among postmenopausal groups (A, B, and C) and among premenopausal groups (D, E, and F) at baseline. At baseline, the mean age was significantly lower in premenopausal women (groups D + E + F) in comparison with that of postmenopausal women (groups A + B + C) (23.8 ± 3.2 vs. 50.3 ± 2.1 years, respectively; $P < .001$). Basal BMI (25.0 ± 2.8 vs. 21.5 ± 2.8 kg/m²; $P = .003$) and WHR (0.84 ± 0.12 vs. 0.72 ± 0.38 ; $P = .004$) were significantly higher in postmenopausal women (groups A + B + C) in comparison with those of premenopausal women (groups D + E + F). Serum AdipoQ levels were significantly higher in postmenopausal women in comparison with those of premenopausal women (9.4 ± 4.3 vs. 6.4 ± 2.9 ng/mL; $P = .04$). BMI-normalized LEP values did not show a significant difference between postmenopausal and premenopausal women (0.43 ± 0.25 vs. 0.38 ± 0.21 ; $P = .3$).

No significant differences in BMI or WHR were detected after 6 months of treatment in comparison with baseline. Among postmenopausal women, BMI-normalized LEP levels did not change significantly before and after HRT in each group (group A, .42 .19 vs. .51 .27; group B, .61 .49 vs. .62 .52; group C, .37 .19 vs. .42 .27; $P =$ nonsignificant). Among premenopausal women, BMI-normalized LEP levels did not change significantly before and after COCs (group D, .31 .35 vs. .35 .18; group E, .24 .35 vs. .37 .12; group F, .33 .06 vs. .32 .01; $P =$ nonsignificant).

LEP levels normalized for BMI (LEP/BMI) and AdipoQ levels before and after treatment are reported in Table 2. We did not observe any significant modification of LEP/BMI values after treatment in any of the 6 groups.

Among postmenopausal women, serum AdipoQ levels were significantly reduced after treatment with NETA + E₂ (group B) ($P < .001$), whereas the levels remained unmodified in all other groups (Fig. 1). Among premenopausal women, serum AdipoQ levels were significantly increased after treatment with EE + DRSP (group D) ($P < .05$), whereas the levels remained unmodified in all other groups (Fig. 2).

DISCUSSION

Our data showed no effect of estrogen/progestin administration on serum LEP concentrations, in patients receiving either COCs or HRT and are in good accordance with other published reports.

The relationship of LEP with sex hormones (FSH, E₂, or P) is well known. Indeed, it has been demonstrated that in women, LEP levels increase significantly and appetite and food intake are usually greater during the luteal phase (14). Therefore, it could be hypothesized that adipocytes secrete larger amounts of leptin during this phase. Furthermore, it has been shown that COCs do not influence LEP levels in normally cycling women (15) and that the positive correlation between serum LEP levels and BMI does not change with age or estrogen administration (16).

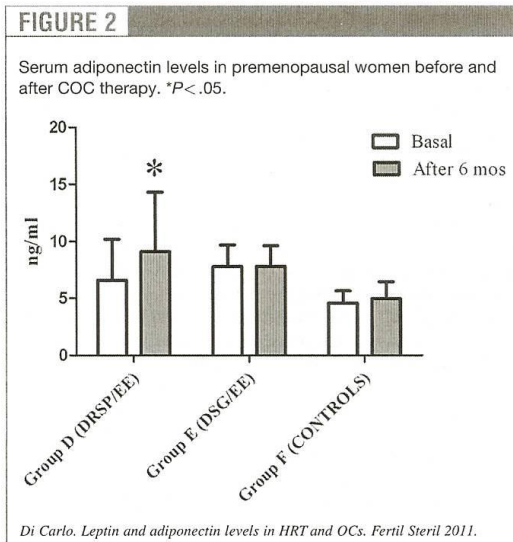
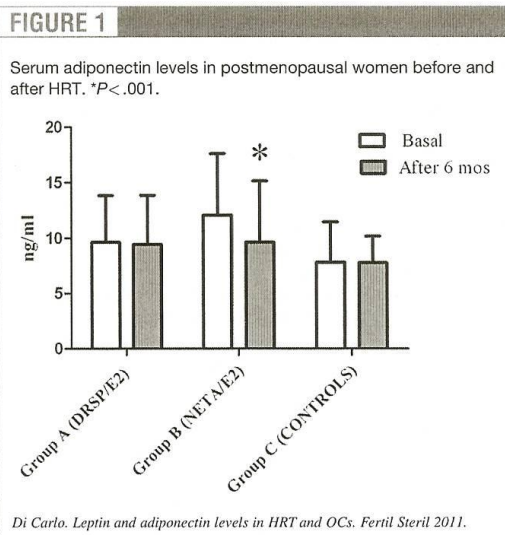
The effects of postmenopausal metabolic modifications on LEP levels are evident. Indeed, fat tissue accumulation and weight gain observed during the postmenopausal period are paralleled by a correlated increase in serum LEP levels. HRT seems to reverse this effect. Indeed, 1 year of HRT induced a decrease of LEP levels (17, 18).

In this study, on the other hand, we demonstrated that short-term therapy does not induce a significant increase in serum LEP levels, in accordance with an unmodified BMI. We can therefore hypothesize that HRT influence on fat tissue metabolism and on LEP levels may be observed only after at least 1 year of therapy.

Group ^a	Age (y)	BMI (kg/m ²)		P value	WHR		P value	Leptin (ng/dL)/BMI (kg/m ³) ^b		P value	Adiponectin (ng/mL)		P value
		Basal	After 6 mo		Basal	After 6 mo		Basal	After 6 mo		Basal	After 6 mo	
D	23.6 ± 4.3	20.5 ± 1.9	20.1 ± 1.7	.19	0.73 ± 0.04	0.72 ± 0.02	.53	0.31 ± 0.35	0.35 ± 0.18	.39	6.6 ± 3.6	9.1 ± 5.2	.05
E	23.5 ± 3.9	22.4 ± 2.7	22.3 ± 2.7	.57	0.73 ± 0.04	0.73 ± 0.05	.60	0.24 ± 0.35	0.37 ± 0.12	.80	7.8 ± 1.9	7.8 ± 1.8	.94
F	24.2 ± 1.5	22.7 ± 3.3	22.6 ± 3.1	.92	0.72 ± 0.03	0.71 ± 0.03	.22	0.33 ± 0.06	0.32 ± 0.01	.75	4.6 ± 1.1	5.0 ± 1.5	.79

Note: Values are reported as mean ± SD.
^a Group D, DRSP + EE; group E, desogestrel + EE; group F, premenopausal control group.
^b Leptin value normalized for BMI.

Di Carlo. Leptin and adiponectin levels in HRT and OCs. *Fertil Steril* 2011.



For postmenopausal women, our results are only partially different than our previous data, which indicated a decrease in LEP levels in postmenopausal women on HRT or raloxifene after 12 months of treatment, which paralleled a decrease in BMI (17, 18). These differences could be explained by the shorter interval of time considered in the present study and by the lack of changes in BMI induced by the treatment.

E_2 effects on adiponectin secretion are not yet clearly understood—the data in published reports are controversial. Indeed, studies in animals have shown a reduction or an increase of AdipoQ levels after E_2 administration (19, 20). Moreover, it has been demonstrated that E_2 blocks anti-inflammatory cytokine secretion, particularly AdipoQ, worsening inflammatory response and favoring atherogenesis (21). Data on the effect of postmenopausal hypoestrogenism on adiponectin secretion in humans are limited, conflicting, and inconclusive. Nishizawa et al. (22) and Sieminska et al. (23) reported similar adiponectin levels in premenopausal and postmenopausal women, and thus their data seem to argue against the hypothesis of regulation of AdipoQ by estrogens. On the other hand, Gavrilu et al. (24) showed increased adiponectin levels in postmenopausal women. These data were confirmed by Leung et al. (25), and they also demonstrated that AdipoQ levels were negatively correlated with E_2 and P.

In this study, basal serum AdipoQ levels were significantly higher in postmenopausal women in comparison with those in premenopausal women, notwithstanding higher BMI and WHR values. It may be suggested that higher levels of AdipoQ could be a consequence of postmenopausal hypoestrogenism. Furthermore, our data showed that HRT and COCs may influence AdipoQ concentrations, depending on the characteristics of the progestin used. Indeed, although DRSP-containing HRT in postmenopausal women did not induce any modification of AdipoQ levels similarly to what happened in untreated women, NETA-containing HRT induced a significant decrease in AdipoQ concentrations.

Moreover in premenopausal women, after 6 months of COC administration, serum AdipoQ levels were significantly increased in

patients treated with EE + DRSP (group D), whereas they remained unchanged in patients treated with EE + desogestrel and in controls.

In other words, in postmenopausal women, the use of HRT with NETA decreased AdipoQ levels. This effect was absent with DRSP. Although desogestrel did not modify AdipoQ levels in premenopausal women using COCs, DRSP caused an increase in its concentrations. These data might reflect the antiminerocorticoid activities of DRSP.

Indeed, previous studies on preadipocytes have shown that aldosterone administration decreased expression of AdipoQ (9). Guo et al. (9) demonstrated that urinary aldosterone levels were elevated in obese mice. These researchers showed that in vitro treatment of preadipocytes with aldosterone decreased AdipoQ mRNA expression. This effect was reversed by canrenoate (spironolactone analogue) addition. In vivo, a mineralocorticoid receptor blockade by eplerenone (spironolactone analogue) reduced cardiovascular inflammation and injury in obese mice, preventing the decrease of AdipoQ expression in visceral fat and heart tissue observed in untreated animals. These data suggest a novel mechanism for beneficial cardiovascular effects of mineralocorticoid blockade through the reduction of adipose tissue secretion of proinflammatory factors and increase in AdipoQ production (9). A similar increase in AdipoQ levels has been observed in patients with diabetes treated with spironolactone (26).

Few data have been published about the effects of COCs on AdipoQ. In particular, in obese patients with polycystic ovarian syndrome, treatment with an OC containing EE + cyproterone acetate increased serum AdipoQ levels (27), whereas a COC containing EE + DRSP failed to increase AdipoQ levels (13). These data are apparently in contrast with ours, but it is important to consider that we enrolled a healthy population. In fact, AdipoQ levels are specifically decreased in patients with polycystic ovary syndrome, and this abnormality is independent from the grade of obesity, being present even in lean women with this syndrome (28, 29).

Recently many studies have investigated the effects of HRT on serum-AdipoQ levels. Published data appear to be in contrast. Kunnari

ARTICLE IN PRESS

et al. (30) demonstrated that oral estrogen administration in postmenopausal, hysterectomized women reduced AdipoQ levels. Sieminska et al. (23) and Sumino et al. (31) found no significant changes in serum AdipoQ levels in patients treated with E₂ and NETA or medroxyprogesterone acetate. Recently Høst et al. (32) demonstrated a significant decrease in serum AdipoQ levels in patients affected by Turner syndrome treated with NETA-containing HRT.

Tankø and Christiansen (21) were the first to study the effects of DRSP-containing HRT on AdipoQ levels. They showed a decrease in serum AdipoQ levels in women treated with DRSP 3 mg + E₂ 1 mg and no effect with 1 or 2 mg of DRSP. The differences between our results and those of these researchers might be explained by the lower dose of E₂ administered in their study.

The reduction in AdipoQ levels observed in postmenopausal women treated with NETA + E₂ may be due to the effect of exogenous estrogen and to the lack of antiminerocorticoid effect of NETA. Indeed, patients treated by DRSP + E₂ did not show modifications in AdipoQ levels either. This may be due to a DRSP-antiminerocorticoid effect that may counterbalance the hypothesized inhibitory effect of exogenous estrogen on anti-inflammatory adipokines.

A limit of our study was that the control groups were composed of women who refused hormonal therapies and were not represented by randomized women. Although this may represent a selection bias that limits the overall quality of the study, we preferred not to withhold women with inclusion criteria from HRT, and

obviously women requesting COCs cannot be randomized to a placebo group.

AdipoQ is an important component of the adipovascular axis and protects the vasculature through its pleiotropic actions. It acts as an endogenous biologically relevant modulator of endothelial cell response to proinflammatory stimulation, induces endothelial nitric oxide production and vascular relaxation, inhibits inflammatory response, and reduces oxidative/nitrative stress (33). In vitro studies have demonstrated that AdipoQ acts on injured vascular endothelium (34) and inhibits both tumor necrosis factor α -induced monocyte adhesion to endothelial cells (35) and the progression of macrophages to foam cells (36). The AdipoQ-knockout mouse has increased atherogenesis and an exaggerated neointimal and vascular smooth muscle proliferative response to vascular injury. The latter response can be attenuated with AdipoQ administration (1, 37).

Considering anti-inflammatory action of AdipoQ, several studies have investigated its possible role in cancer progression. Cust et al. (38) demonstrated that high circulating levels of this adipokine were associated with a significant decrease in the risk of endometrial cancer, whereas Nakayama et al. (39) documented the antiproliferative potential of AdipoQ in various breast cancer cell lines.

Therefore, we believe that the use of HRT or COCs containing DRSP in patients with risk factors for cardiovascular disease may deserve further evaluation.

Acknowledgments: The authors thank Prof. Rosaria Meli and Dr. Giuseppina Mattace Raso for their technical support.

REFERENCES

- Li FY, Cheng KK, Lam KS, Vanhoutte PM, Xu A. Cross-talk between adipose tissue and vasculature: role of adiponectin. *Acta Physiol (Oxf)*; 2010 Nov 10 [Epub ahead of print].
- Schwartz M, Peskind E, Raskind M, Boyko EJ, Porte D. Cerebrospinal fluid leptin levels: relationship to plasma levels and to adiposity in humans. *Nat Med* 1996;2:589-93.
- Rossetti L, Massillon D, Barzilai N, Vuguin P, Chen W, Hawkins M, et al. Short term effects of leptin on hepatic gluconeogenesis and in vivo insulin action. *J Biol Chem* 1997;272:27758-63.
- Arita Y, Kihara S, Ouchi N, Takahashi M, Maeda K, Miyagawa J, et al. Paradoxical decrease of an adipose-specific protein, adiponectin, in obesity. *Biochem Biophys Res Commun* 1999;257:79-83.
- Hotta K, Funahashi T, Arita Y, Takahashi M, Matsuda M, Okamoto Y, et al. Plasma concentrations of a novel, adipose-specific protein, adiponectin, in type 2 diabetic patients. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2000;20:1595-9.
- Zhu W, Cheng KK, Vanhoutte PM, Lam KS, Xu A. Vascular effects of adiponectin: molecular mechanisms and potential therapeutic intervention. *Clin Sci Lond* 2008;114:361-74.
- Nawrocki AR, Scherer PE. The delicate balance between fat and muscle: adipokines in metabolic disease and musculoskeletal inflammation. *Curr Opin Pharmacol* 2004;4:281-9.
- Chandran M, Phillips SA, Ciaraldi T, Henry RR. Adiponectin: more than just another fat cell hormone? *Diabetes Care* 2003;26:2442-50.
- Guo C, Ricchiuti V, Lian BQ, Yao TM, Coutinho P, Romero JR, et al. Mineralocorticoid receptor blockade reverses obesity-related changes in expression of adiponectin, peroxisome proliferator-activated receptor-gamma, and proinflammatory adipokines. *Circulation* 2008;117:2253-61.
- Writing Group on behalf of Workshop Consensus Group. Aging, menopause, cardiovascular disease and HRT. International Menopause Society Consensus Statement. *Climacteric* 2009;12:368-77.
- Pérez-López FR, Chedraui P, Gilbert JJ, Pérez-Roncero G. Cardiovascular risk in menopausal women and prevalent related comorbid conditions: facing the post-Women's Health Initiative era. *Fertil Steril* 2009;92:1171-86.
- WHO Collaborative Study of Cardiovascular Disease and Steroid Hormone Contraception. Venous thromboembolic disease and combined oral contraceptives: results of an international, multicenter, case-control study. *Lancet* 1995;346:1575-82.
- Ibáñez L, De Zegher F. Ethinylestradiol-drospirenone, flutamide-metformin, or both for adolescents and women with hyperinsulinemic hyperandrogenism: opposite effects on adipocytokines and body adiposity. *J Clin Endocrinol Metab* 2004;89:1592-7.
- Dye L, Blundell JE. Menstrual cycle and appetite control: implications for weight regulation. *Hum Reprod* 1997;12:1142-51.
- Rechberger T, Baranowski W, Postawski K, Jakimiuk AJ, Tomaszewski J, Kulik Rechberger B, et al. Serum leptin concentrations in women taking oral contraceptives. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol* 1999;83:105-8.
- Castracane VD, Kraemer RR, Franken MA, Kraemer GR, Gimpel T. Serum leptin concentration in women: effect of age, obesity, and estrogen administration. *Fertil Steril* 1998;70:472-7.
- Di Carlo C, Tommaselli GA, Sammartino A, Bifulco G, Nasti A, Nappi C. Serum leptin levels and body composition in postmenopausal women: effects of hormone therapy. *Menopause* 2004;11:466-73.
- Tommaselli GA, Di Carlo C, Nasti A, Giordano E, Pisano G, Pellicano M, et al. Effects of bilateral ovariectomy and postoperative hormonal replacement therapy with 17 β -estradiol or raloxifene on serum leptin levels. *Menopause* 2003;10:160-4.
- Combs TP, Berg AH, Rajala MW, Klebanov S, Iyengar P, Jimenez-Chillaron JC, et al. Sexual differentiation, pregnancy, calorie restriction, and aging affect the adipocyte-specific secretory protein adiponectin. *Diabetes* 2003;52:268-76.
- Gui Y, Silha GY, Murphy LJ. Sexual dimorphism and regulation of resistin, adiponectin, and leptin expression in the mouse. *Obes Res* 2004;12:1481-91.
- Tankø LB, Christiansen C. Effects of 17 β -oestradiol plus different doses of drospirenone on adipose tissue, adiponectin and atherogenic metabolites in postmenopausal women. *J Intern Med* 2005;258:544-53.
- Nishizawa H, Shimomura I, Kishida K, Maeda N, Kurijama H, Nagaretani H, et al. Androgens decrease plasma adiponectin, an insulin-sensitizing adipocyte-derived protein. *Diabetes* 2002;51:2734-41.
- Sieminska L, Wojciechowska C, Niedziolka D, Marek B, Kos-Kudla B, Kajdaniuk D, et al. Effect of postmenopause and hormone replacement therapy on serum adiponectin levels. *Metabolism* 2005;54:1610-4.
- Gavrila A, Chan JL, Yiannakouris N, Kontogianni M, Miller LC, Orlova C, et al. Serum adiponectin levels are inversely associated with overall and central fat distribution but are not directly regulated by acute fasting or leptin administration in humans: cross-sectional and interventional studies. *J Clin Endocrinol Metab* 2003;88:4823-31.
- Leung KC, Xu A, Craig ME, Martin A, Lam KS, O'Sullivan AJ. Adiponectin isoform distribution in women—relationship to female sex steroids and insulin sensitivity. *Metabolism* 2009;58:239-45.
- Matsumoto S, Takebayashi K, Aso Y. The effect of spironolactone on circulating adipocytokines in patients with type 2 diabetes mellitus complicated by diabetic nephropathy. *Metabolism* 2006;55:1645-52.

ARTICLE IN PRESS

27. Luque-Ramírez M, Aélvarez-Blasco F, Escobar-Morreale HF. Antiandrogenic contraceptives increase serum adiponectin in obese polycystic ovary syndrome patients. *Obesity* 2008;17:3–9.
28. Carmina E, Orio F, Palomba S, Cascella T, Longo RA, Colao AM, et al. Evidence for altered adipocyte function in polycystic ovary syndrome. *Eur J Endocrinol* 2005;152:389–94.
29. Escobar-Morreale HF, Villuendas G, Botella-Carretero JJ, Alvarez-Blasco F, Sanchón R, Luque-Ramírez M, et al. Adiponectin and resistin in PCOS: a clinical, biochemical and molecular genetic study. *Hum Reprod* 2006;21:2257–65.
30. Kunnari A, Santaniemi M, Jokela M, Karjalainen AH, Heikkinen J, Ukkola O, et al. Estrogen replacement therapy decreases plasma adiponectin but not resistin in postmenopausal women. *Metabolism* 2008;57:1509–15.
31. Sumino H, Takahashi T, Itoh T, Kusaka K, Yamakawa J, Ichikawa S, et al. Plasma adiponectin levels in post-menopausal women receiving hormone replacement therapy. *J Int Med Res* 2004;32:639–45.
32. Høst C, Bojesen A, Frystyk J, Flyvbjerg A, Christiansen JS, Gravholt CH. Effect of sex hormone treatment on circulating adiponectin and subforms in Turner and Klinefelter syndrome. *Eur J Clin Invest* 2010;40:211–9.
33. Goldstein BJ, Scalia RG, Ma XL. Protective vascular and myocardial effects of adiponectin. *Nat Clin Pract Cardiovasc Med* 2009;6:27–35.
34. Okamoto Y, Arita Y, Nishida M, Muraguchi M, Ouchi N, Takahashi M, et al. An adipocyte-derived plasma protein, adiponectin, adheres to injured vascular walls. *Horm Metab Res* 2000;32:47–50.
35. Ouchi N, Kihara S, Arita Y, Maeda K, Kuriyama H, Okamoto Y, et al. Novel modulator for endothelial adhesion molecules: adipocyte-derived plasma protein adiponectin. *Circulation* 1999;100:2473–6.
36. Ouchi N, Kihara S, Arita Y, Nishida M, Matsuyama A, Okamoto Y, et al. Adipocyte-derived plasma protein, adiponectin, suppresses lipid accumulation and class A scavenger receptor expression in human monocyte-derived macrophages. *Circulation* 2001;103:1057–63.
37. Ouchi N, Kihara S, Funahashi T, Matsuzawa Y, Walsh K. Obesity, adiponectin and vascular inflammatory disease. *Curr Opin Lipidol* 2003;14:561–6.
38. Cust AE, Kaaks R, Friedenreich C, Bonnet F, Laville M, Lukanova A, et al. Plasma adiponectin levels and endometrial cancer risk in pre- and postmenopausal women. *J Clin Endocrinol Metab* 2007;92:255–63.
39. Nakayama S, Miyoshi Y, Ishihara H, Noguchi S. Growth-inhibitory effect of adiponectin via adiponectin receptor 1 on human breast cancer cells through inhibition of S-phase entry without inducing apoptosis. *Breast Cancer Res Treat* 2008;112:405–10.

Materiali e metodi

Studio longitudinale, prospettico, randomizzato

Sono state valutate 237 donne in postmenopausa spontanea afferenti al Centro per la Menopausa e la Prevenzione dell'Osteoporosi Postmenopausale del nostro Dipartimento e 256 donne fertili afferenti all'Ambulatorio di Ginecologia Generale del nostro Dipartimento per l'arruolamento in uno studio longitudinale, prospettico randomizzato. L'arruolamento è stato considerato terminato al raggiungimento del numero di trenta donne in postmenopausa e trenta donne fertili.

I criteri di inclusione per le donne in postmenopausa sono stati:

- diagnosi di menopausa spontanea (amenorrea per 12 mesi consecutivi) da non più di 24 mesi, confermata da dosaggi ormonali (FSH > 40UI/l ed estradiolo < 20pg/ml);
- assenza di controindicazioni alla TOS; anamnesi negativa per l'assunzione di qualsiasi tipo di farmaco negli ultimi 3 mesi;
- anamnesi negativa per precedente assunzione di TOS;
- anamnesi negativa per spotting o sanguinamenti uterini anomali.

I criteri di inclusione per le donne fertili sono stati:

- menarca tra i 12 e i 14 anni; dimostrata ovulazione nel ciclo precedente l'inizio del trattamento;
- BMI compreso tra 18 e 25 Kg/m²;

- . cicli mestruali regolari;
- dieta normo-calorica.

Criteri di esclusione per entrambi i gruppi di donne sono stati:

- confermata o sospetta gravidanza;
- gravidanza o allattamento nell'anno precedente all'arruolamento; ù
- aborto nei sei mesi precedenti lo studio;
- assunzione di preparati ormonali nell'anno precedente all'arruolamento;
- trattamenti concomitanti;
- fumo (più di 10 sigarette/die);
- BMI > 30 Kg/m²;
- patologie epatiche, renali, mammarie;
- disordini vascolari o metabolici e in generale qualsiasi condizione che controindicasse l'utilizzo di preparati estrogeno-progestinici.

All'atto del reclutamento ciascun soggetto è stato informato circa gli scopi e le modalità dello studio e da tutti è stato ottenuto un consenso informato scritto.

Dopo l'arruolamento, le pazienti in postmenopausa che necessitavano di TOS sono state randomizzate in due gruppi di trattamento: il gruppo A (n= 10), trattato con 2 mg di DRSP e 1 mg di 17 β Estradiolo (E₂) somministrati per via orale in schema combinato continuo (DRSP/E₂) [*Angeliq*®; Bayer] e il gruppo B (n= 10) trattato con 0.5 mg di noretisterone acetato e 1 mg di 17 β E₂ somministrati per via orale in schema combinato continuo (NETA/E₂)

[*Activelle*®; NovoNordisk]. Le restanti 10 partecipanti che non necessitavano di TOS, sono state considerate gruppo di controllo (Gruppo C) e non hanno assunto alcun trattamento.

Le pazienti fertili, che necessitavano di terapia contraccettiva, sono state randomizzate in due gruppi di trattamento: il gruppo D (n= 10) trattato con 3 mg di DRSP associati a 0.020 mg di etinilestradiolo (EE/DRSP) [*Yasminelle*®; Bayer] e il gruppo E (n= 10) trattato con 0.15 mg di desogestrel associati a 0.020 mg di etinilestradiolo (EE/DSG) [*Mercilon*®; Organon]. Le restanti 10 partecipanti che non necessitavano di terapia contraccettiva, sono state considerate gruppo di controllo (Gruppo F) e non hanno assunto alcun trattamento. Le pazienti dei gruppi D ed E hanno iniziato l'assunzione della pillola contraccettiva a partire dal 1° giorno del successivo ciclo mestruale per un periodo di 21 giorni, seguito da 7 giorni di intervallo libero, durante il quale si è verificato il sanguinamento da sospensione.

La durata complessiva dei trattamenti è stata di 6 mesi. Le pazienti sono state istruite circa la necessità di non variare il loro regime dietetico durante tutto l'arco dello studio.

All'atto dell'arruolamento tutte le pazienti sono state sottoposte a valutazione clinica, visita ginecologica bimanuale e pap-test; nelle pazienti in postmenopausa sono stati inoltre effettuati esame ecografico transvaginale (TV-

USG) al fine di valutare lo spessore endometriale, mammografia ed esami ematochimici di routine.

Le pazienti fertili sono state invece sottoposte ad esami ecografici dal 10° al 16° giorno del ciclo mestruale per confermare la presenza di un normale ciclo ovulatorio.

Al basale e dopo 6 cicli di trattamento, inoltre, tutte le partecipanti allo studio sono state sottoposte a misurazione del BMI, del rapporto vita/fianchi (WHR) e della pressione arteriosa.

Il BMI è stato calcolato mediante il rapporto tra peso espresso in Kg ed altezza al quadrato, espressa in metri. La circonferenza vita è stata misurata alla minima circonferenza tra la gabbia toracica e la cresta iliaca; la circonferenza fianchi è stata misurata a livello della massima circonferenza nella regione glutea. Le misurazioni sono state effettuate in posizione verticale.

La pressione arteriosa sistolica e diastolica é stata misurata mediante sfigmomanometro brachiale manuale (Bosh® Pratikus-1) in posizione seduta e in ambiente confortevole, dopo un'astinenza dal fumo e dall'assunzione di bevande contenenti caffeina di almeno due ore.

Tutte le pazienti inoltre hanno compilato nell'arco dell'intero studio un diario sulle abitudini alimentari.

Al basale e a 6 mesi, inoltre, alle pazienti è stato praticato un prelievo di sangue venoso per la determinazione dei livelli sierici di LEP e AdipoQ. I

campioni di sangue sono stati praticati di mattina tra le 8 e le 9, dopo 12 ore di digiuno, e sono stati raccolti in provette contenenti agenti anticoagulanti. I campioni sono stati successivamente centrifugati e conservati a -80° .

I livelli di AdipoQ e LEP sono stati determinati in doppio utilizzando kit RIA. Per l'AdipoQ, l'*Adiponectin (human) RIA* (DRG International Inc. USA), con una sensibilità 1 ng/ml per 100 μ L di siero (coefficiente di variazione intra-assay 1.78-6.21%, coefficiente di variazione inter-assay 6.90-9.15%); per la LEP, *Leptin RIA-CT* (Mediagnost, Germany), con una sensibilità pari a 0.1 ng/ml (coefficiente di variazione intra-assay 4.4-4.8%, coefficiente di variazione inter-assay 5.0-5.3%).

RISULTATI

Le caratteristiche anagrafiche e antropometriche delle pazienti studiate sono riportate nella tabella 1.

Tabella 1. Caratteristiche anagrafiche e antropometriche delle pazienti prima e dopo la terapia e nei gruppi di controllo.

Gruppo	N°pazienti	Età (anni)	BMI* (m/h ²)			WHR* (cm)		
			Basale	6 mesi	P value	basale	6 mesi	P value
A	10		24,8±3,2	24,8±2,9	NS	0,81±0,05	0,81±0,07	NS
B	10	50 ±2,6	26,0±2,5	25,9±2,6	NS	0,94±0,25	0,94±0,25	NS
C	10	51 ±1,6	24,7±1,85	24,55±2,6	NS	0,83±0,07	0,81±0,07	NS
D	10	23,6 ±4,3	20,5±1,9	20,1±1,7	NS	0,73±0,04	0,72±0,02	NS
E	10	23,5 ±3,9	22,4±2,7	22,3±2,7	NS	0,73±0,04	0,73±0,05	NS
F	10	24,2 ±1,5	22,68±3,3	22,59±3,08	NS	0,72±0,03	0,71±0,03	NS

* I valori sono riportati come media ± deviazione standard.

Gruppo A: E₂/DRSP; gruppo B: E₂/NETA; gruppo C: controlli in menopausa;

gruppo D: EE/DRSP; gruppo E: EE/DSG; gruppo F: controlli fertili. § p < 0,05

All'interno dei due gruppi non sono state osservate differenze statisticamente significative nell'età della menopausa e del menarca rispettivamente.

Il BMI ed il WHR dopo i sei cicli di trattamento non hanno mostrato differenze statisticamente significative rispetto al basale né nel gruppo di pazienti trattate con TOS né nel gruppo di pazienti sottoposte a terapia contraccettiva.

I livelli di AdipoQ dopo sei cicli di trattamento sono risultati significativamente ridotti nel gruppo B ($p < 0,001$), non hanno mostrato differenze significative nel gruppo A e nel gruppo C e hanno subito un incremento significativo nel gruppo D ($p < 0,05$).

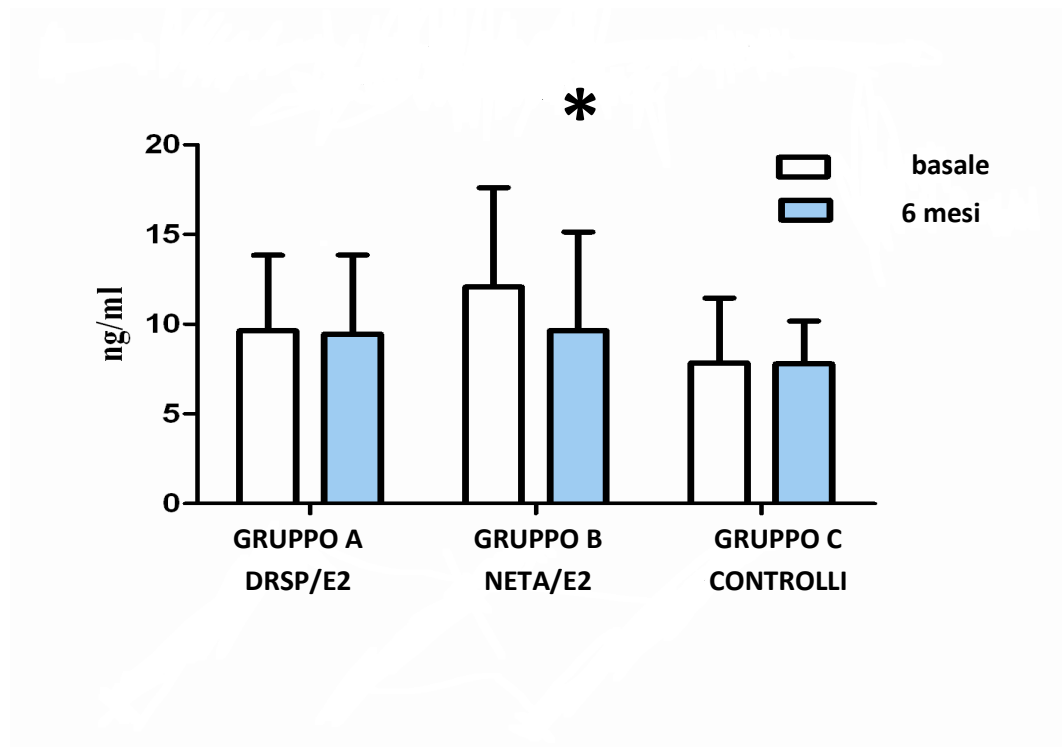
Alla fine del trattamento non si sono inoltre osservate modifiche significative dei livelli di leptina, né rispetto al basale, né tra i vari gruppi (tabella 2).

Tabella 2. Livelli sierici di AdipoQ e LEP nelle pazienti trattate prima e dopo la terapia nei gruppi di controllo.

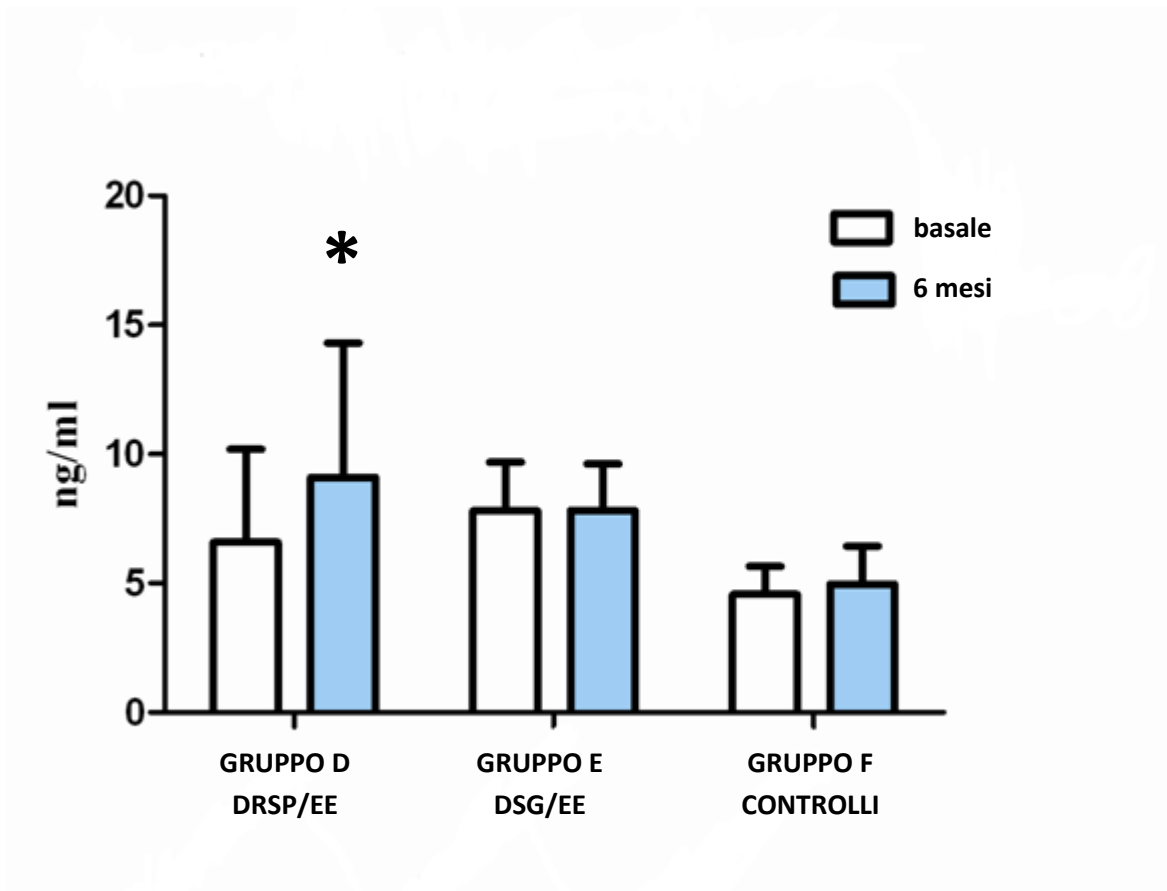
Gruppo	Leptina (ng/dl) [media +/- DS]		p
	<i>Basale</i>	<i>6 mesi</i>	
A	10,7±5,9	13,0±7,8	NS
B	16,0±12,9	16,62±13,45	NS
C	9,2±4,9	10,6±7,21	NS
D	6,5±3,5	7,2±3,6	NS
E	9,9±6,4	8,2±2,4	NS
F	7,06±2,45	6,89±1,3	NS

I valori sono riportati come media ± deviazione standard.

Gruppo A: E₂/DRSP; gruppo B: E₂/NETA; gruppo C: controlli in menopausa; gruppo D: EE/DRSP; gruppo E: EE/DSG; gruppo F: controlli fertili.



Livelli sierici di adiponectina nelle donne in postmenopausa a 0 e 6 mesi ($p < 0,001$)



Livelli sierici di adiponectina nelle donne fertili a 0 e 6 mesi ($p < 0,05$)

Discussione

L'obesità e le malattie cardiovascolari sono le patologie croniche maggiormente diffuse nelle società industrializzate, a prescindere dall'utilizzo di contraccettivi orali o TOS. Tuttavia, diversi studi, hanno riportato un incremento significativo del peso corporeo e della patologia cardio-vascolare associato all'assunzione di questi farmaci. E' stato inoltre ampiamente dimostrato che le terapie ormonali influenzano anche il profilo metabolico e lipidico.

Il tessuto adiposo è un organo endocrino altamente dinamico che secreta un gran numero di adipochine che giocano un ruolo fondamentale nella regolazione del metabolismo energetico, della sensibilità all'insulina e dell'omeostasi vascolare.

Infatti è stato dimostrato che proprio l'incremento della produzione di adipochine ad azione vasocostrittrice e proinfiammatoria che si verifica nei disordini dismetabolici, rappresenta il nesso tra obesità e insulinoresistenza, ipertensione e patologia cardiovascolare in genere.

Ad esempio la LEP, tipicamente aumentata in caso di obesità, esercita una varietà di effetti pro-aterogeni, incrementando l'attività piastrinica e la proliferazione delle cellule muscolari vasali, causando disfunzioni endoteliali e promuovendo lo stress ossidativo.

Al contrario, l'AdipoQ, esercita un'azione protettiva sull'endotelio vasale, modulando la risposta endoteliale ad uno stimolo pro-infiammatorio, inducendo

la produzione di ossido nitrico da parte delle cellule endoteliali, promuovendo la vasodilatazione, inibendo la risposta infiammatoria e riducendo lo stress ossidativo.

Inoltre studi, in vitro, hanno dimostrato che l'AdipoQ è in grado di impedire la progressione della placca ateromasica in quanto aderisce all'endotelio vascolare danneggiato ed inibisce l'adesione dei monociti indotta dal $TNF\alpha$ e l'espressione di molecole di adesione sulla superficie endoteliale, oltre a bloccare l'attività fagocitica e la progressione dello sviluppo dei macrofagi in cellule schiumose. I topi knockout per il gene dell'AdipoQ presentano, infatti, incremento dell'aterogenesi ed aumento della risposta proliferativa delle cellule della muscolatura vasale in seguito a stimolo infiammatorio. Questi fenomeni vengono attenuati dalla somministrazione di AdipoQ.

Diversi studi hanno suggerito che le terapie ormonali, a scopo contraccettivo o sostitutivo, possano influenzare l'espressione di LEP e AdipoQ.

Infatti, nel tessuto adiposo è stato identificato il recettore per gli estrogeni, a suggerire proprio un possibile coinvolgimento ormonale nella regolazione e nella secrezione di queste adipochine.

Tuttavia Kleibova et al non hanno osservato variazioni significative dei livelli di AdipoQ nell'arco del ciclo mestruale, suggerendo che tale adipochina non sia correlata alla funzione riproduttiva. In realtà, sebbene i suoi effetti sulla

steroidogenesi e sulla riproduzione non siano stati ancora pienamente compresi, i recettori per l'AdipoQ sono espressi nel tessuto ovarico e nell'endometrio e studi in vitro sembrano suggerire un'implicazione di tale adipochina nella regolazione della funzione ovarica.

Una possibile spiegazione ai livelli stabili di AdipoQ durante il ciclo mestruale è che il picco delle concentrazioni di estrogeni e progesterone si verifica in fasi diverse del ciclo, e dunque, gli steroidi sessuali, potrebbero determinare una sorta di soppressione continua sulla produzione di AdipoQ.

In realtà l'effetto inibitorio degli estrogeni sulla secrezione di AdipoQ non è stato ancora ben chiarito e i dati a riguardo in letteratura appaiono contrastanti. Se infatti da un lato studi su animali suggeriscono un effetto soppressivo, i dati circa l'effetto che l'ipoestrogenismo post-menopausale determina sulla secrezione di AdipoQ sono insufficienti e limitati. Nishizawa et al. e Sieminska et al. hanno riportato livelli simili di AdipoQ in pre- e post-menopausa, confutando l'ipotesi di una possibile regolazione estrogenica della secrezione di tale adipochina; al contrario, Gavrilina et al. hanno evidenziato un incremento dei livelli di AdipoQ in post-menopausa, confermato anche dai dati di Leung et al. che hanno inoltre dimostrato una correlazione inversa tra livelli di AdipoQ-HMW e livelli di estrogeni e progesterone.

Comunque il meccanismo attraverso cui gli steroidi sessuali femminili regolerebbero la secrezione di AdipoQ rimane ancora da chiarire. E' stato

proposto che, poichè l'AdipoQ è prodotta essenzialmente dagli adipociti, gli estrogeni ed il progesterone potrebbero influenzarne le concentrazioni controllando il metabolismo del tessuto adiposo. Studi in vitro hanno infatti dimostrato che gli estrogeni riducono l'espressione dell'AdipoQ negli adipociti.

In sintesi si può ragionevolmente concludere che gli steroidi sessuali femminili inibiscono la produzione di AdipoQ sebbene rimanga ancora da chiarire l'effetto di terapie ormonali con associazioni estro-progestiniche sui livelli di tale adipochina.

Infatti i dati in letteratura a riguardo sono pochi e la maggior parte di essi dimostrano una variazione dei livelli di AdipoQ nelle pazienti affette da sindrome dell'ovaio policistico (PCOS) trattate con terapia contraccettiva. In particolare, è stato dimostrato che il trattamento con un contraccettivo orale contenente etinilestradiolo e ciproterone acetato incrementa i livelli di AdipoQ in pazienti obese affette da PCOS. Al contrario Ibanez et al non hanno riscontrato variazioni nei livelli di AdipoQ in pazienti trattate con etinilestradiolo e DRSP. Anche i dati sull'effetto della TOS sui livelli sierici di AdipoQ appaiono contrastanti. Sieminska et al., infatti, hanno valutato i livelli di AdipoQ in pazienti sottoposte a TOS con 1 mg di $17\beta E_2$ e 0.5 mg di noretisterone acetato (NETA) senza riscontrare variazioni significative rispetto ai controlli. Sumino et al. hanno evidenziato un incremento non significativo dei livelli di AdipoQ nel sangue di pazienti sottoposte a TOS con 0.625 mg di $17\beta E_2$ e 2.5 mg di

medrossiprogesterone acetato, dopo 3-6 cicli di terapia. Chu et al. hanno dimostrato un aumento significativo della concentrazione plasmatica di AdipoQ in pazienti con sindrome metabolica in terapia estrogenica sostitutiva (ERT) per via transdermica. Kunnari et al. al contrario, hanno dimostrato una riduzione dei livelli di AdipoQ, in pazienti isterectomizzate trattate con ERT orale, mentre non hanno osservato effetti in pazienti sottoposte a ERT transdermica.

Per chiarire gli effetti degli ormoni sessuali sui livelli di AdipoQ, recentemente, Høst et al., hanno studiato gli effetti della TOS in pazienti affette da Sindrome di Turner, caratterizzata da disgenesia gonadica con ovaie prive di attività funzionale e livelli bassissimi di estrogeni e di progesterone. Le pazienti sono state trattate con 2 mg di $17 \beta E_2$ dal 1° al 12° e dal 23° al 28° giorno del mese, e con di $17 \beta E_2$ più 1 mg di noretisterone acetato dal 12° al 22° giorno. La terapia ha determinato una riduzione della concentrazione sierica di AdipoQ totale e di AdipoQ-HMW. Sebbene le pazienti affette da Sindrome di Turner non possano essere paragonate a pazienti sane in pre- o post-menopausa i dati dimostrano un effetto inibitorio degli estrogeni esogeni sui livelli di AdipoQ in pazienti con bassi livelli di estrogeni endogeni.

I nostri dati dimostrano che i livelli di AdipoQ in donne i postmenopausa (gruppo C) e in donne fertili (gruppo F) non sottoposte a terapia, con un BMI inferiore a 30 Kg/m², non variano significativamente nell'arco di sei mesi.

Viceversa la TOS, e in particolare il progestinico utilizzato, sembrano in grado di influenzare i livelli di AdipoQ circolante. Infatti, mentre la TOS con 1 mg di 17β E₂ e 2 mg di DRSP in schema combinato continuo mantiene costanti i livelli ematici circolanti di AdipoQ, in maniera analoga a quanto si verifica in donne non trattate, la terapia con 1 mg di 17β E₂ e 0.5 mg di NETA determina una riduzione significativa di AdipoQ del 22%.

Anche nelle donne fertili i livelli di AdipoQ sono risultati significativamente superiori nelle donne trattate per 6 mesi con etinilestradiolo e DRSP (gruppo D) rispetto alle donne trattate con etinilestradiolo e DSG (gruppo E).

L'effetto può essere spiegato proprio dall'attività antimineralcorticoide del DRSP. Studi su cellule pre-adipocitarie, infatti, hanno dimostrato che l'aldosterone aumenta la trascrizione dell'mRNA del TNF α e dell'IL-6 e riduce quella di AdipoQ e PPAR γ . Gli stessi autori hanno poi verificato che il trattamento con un'antagonista dei recettori mineralcorticoidi (MR) aumenta i livelli di AdipoQ e corregge l'incremento dell'espressione di PAI-1 e di TNF α in topi db/db obesi e diabetici. Un aumento dei livelli di AdipoQ circolante è stato, inoltre, dimostrato anche in soggetti diabetici trattati con spironolattone.

In accordo con i nostri dati, dunque, potremmo ipotizzare che il DRSP incrementi i livelli di AdipoQ controbilanciando l'effetto inibitorio degli estrogeni con un effetto dose dipendente; infatti, è stato riportato che questo

effetto si perde incrementando le dosi di DRSP, probabilmente per una prevalenza dell'attività progestinica, che determina un incremento del grasso viscerale, sull'attività antimineralcorticoide.

La LEP gioca un ruolo cruciale nella pubertà, nella regolazione della funzione gonadica, nell'embriogenesi precoce e nella regolazione del metabolismo in gravidanza. I livelli di LEP variano nel corso del ciclo mestruale, con livelli più bassi in fase follicolare e più alti in fase luteale. La correlazione tra livelli di LEP e livelli di FSH, 17β .E₂ e progesterone è stata ampiamente dibattuta e sono stati riportati in letteratura risultati contrastanti. Ludvig et al non hanno osservato correlazioni tra livelli di 17β E₂ e di progesterone e concentrazioni di LEP; Fernández-Real et al hanno dimostrato che i livelli di LH correlano con le concentrazioni di LEP a metà ciclo ed in fase luteale; Cella et al. hanno riportato una correlazione positiva tra concentrazioni di LEP e livelli di 17β E₂ e progesterone e Paolissa et al. hanno dimostrato che i livelli sierici di LEP sono direttamente correlati con i livelli di 17β E₂ in donne sane normopeso; al contrario, Wunder et al non hanno osservato correlazioni tra livelli di LEP e livelli di steroidi ovarici, ma hanno riportato una correlazione significativa con i livelli di testosterone libero.

E' stato proposto che l'incremento delle concentrazioni di LEP in fase luteale sia dovuto ad un incremento dell'introito calorico. E' noto infatti che nella donna l'appetito e l'introito di cibo aumentano in fase luteale e dunque si può

ipotizzare che in questa fase gli adipociti producano una maggiore quantità di LEP. Conseguentemente, le elevate concentrazioni di LEP agiscono sull'ipotalamo regolando l'introito di cibo, ma anche il rilascio di gonadotropine e la steroidogenesi ovarica. In quest'ottica, la LEP gioca un ruolo chiave nella regolazione del ciclo mestruale. Questa ipotesi è supportata da numerosi studi che dimostrano che le irregolarità mestruali e l'amenorrea sono comuni in donne con bassi livelli di LEP. Inoltre, è stato osservato che la LEP influenza la secrezione di fattori di crescita e ormoni da parte delle cellule della granulosa e della teca ovarica.

Numerosi studi riportano una riduzione dei livelli di LEP in postmenopausa attribuibile alla caduta degli estrogeni e, almeno parzialmente, all'aumento delle concentrazioni di testosterone. Anche in questo caso, tuttavia, i dati della letteratura sono contrastanti, non riportando alcuni autori variazioni significative nelle concentrazioni di in postmenopausa rispetto ai valori premenopausali. In particolare, Tommaselli et al. hanno dimostrato che, in donne sottoposte a ovariectomia bilaterale, a 5-15 giorni dall'intervento, non si verificano variazioni nei livelli sierici di LEP.

Donne obese in post-menopausa hanno livelli sierici di LEP significativamente più elevati rispetto a donne non obese. Di Carlo et al hanno, infatti, dimostrato che le modificazioni del tessuto adiposo che si osservano durante la postmenopausa si associano ad un incremento dei livelli sierici di LEP.

Gli autori riportano altresì che l'utilizzo di TOS si associa a decremento dei livelli di LEP già a un anno. Al contrario Hadji et al. non hanno riportato variazioni significative dei livelli di LEP in pazienti sottoposte a TOS, mentre Konuoglu et al. hanno riportato un incremento di tali livelli. Analoghi dati sono riportati da Dedeoğlu et al. e da Castelo-Branco.

Riguardo poi alla terapia con contraccettivi orali, diversi studi hanno riportato che essa non determina effetti sui livelli di LEP. In donne normomestruate, infatti, la correlazione tra livelli sierici di LEP e BMI non varia con la somministrazione degli estrogeni.

Anche i nostri dati non mostrano variazioni significative dei livelli sierici di LEP in nessun gruppo, senza variazioni del peso durante la terapia. In conclusione possiamo affermare che la somministrazione di estroprogestinici non modifica i livelli sierici di LEP nè in terapia contraccettiva nè in TOS.

Riassumendo, i nostri risultati dimostrano chiaramente che la terapia contraccettiva con DRSP, in donne fertili, incrementa i livelli di AdipoQ, contrariamente alla terapia contraccettiva con DSG che non li modifica e che la TOS con DRSP, in donne sane in postmenopausa, non modifica i livelli di AdipoQ, contrariamente alla TOS con NETA, che li riduce, suggerendo un possibile effetto benefico del DRSP nella riduzione del rischio cardiovascolare.

Infatti, l'accumulo di tessuto adiposo viscerale è la componente centrale di una varietà di condizioni associate ad alto rischio cardiovascolare come la

dislipidemia, l'ipertensione, l'insulinoresistenza, e la sindrome metabolica. Tutte queste condizioni diventano più frequenti in postmenopausa suggerendo che la redistribuzione del grasso conseguente alla perdita della funzione ovarica contribuisce all'incremento del rischio cardiovascolare.

Dal nostro studio si evince, quindi, che il DRSP, potrebbe essere l'unico progestinico, attualmente disponibile, in grado di modificare positivamente il rischio cardiovascolare. È ben noto, infatti, che la somministrazione di 17β E2 migliora la funzione cardiocircolatoria e l'assetto lipidico nel post-climaterio e che questo effetto è, però, contro-bilanciato dai progestinici abitualmente in uso. L'attività anti-mineralcorticoide del DRSP appare, invece, particolarmente vantaggiosa, essendo responsabile non solo di un'attività anti-ipertensiva, ma anche della sua capacità di interagire con la sintesi di molecole pro-infiammatorie ($\text{TNF}\alpha$, IL-6), e di favorire il rilascio di AdipoQ, opponendosi, in tal modo, ai pochi effetti cardiovascolari negativi degli estrogeni.

Inoltre anche l'incremento dei livelli di AdipoQ, associato all'utilizzo di terapia contraccettiva contenente DRSP, può associarsi a notevoli benefici sul profilo cardiovascolare in donne fertili. Infatti, è ampiamente dimostrato che la terapia contraccettiva può associarsi ad uno stato di ipercoagulabilità ed allo sviluppo di trombosi venosa profonda; questo rischio è stato sempre associato alla componente estrogenica ma studi recenti hanno dimostrato che anche la componente progestinica può incrementarlo. Considerando che l'incremento dei

livelli circolanti di AdipoQ è stato associato ad un miglioramento delle disfunzioni vascolari, si può ipotizzare che l'utilizzo del DRSP in terapia contraccettiva migliori le disfunzioni endoteliali che possono verificarsi in corso della terapia stessa.

Nell'ottica di un' attenta personalizzazione delle terapie ormonali, volta all'ottimizzazione del rapporto rischi-benefici, possiamo ipotizzare che l'utilizzo di terapia contraccettiva con DRSP risulti particolarmente vantaggioso anche in giovani donne affette da obesità, PCOS o diabete che potrebbero beneficiare dei vantaggi sull'apparato cardiovascolare associati all'utilizzo di tale terapia.

Sono comunque necessari ulteriori studi per confermare i benefici di una terapia con DRSP in queste pazienti e per meglio definire il meccanismo che determina la riduzione dei livelli plasmatici di AdipoQ nelle donne trattate con altri progestinici e l'impatto a lungo termine delle terapie ormonali sui livelli di AdipoQ.



18° CONGRESSO NAZIONALE **AGUI** **1°** CONGRESSO NAZIONALE **AGIF**
CONGRESSO ANNUALE **L.A.M.M.**

OSPEDALE E TERRITORIO DEDICATI ALLA DONNA

ATTI, ABSTRACT E POSTER

27-29 settembre 2010
Melià Roma Aurelia Antica
Roma

Presidente
Massimo Moscarini



Abstract P.12

EFFETTI DEL DROSPIRENONE SUI LIVELLI DI ADIPONECTINA SIERICA IN DONNE FERTILI CHE ASSUMONO CONTRACCETTIVO ORALE

Fabozzi Annamaria^[1], De Rosa Nicoletta^[1], Santoro Romina^[1], Di Carlo Costantino^[1], Tommaselli Giovanni Antonio^[1], Sparice Stefania^[1], Gargano Virginia^[1], Nappi Carmine^[1]

- ^[1]Dipartimento di Scienze Ostetrico Ginecologiche, Urologiche e Fisiopatologia della Riproduzione, Università degli Studi di Napoli "Federico II". ~ Napoli

L'obiettivo di migliorare la tollerabilità dei contraccettivi orali (CO) è stato in parte realizzato con l'individuazione di un nuovo progestinico, il Drospirenone (DRSP), dotato di attività anti-mineralcorticoide. Questa proprietà potrebbero proteggere dall'incremento ponderale, dalla ritenzione idrica e dell'aumento della pressione arteriosa (PA) che si osservano nelle donne che utilizzano CO con progestinici diversi dal DRSP. Tale attività modulerebbe la secrezione di adiponectina (AdipoQ), citochina antinfiammatoria prodotta dagli adipociti, i cui livelli si riducono all'aumentare del tessuto adiposo viscerale. L'attivazione del recettore per i mineralcorticoidi (MR) riduce sensibilmente la secrezione di tale citochina che esercita un impatto favorevole sui profili lipidico e sull'apparato cardiovascolare. L'azione anti-MR del DRSP potrebbe in parte contrastare questa riduzione.

L'obiettivo dello studio è valutare i livelli di AdipoQ, il peso corporeo e la PA di pazienti utenti di CO contenente DRSP rispetto a pazienti utenti di CO contenente Desogestrel (DSG).

Abbiamo effettuato uno studio longitudinale, prospettico, su 80 donne di età < 35 anni, BMI < 25 Kg/m² e rapporto circonferenza vita-fianchi (CV/CF) < 0,8. Le pazienti sono state randomizzate in tre gruppi: etinilestradiolo (EE) 20 mcg/DSG 150 mcg, n= 30; EE 0,020 mg/DRSP 3 mg, n= 30; nessun CO, n= 20. Al tempo 0 e sei mesi dal reclutamento, è stato effettuato un prelievo di sangue venoso per la determinazione dell'AdipoQ sierica, è stata registrata la PA, sono stati calcolati BMI e CV/CF.

Dopo sei mesi l'AdipoQ è risultata aumentata del 43,2% nel gruppo-DRSP, diminuita dello 0,96% nel gruppo-DSG, aumentata del 2,1% nei controlli. BMI, CV/CF e PA diastolica non hanno presentato significative variazioni nei tre gruppi. La PA sistolica (PS) è risultata invece significativamente aumentata, dopo 6 mesi di trattamento, nel gruppo-DSG (T0 media= 107,8 ± 6,3 mmHg; T1 media= 120,7 ± 3,4 mmHg; p < 0,05). Inoltre, nello stesso gruppo la PS è risultata significativamente maggiore rispetto al gruppo-DRSP (T1 media= 107,1 ± 7,5 mmHg; p < 0,05). Nessuna variazione significativa ha presentato la PS nei controlli.

I livelli aumentati di AdipoQ sierica nel gruppo ricevente DRSP sarebbero da attribuire all'attività anti-MR di tale molecola, e ad una riduzione del tessuto adiposo. Tale attività, attraverso la minore ritenzione idrica, sarebbe altresì responsabile del mancato aumento della PS nel gruppo-DRSP rispetto al gruppo-DSG.

L.a.m.m.



AGIF
Associazione Ginecologi
Italiani in Formazione

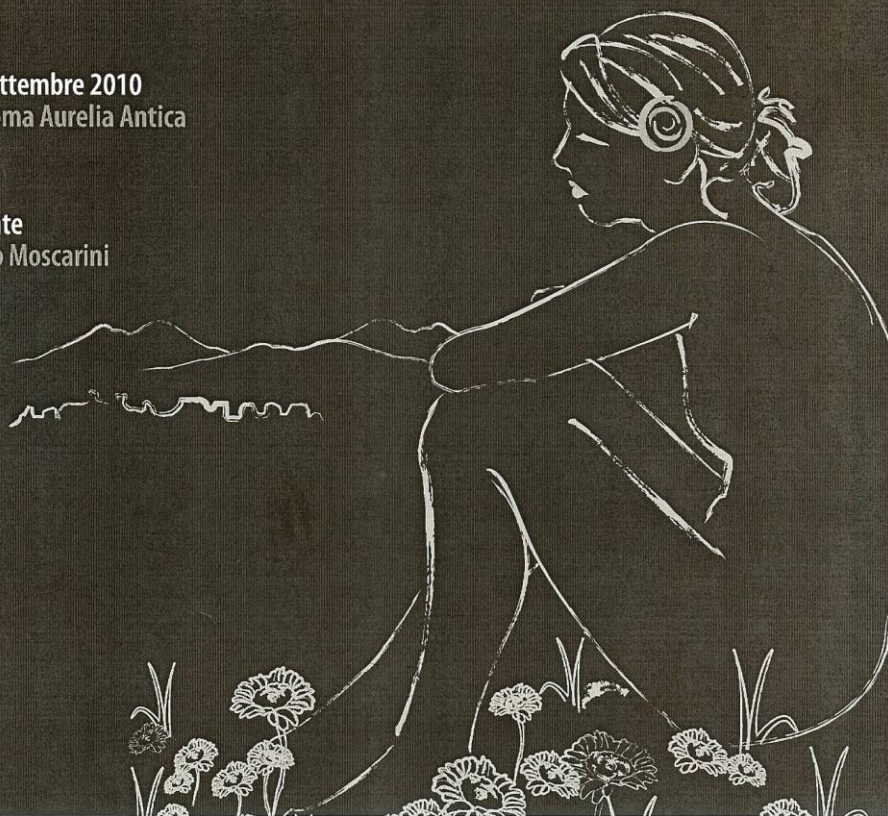
18° CONGRESSO NAZIONALE AGUI 1° CONGRESSO NAZIONALE AGIF
CONGRESSO ANNUALE L.A.M.M.

OSPEDALE E TERRITORIO DEDICATI ALLA DONNA

ATTI, ABSTRACT E POSTER

27-29 settembre 2010
Melià Roma Aurelia Antica
Roma

Presidente
Massimo Moscarini



EFFETTI DI DIVERSI PROGESTINICI SUI LIVELLI SIERICI DI ADIPOCHINE IN POST-MENOPAUSA.

De Rosa Nicoletta*^[1], Fabozzi Annamaria^[1], Santoro Romina^[1], Di Carlo Costantino^[1], Tommaselli Giovanni Antonio^[1], Sparice Stefania^[1], Gargano Virginia^[1], Nappi Carmine^[1]

- ^[1]Dipartimento di Scienze Ostetrico Ginecologiche, Urologiche e Fisiopatologia della Riproduzione, Università degli Studi di Napoli "Federico II". ~ Napoli

In menopausa si osservano una redistribuzione del grasso sottocutaneo verso le aree viscerali e modificazioni a carico del metabolismo basale e della spesa energetica. Questi fenomeni hanno un impatto importante sulla qualità di vita della donna comportando un incremento di morbilità e mortalità cardiovascolare. L'adipocita è secerne due molecole chiave nel controllo del peso corporeo e del rischio cardiovascolare: la leptina (LEP) e l'adiponectina (AdipoQ). LEP regola il peso corporeo, favorendo il dispendio energetico e riducendo l'introito calorico. AdipoQ ha effetti insulino-sensibilizzante, anti-infiammatorio, anti-aterogeno, e cardioprotettivo.

Scopo di questo studio è valutare gli effetti di diversi progestinici, utilizzati in schemi di terapia ormonale sostitutiva combinata (HRT), sui livelli sierici di adipochine nel sangue di donne in post-menopausa.

Trenta pazienti, tra i 48 ed i 55 anni di età, non fumatrici, con IMC < 30, in menopausa spontanea da 12-24 mesi, afferenti al Centro per la Menopausa e la prevenzione dell'osteoporosi post-menopausale del nostro Dipartimento, sono state arruolate in uno studio longitudinale, prospettico randomizzato. La popolazione in studio, è stata così suddivisa: Gruppo A (N=10) HRT 2 mg di DRSP e 1mg di E2; Gruppo B: (N=10) HRT 0.5 mg di NETA e 1mg di E2; Gruppo C: (N=10) donne non trattate. Sono stati dosati i livelli plasmatici basali di AdipoQ e di LEP prima del trattamento, e dopo 6 cicli di terapia.

Nel gruppo C, al controllo semestrale, non si evidenziano significative modificazioni nei livelli di AdipoQ e di LEP. Nel gruppo A i livelli di AdipoQ (9,64±4,18 µg/ml vs 9,46±4,41 µg/ml) e di LEP (10,79±5,90 ng/ml vs 12,96±7,82 ng/ml) non variano dopo 6 cicli di terapia. Nel gruppo B i livelli basali di AdipoQ si riducono significativamente dopo 6 cicli di terapia (11,37±6,17 µg/ml vs 8,93±6,15 µg/ml p<0,05; IC 95%) mentre i livelli basali di LEP non mostrano variazioni significative (16,93±15,38 ng/ml vs 16,26±16,26 ng/ml).

La HRT, ed in particolare il progestinico utilizzato, possono influenzare i livelli di AdipoQ circolante. La mancata riduzione di AdipoQ sierica nel gruppo A rispetto al gruppo B può essere attribuita all'attività antimineralcorticoide del DRSP. Studi su cellule pre-adipocitarie hanno dimostrato che l'aldosterone riduce la trascrizione di AdipoQ. Sulla base di tali risultati la HRT con DRSP sembrerebbe più indicata nelle pazienti con un rischio maggiore per patologia cardiovascolare

Capitolo 3

Progetto di ricerca: Terapie ormonali e metabolismo osseo.

Tra i benefici non contraccettivi derivanti dall'uso di estro-progestinici orali è stata spesso ipotizzata una protezione verso la riduzione della densità minerale ossea (BMD): gli ormoni sessuali svolgono un ruolo chiave nella modulazione del metabolismo osseo durante tutta la vita di una donna, anche se il loro meccanismo d'azione resta, per certi aspetti, ancora da chiarire.

Molti studi hanno dimostrato che una grave carenza di estrogeni si traduce in una diminuita massa ossea e che in donne con uno stato di ipoestrogenismo si verifica un aumento della densità minerale ossea in seguito al trattamento con contraccettivi orali.

EFFETTI DEGLI ESTROGENI SULL'OSSO

Fino al 1988 si riteneva che gli estrogeni influenzassero il tessuto osseo solo indirettamente, regolando la secrezione di ormoni calciotropici. Oggi è invece assodato che osteoblasti, osteoclasti ed osteociti esprimono recettori funzionali per gli estrogeni. Esistono due tipi di recettori per gli estrogeni, ER α ed ER β . Nelle cellule del tessuto osseo sono espressi entrambi i tipi di recettore con una distribuzione differente: infatti studi immunohistologici hanno dimostrato che ER α è maggiormente presente nell'osso corticale ed ER β nell'osso trabecolare. Si

sono effettuati diversi studi su topi knock-out per il recettore ER α (topi AERKO) del recettore ER β (topi BERKO) e di entrambi i tipi recettoriali (topi DERKO). Da questi studi si è dedotto che i recettori ER α mediano la maggior parte degli effetti degli estrogeni sull'osso ed in particolare la formazione estrogeno-dipendente del tessuto osseo: questo processo infatti si arresta nei topi AERKO e DERKO ma non nei topi BERKO. I recettori ER β potrebbero invece avere un ruolo permissivo nei confronti della perdita di massa ossea età correlata nella donna fungendo, in alcune circostanze, da antagonisti dominanti negativi sui recettori ER α . Si è visto, infatti, che la delezione di ER β porta ad un aumento della sensibilità dei recettori ER α e, di conseguenza, ad un aumento dell'azione estrogenica anche con bassi valori ormonali. Ad ogni modo, l'azione degli estrogeni sul tessuto osseo si esplica a vari livelli. Tali ormoni, infatti, promuovono l'assorbimento intestinale di calcio ed il riassorbimento di calcio a livello renale aumentando la conversione della vitamina D a 1,25-diidrossivitamina D. Inoltre, gli estrogeni influenzano il rimodellamento osseo, che è il processo di periodico rimpiazzo del tessuto osseo vecchio con tessuto osseo nuovo che porta alla completa rigenerazione dello scheletro adulto ogni dieci anni.

Le cellule coinvolte in questi processi sono essenzialmente gli osteoclasti e gli osteoblasti: gli osteoclasti sono deputati al riassorbimento osseo, gli osteoblasti alla neoformazione del tessuto osseo. Questi due processi non sono tuttavia

separati e indipendenti: infatti nello scheletro adulto osteoclasti e osteoblasti fanno parte di un'unica struttura temporanea chiamata unità multicellulare di base (BMU). Le BMU sono lunghe circa 1-2 mm e larghe circa 0,2-0,4 mm e sono costituite da un pool di osteoclasti anteriormente, un pool di osteoblasti posteriormente, un vaso centrale, una terminazione nervosa e tessuto connettivo. Negli adulti sani si formano 3-4 milioni di BMU all'anno e in ogni momento sono attive circa 1 milione di BMU.

Il processo di rimodellamento osseo ha inizio con la contrazione delle cellule di rivestimento dell'osso ed il reclutamento dei precursori osteoclastici. Questi precursori si fondono a formare osteoclasti attivi, multinucleati, che mediano il riassorbimento osseo. Il riassorbimento mediato dagli osteoclasti ha luogo in spazi irregolari (lacune di Howship) dove gli osteoclasti sono saldamente attaccati, attraverso una specifica integrina ($\alpha v \beta 3$), a componenti della matrice ossea come ad esempio l'osteopontina. Questa zona di adesione degli osteoclasti all'osso prende il nome di zona chiara e contiene filamenti di actina. Invece la zona deputata al riassorbimento osseo è il cosiddetto orletto rugoso, un complesso sistema di proiezioni digitiformi della membrana che contiene una serie di proteine, compresa una pompa protonica ATP-dipendente, che contribuiscono alla realizzazione dell'ambiente acido che solubilizza la componente minerale dell'osso. Gli osteoclasti dunque aderiscono al tessuto osseo e lo rimuovono per acidificazione e digestione proteolitica. Man mano che

la BMU avanza gli osteoclasti lasciano il sito di riassorbimento e gli osteoblasti vanno a rivestire le aree scavate dagli osteoclasti iniziando il processo di neoformazione ossea attraverso la produzione di matrice osteoide, che viene poi mineralizzata all'interno dell'osso neoformato. Dopo la mineralizzazione dell'osteide, gli osteoblasti si appiattiscono e formano uno strato di cellule allineate sopra il nuovo tessuto osseo. Gli estrogeni deprimono questo processo di rimodellamento e mantengono bilanciati i processi di riassorbimento e neoformazione del tessuto osseo.

L'aumento del tasso di rimodellamento osseo può essere spiegato dall'evidenza, derivata soprattutto dagli studi sui topi, che la perdita degli estrogeni incrementa la formazione degli osteoclasti e degli osteoblasti nel midollo osseo incrementando la produzione e l'attività delle citochine coinvolte nei processi di osteoblastogenesi ed osteoclastogenesi. Ad esempio gli estrogeni inibiscono la produzione di interleuchina 6 (IL-6), una citochina coinvolta nell'attivazione degli osteoclasti, nonché l'espressione delle due subunità del suo recettore, IL-6R e gp130. Infatti diversi studi hanno dimostrato che l'espressione di IL-6, IL-6R e gp130 nel midollo osseo e nel sangue periferico di topi, ratti e uomini deficitari di estrogeni è elevata e che i topi deficitari di IL -6 sono protetti dalla perdita di tessuto osseo da deprivazione estrogenica. A testimonianza dell'attivazione degli osteoclasti mediata dall' IL-6, si è riscontrata un'aumentata produzione locale e sistemica di questa citochina e del suo recettore in altre condizioni associate ad

elevato riassorbimento osseo come il mieloma multiplo, il morbo di Paget, l'artrite reumatoide, l'ipertiroidismo, l'iperparatiroidismo primario e secondario e la sindrome di McCune Albright. Il deficit di estrogeni causa inoltre, sempre a livello dell'osso, l'aumento delle citochine proinfiammatorie interleuchina 1 (IL-1) e fattore di necrosi tumorale (TNF), del fattore che stimola le colonie di macrofagi (M-CSF), e della prostaglandina- E_2 (PGE_2). Tutte queste citochine incrementano il riassorbimento osseo principalmente incrementando il pool di precursori degli osteoclasti nel midollo osseo. A causa inoltre dell'interdipendenza della produzione di IL-1, IL-6, e TNF, un incremento di una di queste citochine può amplificare con un meccanismo a cascata gli effetti delle altre.

Il calo degli estrogeni si accompagna inoltre ad una diminuita produzione di fattore di crescita trasformante β (TGF- β), un inibitore del riassorbimento osseo che agisce direttamente sugli osteoclasti deprimendone l'attività.

L'aumento del rimodellamento osseo causato dall'incremento dell'osteoblastogenesi e dell'osteoclastogenesi, causa un'accelerazione della perdita di tessuto osseo mineralizzato, perché il riassorbimento è più veloce della neoapposizione e i siti di riassorbimento osseo si estendono oltre la capacità degli osteoblasti di apporvi nuovo tessuto.

La perdita di massa ossea si accompagna ad un'aumentata fuoriuscita di calcio dai siti scheletrici che viene bilanciata da un aumento dell'escrezione urinaria di calcio e da una riduzione del suo assorbimento a livello intestinale.

Gli estrogeni promuovono l'apoptosi degli osteoclasti *in vitro* e *in vivo* tramite TGF β . In contrasto con l'effetto proapoptotico sugli osteoclasti, gli estrogeni esercitano un'azione antiapoptotica su osteoblasti ed osteociti, e dunque il deficit di estrogeni provoca una riduzione della sopravvivenza media di queste cellule. L'aumentata sopravvivenza degli osteoclasti e la contemporanea ridotta sopravvivenza degli osteoblasti, spiega lo squilibrio tra riassorbimento e neoapposizione di tessuto osseo che si crea in situazioni di deficit estrogenico.

IL PICCO DI MASSA OSSEA

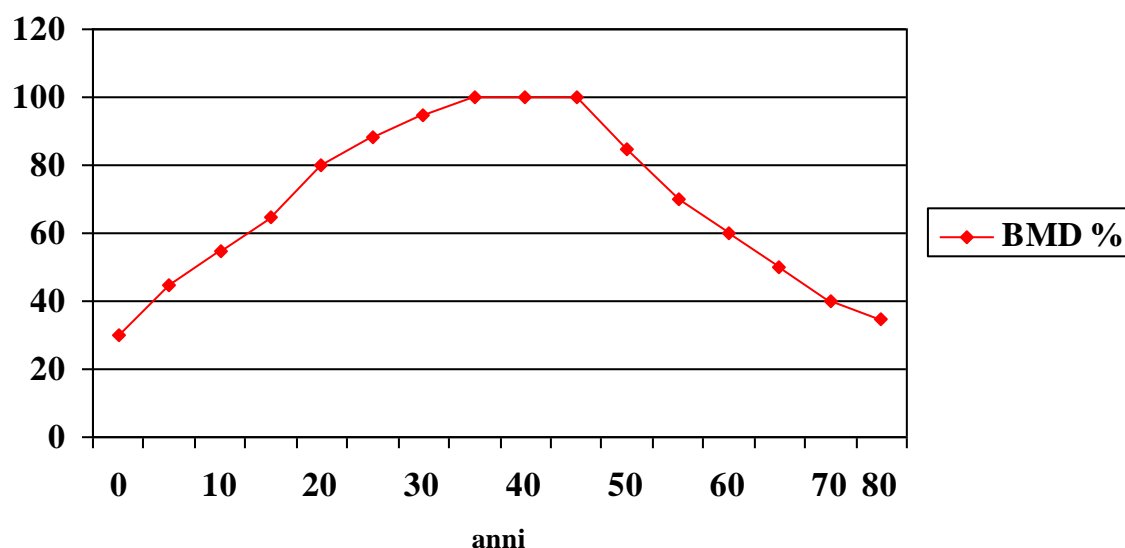
La densità minerale ossea raggiunta durante gli anni che precedono la menopausa è una dei maggiori determinanti del rischio di insorgenza dell'osteoporosi nella donna anziana ed una bassa massa ossea rappresenta il più importante fattore di rischio (incide per l'80% circa) nel determinare il rischio di frattura.

Il picco di massa ossea rappresenta il valore di massima densità minerale ossea raggiunta in età giovane-adulta. Da recenti studi è emerso che la maggior parte del contenuto minerale osseo dello scheletro viene acquisito nei primi dieci anni di vita, all'età di 18 anni la massa ossea totale rappresenta l'80% del picco di massa ossea, il restante 20% viene acquisito fino all'età di 35 anni. I valori di densità minerale ossea, dopo la fase di plateau (che dura dai 35 ai 45 anni)

presentano nelle donne una riduzione annua che oscilla dall'1,5% al 2%, raggiungendo poi anche valori del 5% nel periodo post-menopausale (Fig. 1).

L'assetto ormonale, le alterazioni della distribuzione del carico osseo e i fattori riguardanti lo stato nutrizionale e lo stile di vita rappresentano i tre principali determinanti del picco di massa ossea premenopausale.

Figura 1. Variazioni età-correlate della BMD



Costituendo il quadro ormonale uno dei principali fattori coinvolti nel determinismo del picco di massa ossea e della BMD raggiunti negli anni premenopausali, i contraccettivi ormonali potrebbero svolgere un ruolo chiave nella costituzione e nella preservazione dell'assetto scheletrico, garantendo un apporto estrogenico costante durante l'intero periodo di assunzione.

COCs E METABOLISMO OSSEO

Il trattamento con contraccettivi orali combinati (COCs) provoca una diminuzione della secrezione ormonale ovarica tramite un'azione inibitoria a livello dell'asse ipotalamo-ipofisario.

Non è stato ancora completamente definito se l'influenza sul metabolismo osseo e sulla densità minerale ossea del deficit di steroidi ovarici provocato dall'assunzione della pillola possa essere completamente annullata dagli effetti delle componenti estrogenica e progestinica dei COCs.

In corso di trattamento con contraccettivi orali combinati a basso dosaggio (<50 µg), i livelli plasmatici di 17β-estradiolo sono sovrapponibili a quelli riscontrati in fase follicolare precoce mentre è stato osservato un incremento dei livelli plasmatici di sex hormon-binding globulin (SHBG), il che suggerisce la presenza di un clima estrogenico.

Sono stati descritti effetti benefici o effetti nulli dei contraccettivi orali combinati sulla densità minerale ossea in donne in pre-, peri- e postmenopausa.

Questa discrepanza emersa dai vari studi potrebbe essere ricondotta alla diversità dei COCs impiegati, al tipo di progestinico, alla durata di utilizzo della pillola, all'età della popolazione presa in esame e alle sedi di valutazione della BMD.

In particolare, il principale fattore influenzante i risultati potrebbe essere rappresentato dal dosaggio della componente estrogenica. Infatti, i risultati di

molteplici studi clinici hanno dimostrato la sussistenza di un effetto dose-risposta strettamente correlato alle proprietà benefiche dell'estrogeno sull'osso.

Mentre appare chiara la correlazione diretta tra dosaggio dell'estrogeno esogeno e prevenzione della perdita di massa ossea nell'ambito della terapia ormonale sostitutiva nelle donne in postmenopausa, non è stato ancora definito se tale effetto può essere esplicito anche dai contraccettivi orali combinati a basso dosaggio nelle donne in età riproduttiva.

Nelle ultime tre decadi, il principale obiettivo nello sviluppo dei contraccettivi orali è stato quello di migliorare il loro profilo di sicurezza e di tollerabilità, senza compromettere la loro efficacia. La ricerca farmacologica ha condotto alla formulazione di regimi fasici, di preparati con dosaggi inferiori di estrogeno e di nuove molecole progestiniche.

Il dosaggio dell'etinilestradiolo (EE) nelle formulazioni estroprogestiniche è passato da 50 a 20-15 µg.

Assodato che gli estrogeni esplicano un'azione protettiva a livello osseo, negli ultimi anni molti studi clinici e sperimentali hanno focalizzato l'attenzione sul ruolo esercitato dalla componente estrogenica dei contraccettivi orali combinati sull'assetto scheletrico e sull'individuazione della minima dose di estrogeno necessaria per mantenere tale azione favorevole sull'osso.

È stato dimostrato che i contraccettivi combinati a basso dosaggio contenenti 20 µg di etinilestradiolo, oggi ampiamente utilizzati, non hanno un

impatto negativo sul metabolismo osseo e sulla BMD nelle donne giovani, mentre attualmente non abbiamo a disposizione dati riguardanti l'effetto dei COCs a bassissimo dosaggio contenenti una concentrazione di etinilestradiolo pari a 15 µg.

Allo stesso modo, solo pochi studi sono stati rivolti a valutare gli effetti delle diverse tipologie di progestinici sul metabolismo osseo e sulla massa ossea in donne fertili utilizzatrici di contraccettivi orali, fornendo risultati contrastanti.

“Effects of an oral contraceptive containing estradiol valerate and dienogest on bone metabolism and bone mineral density: an observational study”.

Submitted (Gynecological Endocrinology)

Costantino Di Carlo[§], Virginia Gargano, **Stefania Sparice**, Giuseppe Bifulco, Giovanni A Tommaselli, Daniela Schettino, Carmine Nappi

Department of Obstetrics and Gynecology, University of Naples Federico II, Via Pansini 5, Italy

[§] Corresponding author

Email addresses:

CDC: costantino.dicarlo@unina.it

VG: virginiagargano@tiscali.it

SS: sparice@katamail.com

GB: giuseppe.bifulco@unina.it

GAT: gtommaselli@yahoo.it

DS: danielaschettino@virgilio.it

CN: nappi@unina.it

ABSTRACT

Background: Aim of this study was to evaluate the effects of combined dienogest/estradiol (DNG/E2V) valerate contraceptive pill on bone mineral density (BMD) and on serum and urinary bone turnover markers in young, healthy, fertile women.

Methods: We enrolled 20 patients between 21 and 34 years to whom the contraceptive pill had been prescribed. At 3 and 6 months serum and urinary calcium, osteocalcin (BGP), urinary pyridinoline (PYD), and deoxypyridinoline (D-PYD) were measured. At baseline and after 6 months, lumbar bone mineral density was determined by dual-energy X-ray absorptiometry (DEXA).

Results: At 3 and 6 months we found a significant reduction of urinary levels of PYD and D-PYD in comparison with basal values ($P < .05$).

Serum calcium levels showed an increasing trend, which reached statistical significance after 6 months in comparison with basal values while urinary levels of calcium showed no significant variations.

Serum BGP levels showed mild, but not significant, decrease during the entire period of pill use in comparison with basal values.

After 6 months, no significant difference was detected in spinal BMD values in comparison with basal values. In conclusion, the present study suggests that the

E2V/DNG pill could exert a positive influence on bone turnover without any significant and remarkable modification of BMD.

Conclusions: This is an observational study on a very limited population number and so additional randomized controlled studies on larger populations are needed also to determine the effects of this contraceptive on BMD over longer periods of use.

Keywords: Contraception, dienogest, estradiol valerate, bone metabolism, bone mineral density

Background

Bone is a metabolically active tissue and undergoes continuous remodeling process that largely relies on the activity of osteoclasts and of osteoblasts. The bone remodeling cycle involves an intricate series of sequential steps with a highly complex regulation in which a pivotal role is played by sex steroids. In particular it has been largely demonstrated that estrogens are major determinants of bone mass, affecting the acquisition of peak bone mass during adolescence and young adult age and modulating bone mineral density (BMD) and the risk of osteoporosis later in life. Hormonal contraceptives induce a reduction of estrogen and a suppression of progesterone endogenous production by the ovaries. In

women taking hormonal contraceptives, circulating levels of sex steroids are mainly determined by the dosages present in the contraceptive formulation. If the formulation of the contraceptive is insufficient to grant adequate sex steroids levels, bone tissue metabolism might be affected. Many studies in literature investigated on the effects of hormonal contraceptives on bone with different results. Our group recently performed a systematic review of the data about the effects of different hormonal contraceptive formulations on BMD and fracture risk concluding that according to results derived from randomized controlled studies the use of combined oral contraceptives (COCs) does not exert any clinically significant effect on BMD in the general population. However data reported in literature are often extremely controversial. This is probably due to different studies design, duration of pill use, difference in methods of BMD assessment and in population characteristics.

In particular it's important to underline that different doses of estrogen and different progestins could exert different effects on bone metabolism. Therefore in the past years our group performed several studies about the effects of COCs on bone metabolism and particularly about the effects of different doses of estrogen and different progestins.

In 2009, a new quadriphasic oral contraceptive has been introduced in Italy. The 28-tablet pack of this new contraceptive (Klaira, Bayer, Italy) contains 2 tablets containing 3 mg of estradiol valerate (E2V), 5 tablets containing 2 mg of E2V

and 2 mg of dienogest (DNG), 17 tablets containing 2 mg of E2V and 3 mg of DNG, 2 tablets containing 1 mg of E2V, and 2 inert tablets. E2V is immediately cleaved to estradiol after oral intake: so the circulating molecule reaching the estrogen receptors is the natural 17β -estradiol [9]. DNG is chemically described as (17 β)-17-hydroxy-3-oxo-19-norpregna-4,9-diene-21-nitrile and it is structurally related to the norethindrone family but acts as an antiandrogen; it has been designed to specifically bind to the progesterone receptor without any interaction with other steroid receptors.

Studies in literature demonstrated that the association DNG/E2V guarantees a good cycle control in absence of important sides effects.

However no data are available in literature about the influence of this pill on bone metabolism.

Aim of this study was to evaluate the effects of this combined DNG/E2V contraceptive pill on BMD and on serum and urinary bone turnover markers in young, healthy, fertile women.

As in our previous studies, the control group, which included untreated women, did never show any significant changes in bone turnover markers and in BMD, in the present study we decided to utilize an observational design, limiting our evaluation to a group of treated subjects.

Methods

Participants

From January 2011 to July 2011, we evaluated all patients between 21 and 34 years (because peak total body BMD in most women is achieved by age 20) referring to our clinic for contraception to whom Klaira had been prescribed. Patients were included in this observational study if they met the following inclusion criteria: age of menarche between 12 and 14 years, regular menstrual cycle, BMI < 25 and normal caloric intake. Exclusion criteria were: confirmed or suspected pregnancy, pregnancy or breastfeeding in the previous year, liver disease, vascular or metabolic disorders, disorders of bone metabolism (Paget disease, hyperparathyroidism, renal osteodystrophy), treatment with drugs known to affect bone metabolism (bisphosphonates, sodium fluoride, calcitonin, estroprogestins or anabolic steroids, corticosteroids, calcium or vitamin D, phosphate, thiazidic diuretics) or drugs known to interfere with contraceptive steroids (barbiturates, antiepileptics, rifampicine, griseofulvin), current cigarette smoking. Obviously, all other relevant contraindication for the use of COCs were considered exclusion criteria. Before entering the study, the purpose of the protocol was clearly explained to the patients and a written informed consent was obtained from all women enrolled. The study was approved by our institutional review board.

Before inclusion, we collected a complete medical and gynecological history from all patient. Moreover, in accordance to our Department routine, all patients had undergone Pap-test, bimanual pelvic examination, evaluation of systolic and diastolic pressure and calculation of body mass index (BMI) before the prescription of oral contraceptives. A total of thirty-eight women were evaluated, until 20 met all inclusion criteria and agreed to participate to the study.

A fully informed signed consent was obtained from all subjects.

All patients were instructed to start pill intake from the first day of the next spontaneous menses for 28 days and to start a new blister after the last pill of previous blister, without interruption. At 3 and 6 months serum and urinary calcium, osteocalcin, urinary pyridinoline and deoxypyridinoline were measured. At baseline and after 6 months, lumbar bone mineral density was determined by dual-energy X-ray absorptiometry (DEXA).

Biochemical evaluation

In all patients we evaluated indices of bone resorption (levels of serum and urinary calcium, pyridinoline, and deoxypyridinoline) and formation (osteocalcin, BGP). Blood and urine samples were collected upon awaking between 8:00 and 9:00 a.m. after a 12-h fast. Blood samples collected in tubes with clot-activating factor were immediately centrifuged in a refrigerated centrifuge. Sera were stored at -80°C until assayed. Urine samples were stored at

-20°C until biochemical analysis. All samples from the same woman were analyzed in the same assay and were analyzed in a laboratory blinded to the treatment. Serum and urinary levels of calcium were analyzed as a part of the biochemical routine evaluation (complete blood count, aspartate aminotransaminase, alanine aminotransferase, creatinine, glucose, blood urea nitrogen, urinalysis, fibrinogen, prothrombin time and activated partial thromboplastin time). The levels of PYD and D-PYD were measured with specific monoclonal antibodies (Metra Biosystem; Mountain View, CA, USA) and were expressed as values over the urinary creatinine. BGP was measured by radioimmunoassay (Nichols Institute Diagnostic, San Clemente, CA, USA). In each subject, blood and urine samplings were measured at beginning of the study and after 3 and 6 months. At the end of the study, BMI was calculated for each patient.

Determination of body mineral density

Quantitative longitudinal changes of bone mineral density were determined by dual X-ray absorptiometry (DEXA QDR 1000; Hologic, Waltham, MA) of the posterior-anterior lumbar spine (L1–L4). The precision of the measurements, expressed as coefficients of variation (CV) in vitro for repeated bone mineral density determinations in 2 standard phantoms, was 0.42%. The CV in vivo, evaluated by comparing 2 measurements performed at 7-day intervals in 33

volunteers, was 1.2% for the lumbar spine. The reference population adopted in this study was the international pooled sample provided by the manufacturer. Their data, however, did not differ significantly from those obtained on a local sample in a study performed when the instrument was set up.

Bone mineral content (g/cm) was divided by bone width (cm) to give an index (g/cm²) that was used to standardize the findings for bone size. The absorptiometry was performed by the same observer. Absorptiometric findings are expressed as percentage of change from baseline values. Baseline scans were performed during the third to seventh day of the pretreatment cycle. DEXA was performed at baseline and after 6 months of treatment.

Statistical evaluation

The Shapiro–Wilk test showed that all continuous variables were normally distributed in our study group. Variations in BMD and biochemical data at different times were statistically evaluated by two-way analysis of variance followed by the Newman–Keuls multiple-range test. Interaction between factors (treatment and time) was also evaluated. Statistical analysis was performed with SPSS 9.0 (SPSS Inc, Chicago, IL, USA). Statistical significance was set at $p < .05$. Data are expressed as mean \pm SD.

Results

Among the 20 women selected for the study, 18 completed the study. One patient discontinued the treatment for personal reasons and one for irregular bleeding.

In Table 1, the baseline characteristics of the subjects studied are listed.

Serum calcium levels showed an increasing trend, which reached statistical significance after 6 months in comparison with basal values. Urinary levels of calcium showed no significant variations.

At 3 and 6 months we found a significant reduction of urinary levels of PYD and D-PYD in comparison with basal values ($P < .05$) (Figures 1 and 2).

Serum BGP levels showed a not significant decrease during the study in comparison with basal values (Figure 3).

After 6 months, no significant difference was detected in spinal BMD values in comparison with basal values (Table 2). No significant changes in BMI were observed over the 6-months study period.

Discussion

Data from this study seem to suggest that contraception with E2V and DNG exert a positive effect on bone turnover in young postadolescent women, without any significant modification of BMD.

This conclusion is in agreement with results of previous studies performed on other oral contraceptives by our group. Indeed in a previous study, we have

shown that both a low-dose, 21-day combined oral contraceptive containing 20 mcg of ethinylestradiol and 75 mcg of gestodene and an ultra-low-dose, 24-day combined oral contraceptive containing 15 mcg of ethinylestradiol and 60 mcg of gestodene exert a similar positive effect on bone turnover in young postadolescent women, without any significant modification of BMD. We also evaluated the effects of a 21-day combined oral contraceptive containing 30 mcg ethinyl estradiol plus 3 mg drospirenone with a 21-day preparation containing 20 mcg ethinyl estradiol plus 3 mg drospirenone on bone turnover and BMD in young fertile women finding a similar positive influence on bone turnover in young postadolescent women without a significant influence on BMD.

Data from a systematic review recently performed by our group suggest that the use of COCs does not exert any clinically significant effect on BMD in the general population.

This is the first clinical study in literature on the effects of E2V and DNG on bone metabolism. The main limit of this study is that primary endpoint was not risk of fracture but variation of BMD and bone turnover markers, since it is very difficult and time consuming to perform a trial having as first endpoint the incidence of fracture. Moreover, since fragility fractures are rare in young people, fracture is not usually an outcome in studies on premenopausal women. The use of BMD as a surrogate marker of bone health is justified by the World Health Organization (WHO) who recommends using this measurements to screen for

osteoporosis postmenopausal women, but the relationship between BMD and fracture risk in premenopausal women, including those using hormonal contraceptives, is still poorly understood.

Moreover, studies on the effects of COCs on BMD are complicated by the influence on BMD by many factors such inheritance, diet, exercise and smoking.

In order to minimize these confounding factors, we considered cigarette smoking as an exclusion criteria and selected a population having a normal caloric intake.

Biochemical markers of bone resorption evaluated in our trial included urinary PYD and D-PYD, serum BPG and serum and urinary calcium. PYD and D-PYD are the two major cross-link molecules involved in collagen stabilization. Bone collagen undergoes a higher rate of turnover than other sources of collagen. Thus, the measurement of these molecules provides a highly specific and sensitive marker for bone resorption. An increased bone resorption uncoupled with bone formation is associated with an increased calcium passage from the solid phase into the extracellular fluid. This results in a rise of serum calcium and calcium excretion.

Serum BGP has been measured as a marker of bone formation. BGP is the most abundant noncollagenous protein in bone and is produced almost exclusively by osteoblasts. Serum BGP concentration, therefore, is a sensitive marker of bone formation that correlates with histomorphometric measurements of bone formation in bone biopsy specimens.

In this study we observed a significant decrease of PYD and D-PYD starting from the third month of treatment, indicating a reduction in bone resorption.

Although these differences may not have a real clinical relevance, they at least suggest the lack of a negative biological effect of this contraceptive formulations on bone turnover. Moreover, only a mild, non significant decrease in serum levels of BGP was observed in comparison to basal values, indicating that bone formation was not negatively affected by treatment.

Increased serum calcium levels, reaching statistically significant levels after 6 months of treatment, were observed. Urinary calcium excretion decreased in both treatment groups, but these changes were not significant.

Conclusions

The present study suggests that the E2V/DNG pill could exert a positive influence on bone turnover without any significant and remarkable modification of BMD. This is an observational study on a very limited population number and so additional randomized controlled studies on larger populations are needed also to determine the effects of this contraceptive on BMD over longer periods of use. Moreover, since recent evidence seems to suggest that oral contraceptives may exert different effects in adolescent or perimenopausal women, it would be interesting also to include these populations in future studies.

List of abbreviations:

BGP: osteocalcin

BMD: bone mineral density

DEXA: dual energy X-Ray absorptiometry

DNG: dienogest

D-PYD: urinary deoxypyridinoline

E2V: estradiol valerate

PYD: urinary pyridinoline

Competing interests:

The authors declare that they have no competing interests.

Authors' contributions:

CDC designed the study, interpreted the data, revised the manuscript and give final approval of the version to be published; VG interpreted the data and drafted the manuscript;

SS enrolled the patients and helped to draft the manuscript;

GB performed statistical analysis and prepared tables and figures; GT performed statistical analysis and helped to draft the manuscript; DS performed biochemical evaluation; CN interpreted data, revised the manuscript and give final approval

of the version to be published. All authors read and approved the final manuscript.

References

1. Fabbri G, Petraglia F, Segre A, Maietta-Latessa A, Galassi MC, Cellini M, Sardelli S, Massolo F, Genazzani A, Genazzani AR: Reduced spinal bone density in young women with amenorrhea. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol* 1991, 41:117–122.
2. Davies MC, Hall ML, Jacobs HS: Bone mineral loss in young women with amenorrhea. *Br Med J* 1990, 301: 790–793.
3. Drinkwater BL, Brummer B, Chesnut CH III: Menstrual history as a determinant of current bone density in young athletes. *J Am Med Assoc* 1990, 263: 545–548.
4. Nappi C, Bifulco G, Tommaselli GA, Gargano V, Di Carlo C: Hormonal contraception and bone metabolism: a systematic review. *Contraception*, in press.
5. Nappi C, Di Spiezio Sardo A, Acunzo G, Bifulco G, Tommaselli GA, Guida M, Di Carlo C: Effects of a low-dose and ultra-low-dose combined oral contraceptive use on bone turnover and bone mineral density in

- young fertile women: a prospective controlled randomized study. *Contraception* 2003, 67:355–359.
6. Nappi C, Di Spiezio Sardo A, Greco E, Tommaselli GA, Giordano E, Guida M: Effects of an oral contraceptive containing drospirenone on bone turnover and bone mineral density. *Obstet Gynecol* 2005, 105:53-60.
7. Gargano V, Massaro M, Morra I, Formisano C, Di Carlo C, Nappi C: Effects of two low-dose combined oral contraceptives containing drospirenone on bone turnover and bone mineral density in young fertile women: a prospective controlled randomized study. *Contraception* 2008, 78:10–15.
8. Massaro M, Di Carlo C, Gargano V, Formisano C, Bifulco G, Nappi C: Effects of the contraceptive patch and the vaginal ring on bone metabolism and bone mineral density: a prospective, controlled, randomized study. *Contraception* 2010, 81:209-214.
9. Alsina JC: After 50 years of ethinylestradiol, another oestrogen in combined oral contraceptives. *Eur J Contracept Reprod Health Care* 2010, 15:1–3.
10. Sitruk-Ware R: Pharmacological profile of progestins. *Maturitas* 2008, 61:151-157.

11. Sitruk-Ware R, Nath A: The use of newer progestins for contraception. *Contraception* 2010, 82:410–417.
12. Guida M, Bifulco G, Di Spiezio Sardo A, Scala M, Fernandez LM, Nappi C: Review of the safety, efficacy and patient acceptability of the combined dienogest/estradiol valerate contraceptive pill. *Int J Womens Health* 2010, 2:279-290.
13. Del Puente A, Heyse SP, Mandes MG, Mantova D, Carpinelli A, Nutile G, Oriente P: Epidemiology of osteoporosis in women in southern Italy. *Aging (Milano)*, 10:53–58.
14. WHO: Assessment of fracture risk and its application to screening for postmenopausal osteoporosis. Report of a WHO Study Group. *World Health Organ Tech Rep Ser* 1994, 843:1 –129.
15. The ESHRE Capri Workshop Group: Noncontraceptive health benefits of combined oral contraception. *Human Reproduction Update* 2005, 11:513–525.
16. Robin SP: Biochemical markers of bone metabolism. *CPD Bulletin Clin Biochem* 1999,1:116–121.

17. Delmas PD: Biochemical markers of bone turnover for the clinical assessment of metabolic bone disease. *Endocrinol Metab Clin North Am* 1990,19:1–18.

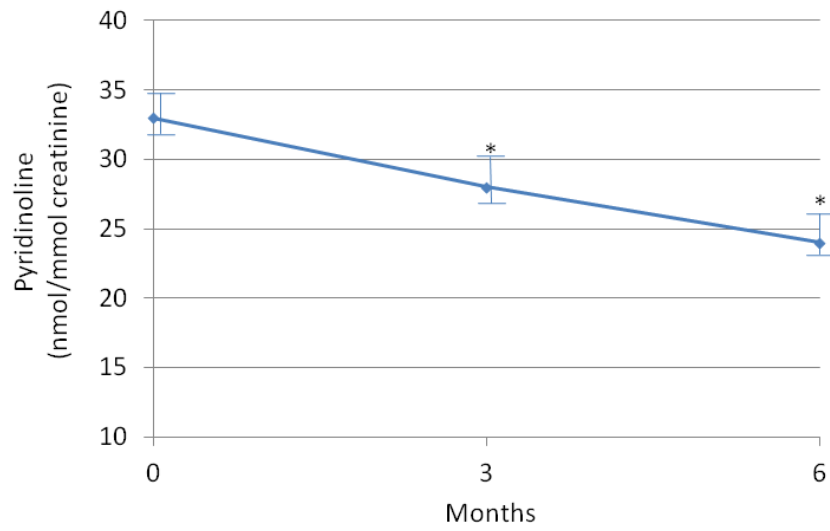


Figure 1. Mean \pm S.D. pyridinoline (PYD) urinary levels during the study

* $p < 0.05$ vs baseline

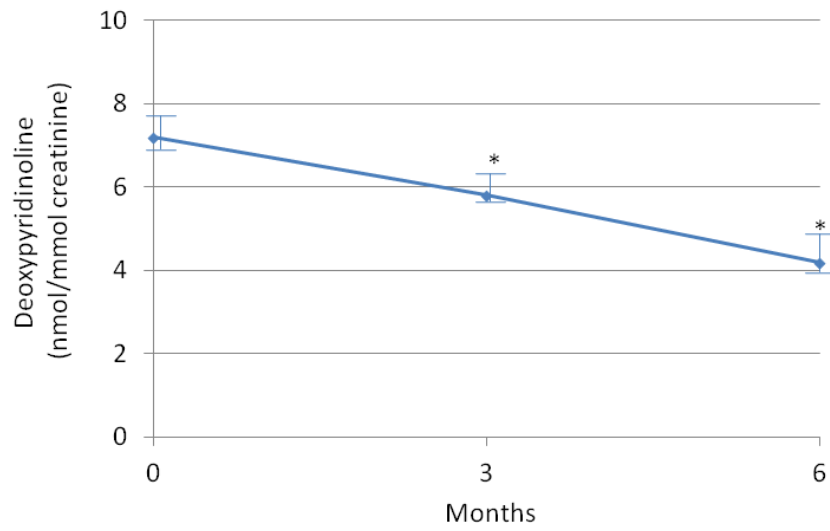


Figure 2. Mean \pm S.D. deoxyypyridinoline (PYD) urinary levels during the study

* $p < 0.05$ vs baseline

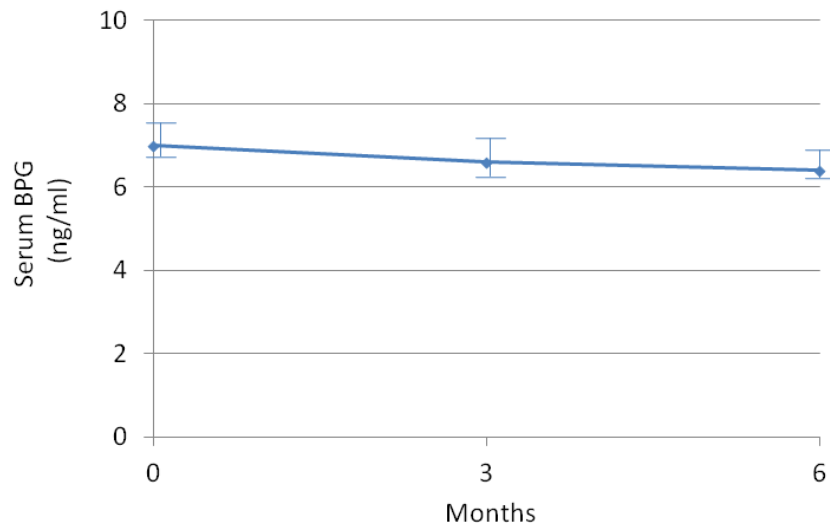


Figure 3. Mean \pm S.D. osteocalcin (BGP) serum levels during the study.

Table 1. Demographic characteristics of the 20 subjects at baseline

Age (y)	28.4 ± 2.5
Body mass index (kg/m²)	22.3 ± 1.4
Systolic pressure (mm Hg)	126.4 ± 5.2
Diastolic pressure (mm Hg)	74.5 ± 3.2
Menarche (y)	13.5 ± 1.3
Serum calcium (mmol/L)^a	2.52 ± 0.05
Urinary calcium (mmol/mmol Cr)^b	275 ± 42
Serum osteocalcin (ng/mL)^c	6.8 ± 0.7
Urinary deoxypyridinoline (nmol/mmol Cr)^d	8.1 ± 1.1
Urinary pyridinoline (nmol/mmol Cr)^e	33.2 ± 5.2

Legenda:

BMI: body mass index

SP: systolic pressure

DP: diastolic pressure

SC: serum calcium

UC: urinary calcium

Cr: creatinine

BGP: serum osteocalcin

U-D-PYD: urinary deoxypyridinoline

U-PYD: urinary pyridinoline

Data are expressed as mean \pm standard deviation

a: Reference Interval (RI: 2.15-2.6)

b: (RI: 200-520)

c: (RI: 1.5-10)

d: (RI: 5-14)

e: (RI: < 95)

Table 2. BMD values at baseline and after 6 months

Spinal BMD (g/cm²)	
Baseline	1.041 ± 0.08
After 6 months	1.042 ± 0.11



7th - 12th OCTOBER 2012
NUOVA FIERA DI ROMA
ROME, ITALY

www.figo2012.org

CONTROL ID: 1362673

PRESENTATION TYPE: Poster

CURRENT THEME: ABT03 - Contraception

TITLE: Effects of a combined dienogest/estradiol valerate contraceptive pill on bone turnover in young fertile women.

AUTHORS (LAST NAME, FIRST NAME): Santoro, Romina¹; Fabozzi, Annamaria¹; Gargano, Virginia¹; **Sparice Stefania**¹; Di Carlo, Costantino¹; Tommaselli, Giovanni A.¹; Nappi, Carmine¹

INSTITUTIONS (ALL): 1. Department of Obstetrics and Gynecology, University of Naples "Federico II", Naples, Italy.

ABSTRACT BODY:

Objectives: Hormonal contraceptives administration in young fertile women may expose users to modifications of bone metabolism. These may prevent the bone peak mass to be reached or induce an early bone loss, with an increased risk of osteoporosis. Several studies evaluated the effects of hormonal contraception on bone, but limited data on the influence of a combined dienogest (DNG)/estradiol valerate (E2V) contraceptive pill on bone metabolism are available. Aim of this prospective study was to evaluate the effects of a combined DNG/E2V contraceptive pill on bone turnover.

Materials: We enrolled 20 healthy, young (age<35 years), fertile women requiring contraception, from the "General Gynecology Clinic" of our Department. All patients took a four-phasic dose regimen pill (the first two tablets contain 3 mg E2V; the next five tablets include 2

mg E2V + 2 mg DNG, followed by 17 tablets with 2 mg E2V + 3 mg DNG; followed by two tablets with 1 mg E2V only, and finally two placebo tablets).

Methods: Serum osteocalcin (BGP), urinary pyridinoline (PYD) and deoxypyridinoline (D-PYD) were measured in all subjects at beginning of the study and after 3 and 6 months. Data have been evaluated with Student's t-test for paired samples.

Results: At 3 and 6 months, urinary levels of BGP, PYD and D-PYD were significantly reduced in comparison with values at baseline ($p < 0.05$).

Conclusions: The present study suggests that the combined DNG/E2V contraceptive pill could exert a positive effect on bone turnover in young post-adolescent women.

KEYWORDS: Contraception, Bone metabolism, DNG/E2V.

Capitolo 4

Iperandrogenismo e COC

L'irsutismo, l'acne e l'alopecia sono condizioni correlate all'iperandrogenismo che rispondono alla terapia con antiandrogeni. La causa più comune di iperandrogenismo nelle adolescenti e nelle donne adulte è rappresentata dalla sindrome dell'ovaio policistico (PCOS), caratterizzata da irregolarità mestruali, irsutismo, obesità, iperandrogenismo, evidenza ecografica di ovaie policistiche.

L'iperandrogenismo è l'elemento chiave di questa sindrome ed ha origine ovarica e surrenalica: in particolare, i principali androgeni secreti dall'ovaio sono l'androstenedione ed il testosterone, mentre il principale androgeno secreto dal surrene è il deidroepiandrosterone solfato. Per quanto concerne il dosaggio del testosterone è sempre importante considerare la quota di testosterone libero, che è l'ormone attivo. Infatti solo una piccola parte di testosterone (1-2%) circola liberamente ed è quindi attivo, poiché la maggior parte risulta legato a proteine plasmatiche (circa il 60-70% all'SHBG, *Sex Hormone Binding Globulin* e circa il 30-40% all'albumina con un legame più debole). I dati della letteratura evidenziano che il 22% delle donne con segni clinici di iperandrogenismo non presenta iperandrogenismo biochimico.

E' stato dimostrato che l'utilizzo di contraccettivi orali combinati (COC) in donne affette da iperandrogenismo determina una riduzione dei livelli circolanti di androgeni inibendo la follicolo genesi attraverso la soppressione della secrezione di gonadotropine ipofisarie. Il contraccettivo ideale per una donna affetta da iperandrogenismo dovrebbe:

- limitare lo sviluppo dei follicoli antrali e ridurre la quantità di androgeni;
- contrastare l'effetto degli androgeni a livello periferico ed in particolare a livello dei bulbi piliferi e delle ghiandole sebacee.
- ripristinare a livello endometriale il fisiologico equilibrio tra estrogeni e progesterone garantendo un adeguato controllo del ciclo mestruale.

E' stato dimostrato che in donne affette da PCOS un contraccettivo orale contenente 30 mcg di etinilestradiolo (EE) inibisce la steroidogenesi surrenalica e stimola la produzione epatica di sex hormone-binding globulin (SHBG) più efficacemente di un contraccettivo a basso dosaggio. Riguardo poi al tipo di progestinico, il ciproterone acetato (CPA), il clormadinone acetato (CMA), il dienogest ed il drospirenone (DRSP), progestinici dotati di attività antiandrogenica, inattivano il recettore per gli androgeni a livello dei tessuti bersaglio e riducono a livello della cute l'attività della 5 α -reduttasi, l'enzima che converte il testosterone nella forma attiva 5 α -deidrotosterone.

In particolare, studi su contraccettivi contenenti DRSP o CPA hanno dimostrato una riduzione dei segni clinici di iperandrogenismo nelle pazienti

trattate dopo 6–12 mesi di terapia, una significativa riduzione dei livelli di androgeni circolanti ed un significativo incremento dei livelli circolanti di SHBG.

“Effects of an oral contraceptive containing estradiol valerate and dienogest on androgenic levels and acne in patients with PCOS”.

Submitted (Gynecological Endocrinology)

Costantino Di Carlo, **Stefania Sparice**[§], Virginia Gargano, Giuseppe Bifulco, Giovanni A. Tommaselli, Carmine Nappi

Department of Obstetrics and Gynecology, University of Naples Federico II,
Via Pansini 5, Italy

[§] Corresponding author

Key Words: menstrual irregularities, infertility, obesity, hyperandrogenism, irsutism, and acne.

Abstract: Polycystic ovary syndrome (PCOS) is the most common endocrine disorder in women. Hyperandrogenism is a key element of PCOS.

Methods: From June 2011 to November 2011 we evaluated for inclusion in the study all patient referring to our Clinic for contraception, to whom Klaira had been prescribed.

Results: After 12 cycles of therapy we found a significative reduction of comedones and papules/pustules in 15 of the 24 patients with mild acne and in 7 of the 12 patients with moderate acne.

Conclusions: In conclusion the present study suggests that the E2V/DNG pill could exert a positive influence on acne and hyperandrogenism.

Introduction:

Polycystic ovary syndrome (PCOS) is one of the most common endocrine disorders in women. This syndrome is characterized by an heterogeneous combination of signs and symptoms: abnormal gonadotropin secretion, chronic anovulation, impaired glyco-insulinemic metabolism and elevated circulating androgen levels represent the physiopathological background accounting for menstrual irregularities, infertility, obesity, hirsutism, and acne [1].

Hyperandrogenism is a key element of PCOS. It is largely of ovarian origin, though the adrenal contribution cannot be ignored. Androstenedione (A) and testosterone (T) are the main androgens secreted by the ovary, whereas dehydroepiandrosterone sulphate (DHEAS) is mainly produced by the adrenals [2]. High androgens levels may cause acne and hirsutism in women. Instead the sebaceous glands, hair follicles and several types of skin cells contain androgen receptors and 5α -reductase, a peripheral enzyme that converts T to dihydrotestosterone (DHT), a more active androgen. In the skin DHT enhances follicular keratinisation, sebaceous gland growth, sebum secretion and consequently greasy skin and comedones formation.

Combined oral contraceptives (COCs) are considered the first line treatment for women suffering from hyperandrogenism [3].

Potential mechanisms for COCs therapeutic benefits include: 1) stimulation of sex hormone-binding globulin (SHBG) production [4,5] leading to a decrease in bioavailable T concentrations [6]; 2) competitive inhibition of 5α -reductase [7] ; 3) decreased production of ovarian androgens (ie, A and T) [4]; and 4) decreased production of adrenal androgens (ie, DHEAS) [4]. These mechanisms lead to a decrease in sebum production and hair growth. [8,9].

In particular progestational activity of COCs lowers luteinizing hormone (LH) secretion and thus LH-mediated ovarian androgen release while the beneficial effect of the estrogenic component is mainly due to its sex hormone-binding globulin (SHBG) elevating ability, which decreases the amount of free T available [4]. However, the increase in plasma SHBG concentration is blunted by the androgenic activity of the progestin in the COCs. Therefore progestins with low androgenic activity or with antiandrogenic activity are better for women suffering from hyperandrogenism related symptoms [10]. Among progestins with antiandrogenic activity there are cyproterone acetate (CPA), chlormadinone acetate (CMA), drospirenone (DRSP) and dienogest (DNG).

In 2009, a new quadriphasic oral contraceptive has been introduced in Italy. The 28-tablet pack of this new contraceptive (Klaira, Bayer, Italy) contains 2 tablets containing 3 mg of estradiol valerate (E2V), 5 tablets containing 2 mg of E2V and 2 mg of DNG, 17 tablets containing 2 mg of E2V and 3 mg of DNG, 2 tablets containing 1 mg of E2V, and 2 inert tablets. E2V is immediately cleaved

to estradiol after oral intake: so the circulating molecule reaching the estrogen receptors is the natural 17β -estradiol [11]. DNG is chemically described as (17 β)-17-hydroxy-3-oxo-19-norpregna-4,9-diene-21-nitrile and it is structurally related to the norethindrone family but acts as an antiandrogen [12]; it has been designed to specifically bind to the progesterone receptor [13]. Like other progestogens with a similarity to progesterone, DNG has direct antiandrogenic activity [14]. Studies in vitro show that DNG binds to the androgen receptor with a potency that is similar to that of CPA. In clinical use this is enhanced by DNG's lack of interaction with specific hepatic transport proteins such as SHBG [15]. So the increase in SHBG is not counteracted by the combination DNG/E2V. Therefore this association can be predicted to offer a good antiandrogenic potential for women with acne and seborrhea.

Aim of this observational study is to evaluate the effects of the DNG/E2V COC on SHBG and T levels and on acne in young women with PCOS.

Methods

This prospective, longitudinal, single-arm, one-year follow-up study was performed in the Endocrinological Gynecology Unit of the Department of Obstetrics and Gynecology of our Institution. During the period from April to October 2011, 124 patients requiring oral hormonal contraception and scheduled for the administration of an oral contraceptive containing estradiol valerate and dienogest were evaluated for inclusion in the study. Inclusion criteria were:

PCOS as defined according to the Rotterdam criteria [16], acne as graded by the James and Tisserand grading scheme [17], and body mass index (BMI) ≥ 25 kg/m². Exclusion criteria were: confirmed or suspected pregnancy, grade 4 acne, causes of hyperandrogenism different from PCOS and all other relevant contraindication for the use of COCs.

Before entering the study, the purpose of the protocol was clearly explained to the patients and a written informed consent was obtained from all women enrolled. The study was approved by the Institutional Review Board.

Before inclusion, all patients evaluated underwent complete medical and gynecological history, pap smear, bimanual pelvic examination and evaluation of systolic and diastolic pressure before the prescription of COCs. A total of 49 women satisfied all inclusion criteria and 40 agreed to participate to participate to the study.

All patients were instructed to start pill intake from the first day of the next spontaneous menses for 28 days and to start a new blister after the last pill of previous blister, without interruption. At baseline and after 6 and 12 months, free T levels and SHBG levels were measured by ELISA (Genway Biotech, Inc. San Diego).

All values were expressed as mean \pm SD.

Moreover, at baseline and after 12 months all patients underwent acne grading by the same physician. BMI was calculated for all patients at the beginning of the study and after 12 months.

Acne grading was performed using the James an Tisserand grading scheme [17]. In this grading system 4 grades are present: grade 1 (simple non-inflammatory acne comedones and a few papules), grade 2 (comedones, pustules, and a few pustules), grade 3 (larger inflammatory papules, pustules and a few cysts; a more severe form involving the face, neck and upper portion of the trunk), and 4 (more severe, with cysts becoming confluent).

Statistical evaluation

The primary endpoint of the study was the proportion of patients with an improvement in acne grade after 12 month of COC administration. Data distribution was evaluated using the Shapiro-Wilk's test. All continuous variables showed a normal distribution and ANOVA followed by the Bonferroni post-hoc test was used to evaluate differences in T and SHBG levels at different times. Difference in proportions were evaluated using the Fisher's test. Statistical significance was set for a p value of $< .05$.

Results

Among the 40 women selected for the study, 4 patients discontinued the treatment for personal reasons and 36 completed the study. In Table 1, the baseline characteristics of the subjects studied are listed.

At beginning of the study 24 patients (66.7%) had grade 1-2 (mild) acne and 12 patients (33.3%) had grade 3 (moderate) acne. After 12 cycles of therapy, mild acne completely disappeared in 12 patients; in 9 patient mild acne we found an improvement in lesions although not significant, while 3 patients with mild acne worsened. Among the 12 patients suffering from moderate acne, 7 present a mild form at the end of the study and 5 present an improvement in lesions although not significant. Finally we found an improvement of acne in the 52.8% of patients and a worsening of acne in the 12.5%. This difference was not statistically significant ($p = 0.6$) (Table 2) .

SHBG levels were significantly higher after 6 and 12 months of therapy, while total testosterone levels were lower in all patients at 6 and 12 months although this trend did not reach statistical significance.

Discussion

Seborrhea and acne are frequent among adolescents with up to 80% of women under 20 years reporting some “skin problems”. Although many of this “skin problems” do not match the criteria of severe acne, even minor symptoms can

have a negative impact on a woman's body image and quality of life [18]. The efficacy of COCs with antiandrogenic progestins in acne treatment has been demonstrated by several studies: Palombo Kinne et al demonstrated that 30 µg ethinylestradiol combined with either 2 mg cyproterone acetate or 2 mg dienogest achieved improvement in 100% and 68.8% respectively of women with seborrhea [19]. Comparable efficacy was achieved with a combination of ethinylestradiol and drospirenone or chlormadinone acetate [20].

In this observational study we found an improvement of acne in the 52.8% of patients and a worsening of acne in the 12.5%. The lack of a stronger effect of the therapy is probably due to the short time of the treatment. Indeed, it has been demonstrated that there is an important correlation between the duration of treatment with COCs and its effect, with the full therapeutic effect reached after about 2 years [21].

After 12 months of treatment we found a significant increase of SHBG levels. This result is in agreement with previous studies in literature.

After 12 months we found lower testosterone levels in all patients, although this trend did not reach statistical significance. This is in agreement with previous results of literature [22].

The positive effect on acne of DNG/E2V pill in absence of a significative reduction of T levels may be explained also with a direct action of DNG on 5α-reductase.

Indeed, seborrhea and acne may be associated with either elevated serum testosterone concentrations or an excessive local action of DHT due to skin 5α -reductase overactivity or to increased sensitivity to its effects [23].

In conclusion the present study suggests that the E2V/DNG pill could exert a positive influence on acne and hyperandrogenism.

This is an observational study on a very limited population number and so additional randomized controlled studies on larger populations are needed also to determine the effects of this contraceptive over longer periods of use. If data from randomized controlled trial will confirm our preliminary data we could hypothesize an important role of DNG/E2V in the therapy of acne especially in patients with PCOS for the greater neutrality of E2V on vascular and metabolic systems.

References

- [1] Franks S. Polycystic ovary syndrome. *N Engl J Med* 1995; 333:853–861
- [2] De Leo V, La Marca A, Petraglia F. Insulin-lowering agents in the management of polycystic ovary syndrome. *Endocr Rev* 2003; 24:633–667
- [3] Oláh KS. The modern management of hirsutism. *Rev Gynaecol Practice* 2004; 4:211–220.
- [4] Murphy AA, Cropp CS, Smith BS, Burkman RT, Zacur HA. Effect of low-dose oral contraceptive on gonadotropins, androgens, and sex hormone binding globulin in non hirsute women. *Fertil Steril* 1990; 53:35–39.

- [5] van der Vange N, Blankenstein MA, Kloosterboer HJ, Haspels AA, Thijssen JHH. Effects of seven low-dose combined oral contraceptives on sex hormone binding globulin, corticosteroid binding globulin, total and free testosterone. *Contraception* 1990; 41:345–352.
- [6] Jung-Hoffmann C, Kuhl H. Divergent effects of two low-dose oral contraceptives on sex hormone-binding globulin and free testosterone. *Am J Obstet Gynecol* 1987; 156:199–203.
- [7] Azziz R, Gay F. The treatment of hyperandrogenism with oral contraceptives. *Semin Reprod Endocrinol* 1989; 7:246–254.
- [8] Cullberg G, Hamberger L, Mattsson LA, Mobacken H, Samsioe G. Effects of a low-dose desogestrel-ethinylestradiol combination on hirsutism, androgens, and sex hormone binding globulin in women with polycystic ovary syndrome. *Acta Obstet Gynecol Scand* 1985; 64:195–202.
- [9] Dewis P, Petsos P, Newman M, Anderson DC. The treatment of hirsutism with a combination of desogestrel and ethinyl oestradiol. *Clin Endocrinol* 1985; 22:29–36.
- [10] Azziz R. The evaluation and management of hirsutism. *Obstet Gynecol* 2003; 101:995–1007.
- [11] Alsina JC. After 50 years of ethinylestradiol, another oestrogen in combined oral contraceptives. *Eur J Contracept Reprod Health Care* 2010; 15:1–3.

- [12] Sitruk-Ware R. Pharmacological profile of progestins. *Maturitas* 2008; 61:151-157.
- [13] Sitruk-Ware R, Nath A. The use of newer progestins for contraception. *Contraception* 2010; 82:410–417.
- [14] Bitzer J. The importance of antiandrogenicity of progestogens. *Gynaecology Forum* 2009; 14(2):21-23.
- [15] Mueck A.O. Seeger H. Pharmacology of dienogest. *Gynaecology Forum* 2009; 14(2):9-12.
- [16] Rotterdam ESHRE/ASRM-Sponsored PCOS Consensus Workshop Group. *Fertil Steril*. 2004 Jan;81(1):19-25. Revised 2003 consensus on diagnostic criteria and long-term health risks related to polycystic ovary syndrome.
- [17] Ramli R, Malik AS, Hani AFM, Jamil A. Acne analysis, grading and computational assessment methods: an overview. *Skin Research and Technology* 2012(18):1-14.
- [18] Lasek RJ. Chren MM. Acne vulgaris and the quality of life of adult dermatology patients. *Arch Dermatol* 1998; 134:454-458.
- [19] van Vloten WA, van Haselen CW, van Zuuren EJ, et al. The effect of 2 combined oral contraceptives containing either drospirenone or cyproterone acetate on acne and seborrhea. *Cutis* 2002; 69(4):2-15.

- [20] Del Marmol V, Teichmann A, Gertsen K. The role of combined oral contraceptives in the management of acne and seborrhea. *Eur J Contracep Reprod Health Care* 2004; 9(2):107-124.
- [21] Sansone G, Reisner RM. Differential rates of conversion of testosterone to dihydrotestosterone in acne and in normal human skin: possible pathogenetic factors in acne. *J Invest Dermatol* 1971; 56:366-372.
- [22] Falsetti L, Gambera A, Tisi G. Efficacy of the combination ethinyl oestradiol and cyproterone acetate on endocrine, clinical and ultrasonographic profile in polycystic ovarian syndrome. *Hum Reprod.* 2001 Jan;16(1):36-42.
- [23] Lucky AW, Koltun W, Thiboutot D, et al. A combined oral contraceptive containing 3-mg drospirenone / 20-microg ethinyl estradiol in the treatment of acne vulgaris: a randomized, double-blind, placebo-controlled study evaluating lesion counts and participant self-assessment. *Cutis* 2008; 82(2):143-150.

BIBLIOGRAFIJA:

Adukauskiene D, Miliauskiene V. Combined oral contraception and hypercoagulation. *Medicina (Kaunas)*. 2010;46(4):293-7. Review.

Agarwal MK. *Antihormonal steroids revisited. Review.* *Drugs of the Future*. 1995; 20:903–10.

Ahima RS. *Metabolic actions of adipocyte hormones: focus on adiponectin.* *Obesity (Silver Spring)* 2006; 14(Suppl. 1): 9s-15s.

Aizawa-Abe M, Ogawa Y, Masuzaki H, et al. *Pathophysiological role of leptin in obesity-related hypertension.* *J Clin Invest*. 2000; 105:1243–1252.

Archer DF, Thorneycroft IH, Foegh M, et al. *Long-term safety of drospirenone-estradiol for hormone therapy: a randomized, double-blind, multicenter trial.* *Menopause*. 2005; 16(6): 716–727.

Archer DF. *Drospirenone and estradiol: a new option for the postmenopausal woman.* *Climacteric*. 2007; 10 Suppl 1: 3–10.

Arita Y, Kihara S, Ouchi N et al. *Paradoxical decrease of an adipose-specific protein, adiponectin, in obesity.* *Biochem Biophys Res Commun*. 1999; 257: 79–83.

Bacha F, Saad R, Gungor N, Arslanian SA. *Adiponectin in youth. Relationship to visceral adiposity, insulin sensitivity, and beta-cell function.* *Diabetes Care*. 2004; 27: 547–552.

- Bajaj M, Ben-Yehuda O. *A big fat wedding: association of adiponectin with coronary vascular lesions*. J Am Coll Cardiol. 2006; 48: 1163-5.
- Banks WA, Kastin AJ, Huang W, et al. *Leptin enters the brain by a saturable system independent of insulin*. Peptides. 1996; 17:305–311
- Behre HM, Simoni M & Nieschlag E. *Strong association between serum levels of leptin and testosterone in men*. Clinical Endocrinology 1997; 47 (2): 237-40.
- Beltowski J. *Leptin and atherosclerosis*. Atherosclerosis. 2006 Nov; 189(1): 47-60.
- Berner HS, Lyngstadaas SP, Spahr A et al. *Adiponectin and its receptors are expressed in bone-forming cells*. Bone 2004; 35: 842–849.
- Bogan JS, Lodish HF. *Two compartments for insulin stimulated exocytosis in 3T3-L1 adipocytes defined by endogenous ACRP30 and GLUT4*. J Cell Biol 1999; 146: 609–620.
- Calvani M, Scarfone A, Granato L et al. *Restoration adiponectin pulsatility severely obese subjects after weight loss*. Diabetes 2004; 53: 939–947.
- Campfield LA, Smith FJ, Guisez Y, et al. *Recombinant mouse Ob protein: evidence for a peripheral signal linking adiposity and central neural networks*. Science 1995; 269: 546-549.
- Campos DB, Palin MF, Bordignon V, Murphy BD. *The 'beneficial' adipokines in reproduction and fertility*. Int J Obes 2008 Feb;32(2):223-31.
- Caprio M, Fabbrini E, Isidori AM, Aversa A, Fabbri A. *Leptin in reproduction*.

Trends Endocrinol Metab. 2001 Mar;12(2):65-72.

Carr MC. *The emergence of the metabolic syndrome with menopause.* J Clin Endocrinol Metab 2003; 88: 2404-11.

Castelo-Branco C, Palacios S, Vázquez F, et al. *Effects on serum lipid and leptin levels of three different doses of norethisterone continuously combined with a fixed dose of 17beta-estradiol for nasal administration in postmenopausal women: a controlled, double-blind study.* Fertil Steril. 2007 Aug; 88(2):383-9.

Castracane VD, Kraemer RR, Franker MA, et al. *Serum leptin concentration in women: effect of age, obesity, and estrogen administration.* Fertil Steril 1998; 70:472-7.

Cella F, Giordano G, Cordera R. *Serum leptin concentrations during the menstrual cycle in normal-weight women: effects of an oral triphasic estrogen-progestin medication.* Eur J Endocrinol. 2000;142(2):174-8.

Chehab FF, Lim ME, Lu R. *Correction of sterility defect in homozygous obese female mice by treatment with the human recombinant leptin.* Nat Genet. 1996; 12: 318-320.

Chehab FF. *Leptin as a regulator of adipose mass and reproduction.* Trends Pharmacol Sci. 2000;21(8):309-14.

Chinetti G, Zawadski C, Fruchart JC, Staels B. *Expression of adiponectin receptors in human macrophages and regulation by agonists of the nuclear receptors PPAR[alpha], PPAR[gamma], and LXR.* Biochem Biophys Res

Comms 2004; 314: 151–58.

Chu MC, Cospers P, Nakhuda GS, et al. *A comparison of oral and transdermal short-term estrogen therapy in postmenopausal women with metabolic syndrome.*

Fertil Steril 2006; 86: 1669-75.

Clarke KJ, Zhong Q, Schwartz DD et al. *Regulation of adiponectin secretion by endothelin-1.* Biochem Biophys Res Commun 2003; 312: 945–949.

Cnop M, Havel PJ, Utzschneider KM et al. *Relationship of adiponectin to body fat distribution, insulin sensitivity and plasma lipoproteins: evidence for independent roles of age and sex.* Diabetologia 2003; 46: 459–469.

Collins S, Kuhn CM, Petro AE, et al. *Role of leptin in fat regulation.* Nature 1996; 380:677.

Combs TP, Berg AH, Rajala MW et al. *Sexual differentiation, pregnancy, calorie restriction, and aging affect the adipocyte-specific secretory protein adiponectin.* Diabetes 2003; 52: 268–276.

Combs TP, Wagner JA, Berger J et al. *Induction of adipocyte complement-related protein of 30 kilodaltons by PPARgamma agonists: a potential mechanism of insulin sensitization.* Endocrinology 2002; 143: 998–1007.

Considine RV & Caro JF. *Pleiotropic cellular effects of leptin.* Current Opinion in Endocrinology and Diabetes 1999; 6: 163-169.

Considine RV & Caro JF. *Pleiotropic cellular effects of leptin.* Current Opinion in Endocrinology and Diabetes 1999; 6: 163-169.

Darney Pd. *The androgenicity of Progestins*. Am J med 1995; 98 (Suppl 1A): 104s-10s.

Davidson MH. A symposium: National Cholesterol Education Program Adult Treatment Panel III: Impact and implementation of the new guidelines. Introduction. Am J Cardiol. 2002 Mar 7;89(5A):1C-2C.

Dedeoğlu EN, Erenus M, Yörük P. *Effects of hormone therapy and tibolone on body composition and serum leptin levels in postmenopausal women*. Fertil Steril. 2009 Feb; 91(2): 425-31.

Delaigle AM, Jonas JC, Bauche IB, et al. *Induction of adiponectin in skeletal muscle by inflammatory cytokines: in vivo and in vitro studies*. Endocrinology 2004; 145: 5589–5597.

Després JP. Dyslipidaemia and obesity. Baillieres Clin Endocrinol Metab. 1994;8(3):629-60. Review.

Di Carlo C, Tommaselli GA, Di Spiezio Sardo A, Sammartino A, Attianese W, Gargano V, Bifulco G, Nappi C. *Longitudinal evaluation of serum leptin and bone mineral density in early postmenopausal women*. Menopause. 2007 May-Jun; 14(3 Pt 1): 450-4.

Di Carlo C, Tommaselli GA, Sammartino A, Bifulco G, Nasti A, Nappi C. *Serum leptin levels and body composition in postmenopausal women: effects of hormone therapy*. Menopause. 2004 Jul-Aug; 11(4): 466-73.

Dunbar JC, Lu H. *Leptin induced increase in sympathetic nervous and cardiovascular tone is mediated by proopiomelanocortin (POMC) products.* Brain Res Bull 1999; 50: 215–221.

Fain JN, Madan AK, Hiler ML, et al. *Comparison of the release of adipokines by adipose tissue, adipose tissue matrix and adipocytes from visceral and subcutaneous abdominal adipose tissues of obese humans.* Endocrinology 2004; 145: 2273–2282.

Fasshauer M, Klein J, Neumann S, et al. *Hormonal regulation of adiponectin gene expression in 3T3-L1 adipocytes.* Biochem Biophys Res Commun 2002; 290: 1084–1089.

Fasshauer M, Kralisch S, Klier M et al. *Adiponectin gene expression and secretion is inhibited by interleukin-6 in 3T3-L1 adipocytes.* Biochem Biophys Res Commun. 2003; 301:1045–50.

Fei, H.J. Okano, et al. *Anatomic localization of alternatively spliced leptin receptors (Ob-R) in mouse brain and other tissues.* Proc. Natl. Acad. Sci. USA 94 (13) 1997; 7001–7005.

Fernández-Real JM, Gutierrez C, Vendrell J, Casamitjana R, Ricart W. *Plasma soluble tumor necrosis factor-alpha receptors circulate in proportion to leptin levels during the menstrual cycle in lean but not in obese women.* Eur J Endocrinol. 2000; 143(2):235-41.

Fotherby K, Caldwell AD. *New progestogens in oral contraception*. Contraception 1994; 49: 1-32.

Friedman JM, Halaas JL. *Leptin and the regulation of body weight in mammals*. Nature. 1998; 395:763–770.

Fruzzetti F, Lazzarini V, Ricci C, et al. *Effect of an oral contraceptive containing 30 µg ethinylestradiol plus 3 mg drospirenone on body composition of young women affected by premenstrual syndrome with symptoms of water retention*. Contraception 2007; 76: 190-194

Fuhrmann U, Krattenmacher R, Slater EP, Fritzscheier KH. *The novel progestin drospirenone and its natural counterpart progesterone: biochemical profile and antiandrogenic potential*. Contraception. 1996 Oct; 54(4): 243-51.

G. Boden, X. Chen, et al. *Effect of fasting on serum leptin in normal human subjects*. J. Clin. Endocrinol Metab. 81 (9) 1996; 3419–3423.

G. Matarese, S. Moschos, et al. *Leptin in immunology*. J. Immunol. 174 (6) 2005; 3137–3142.

G.H. Lee, R. Proenca, et al. *Abnormal splicing of the leptin receptor in diabetic mic.*, Nature 379 (6566) 1996; 632–635.

Gavrila A, Chan JL, Yiannakouris N, et al. *Serum adiponectin levels are inversely associated with overall and central fat distribution but are not directly regulated by acute fasting or leptin administration in humans: cross-sectional and interventional studies*. J Clin Endocrinol Metab 2003; 88: 4823 - 31.

Goldstein BJ, Scalia RG, Ma XL. *Protective vascular and myocardial effects of adiponectin*. Nat Clin Pract Cardiovasc Med. 2009 Jan;6(1):27-35.

Goodfriend TL, Egan BM, Kelley DE. *Aldosterone in obesity*. Endocr Res 1998; 24: 789-96.

Gui Y, Silha GY, Murphy LJ. *Sexual dimorphism and regulation of resistin, adiponectin, and leptin expression in the mouse*. Obes Res 2004; 12: 1481 - 91.

Guo C, Ricchiuti V, Lian BQ, et al. *Mineralocorticoid receptor blockade reverses obesity-related changes in expression of adiponectin, peroxisome proliferator-activated receptor-gamma, and proinflammatory adipokines*. Circulation. 2008 Apr 29; 117(17): 2253-61.

Hadji P, Görke K, Hars O, et al. *The influence of hormone replacement therapy (HRT) on serum leptin concentration in postmenopausal women*. Maturitas. 2000 Dec 29; 37(2): 105-11.

Haffner SM, MykkaÈnen L & Stern MP. *Leptin concentrations in women in the San Antonio Heart Study: effect of menopausal status and postmenopausal Hormone Replacement Therapy*. American Journal of Epidemiology 1997; 146: 581-585.

Halaas JL, Gajwala KS, Maffei M, et al. *Weight-reducing effect of the plasma protein encoded by the obese gene*. Science 1995; 269: 543-546.

Hall JE, Hildebrandt DA, Kuo J, Fitzgerald S. *Role of sympathetic nervous system and neuropeptides in obesity hypertension*. Braz J Med Biol Res 2000; 33: 605–618.

Halleux CM, Takahashi M, Delporte ML et al. *Secretion of adiponectin and regulation of apM1 gene expression in human visceral adipose tissue*. Biochem Biophys Res Commun 2001; 288: 1102–1107.

Hardie L, Trayhurn P, Abramovich D, Fowler P. *Circulating leptin in women: a longitudinal study in the menstrual cycle and during pregnancy*. Clinical Endocrinology 1997;47(1): 101 - 106.

Havel PJ. *Control of energy homeostasis and insulin action by adipocyte hormones: leptin, acylation stimulating protein, and adiponectin*. Curr Opin Lipidol. 2002; 13: 51-9.

Haynes WG, Morgan DA, Walsh SA, et al. *Receptor-mediated regional sympathetic nerve activation by leptin*. J Clin Invest 1997; 100:270–278.

Hirose H, Saito I, et al. *The obese gene product, leptin: possible role in obesity-related hypertension in adolescents*. J Hypertens 1998; 16: 2007–2012.

Høst C, Bojesen A, Frystyk J, et al. *Effect of sex hormone treatment on circulating adiponectin and subforms in Turner and Klinefelter syndrome*. Eur J Clin Invest. 2010 Mar; 40(3): 211-9.

Hotta K, Funahashi T, Arita Y et al. *Plasma concentrations of a novel, adipose-specific protein, adiponectin, in type 2 diabetic patients.* Arterioscler Thromb Vasc Biol 2000; 20: 1595–1599.

Hu E, Liang P, Spiegelman BM. *AdipoQ is a novel adipose-specific gene dysregulated in obesity.* J Biol Chem 1996; 271: 10697–10703.

Ibáñez L, de Zegher F. Ethinylestradiol-drospirenone, flutamide-metformin, or both for adolescents and women with hyperinsulinemic hyperandrogenism: opposite effects on adipocytokines and body adiposity. J Clin Endocrinol Metab. 2004 Apr;89(4):1592-7.

Itoh K, Imai K, Masuda T, et al. *Relationship between changes in serum leptin levels and blood pressure after weight loss.* Hyperten Res 2002; 25:881– 886.

J. Licinio, C. Mantzoros, et al. *Human leptin levels are pulsatile and inversely related to pituitary–adrenal function.* Nat Med. 3 (5) 1997; 575–579.

Jockenhövel F, Blum WF, Vogel E, et al. *Testosterone substitution normalizes elevated serum leptin levels in hypogonadal men.* Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism 1997; 82 (8): 2510-13.

Kamohara S, Burcelin R, Halaas JL, et al. *Acute stimulation of glucose metabolism in mice by leptin treatment.* Nature 1997; 389 (6649): 374-7.

Kaser S, Moschen A, Cayon A et al. *Adiponectin and its receptors in non-alcoholic steatohepatitis.* Gut 2005; 54: 117–121.

Kayes-Wandover KM, White PC. *Steroidogenic enzyme gene expression in the human heart*. J Clin Endocrinol Metab 2000; 85: 2519-25.

Kern PA, Di Gregorio GB, Lu T, et al. *Adiponectin expression from human adipose tissue: relation to obesity, insulin resistance, and tumor necrosis factor-alpha expression*. Diabetes 2003; 52: 1779–1785.

Kieffer TJ, Heller RS & Habener JF. *Leptin receptors expressed on pancreatic β -cells*. Biochemical and Biophysical Research Communications 1996 224(2):522-7.

Kleiblová P, Springer D, Haluzík M. *The influence of hormonal changes during menstrual cycle on serum adiponectin concentrations in healthy women*. Physiol Res. 2006;55(6):661-6.

Kobayashi H, Ouchi N et al. *Selective suppression of endothelial cell apoptosis by the high molecular weight form of adiponectin*. Circ Res 2004; 94: 27–31.

Kojima S, Funahashi T, Sakamoto T, et al. *The variation of plasma concentrations of a novel, adipocyte derived protein, adiponectin, in patients with acute myocardial infarction*. Heart 2003; 89: 667–8.

Konukoglu D, Serin O, Ercan M. *Plasma leptin levels in obese and non-obese postmenopausal women before and after hormone replacement therapy*. Maturitas. 2000 Oct 31; 36(3):203-7.

Krattenmacher R, Fromm M. *Mineralocorticoid and antimineralocorticoid effects of various progestogens on electrogenic Na transport in the rat distal*

colon in vitro. Acta Endocrinol 1992; 124:88.

Kristensen K, Pedersen SB & Richelsen B. *Regulation of leptin by steroid hormones in rat adipose tissue*. Biochemical and Biophysical Research Communications. 1999; 259(3): 624 -30.

Kubota N, Terauchi Y, Yamauchi T et al. *Disruption adiponectin causes insulin resistance neointimal formation*. J Biol Chem 2002; 277: 25863–6.

Kumada M, Kihara S, Sumitsuji S, et al. *Coronary artery disease association of hypoadiponectinemia with coronary artery disease in men*. CAD Study Group.

Kunnari A, Santaniemi M, Jokela M, et al. Estrogen replacement therapy decreases plasma adiponectin but not resistin in postmenopausal women. Metabolism. 2008 Nov;57(11):1509-15.

L.A. Tartaglia. *The leptin receptor*. J. Biol. Chem. 272 (10) 1997; 6093–6096.

Lee BS, Kang BM, Yoon BK, et al. *Efficacy and tolerability of estradiol 1 mg and drospirenone 2 mg in postmenopausal Korean women: A double-blind, randomized, placebo-controlled, multicenter study*. Maturitas 2007; 57(4): 361–369.

Leung KC, Xu A, Craig ME, et al. *Adiponectin isoform distribution in women-relationship to female sex steroids and insulin sensitivity*. Metabolism. 2009 Feb; 58(2): 239-45.

Li FY, Cheng KK, Lam KS, et al. *Cross-talk between adipose tissue and vasculature: role of adiponectin*. Acta Physio . 2010 Nov 10 Epub ahead of print

Li R, Xu M, Wang X, et al. Reduced vascular responsiveness to adiponectin in hyperlipidemic rats--mechanisms and significance. *J Mol Cell Cardiol.* 2010;49(3):508-15.

Llen YS, Adrian TE, Allen JM, et al. *Neuropeptide Y distribution in the rat brain.* *Science* 1983; 221: 877-9.

Loffreda S, Yang SQ, Lin HZ, et al. *Leptin regulates pro-inflammatory immune responses.* *FASEB J* 1998; 12: 57–65.

Ludwig M, Klein HH, Diedrich K, Ortmann O. *Serum leptin concentrations throughout the menstrual cycle.* *Arch Gynecol Obstet.* 2000;263(3):99-101.

Luque-Ramirez M, Alvarez-Blasco F, Escobar-Morreale HF. *Antiandrogenic contraceptives increase serum adiponectin in obese polycystic ovary syndrome patients.* *Obesity* 2008, 17:3-9

M.K. Sinha, J.P. Ohannesian et al. *Nocturnal rise of leptin in lean, obese, and non-insulin-dependent diabetes mellitus subjects.* *J. Clin. Invest.* 1996; 5:1344–1347.

Ma Z, Gingerich RL, Santiago JV, et al. *Radioimmunoassay of leptin in human plasma.* *Clin Chem* 1996; 42: 942-6.

Machado-Bonassi R, Tachotti F, et al. *Effects of two different oral contraceptives on total body water: a randomized study.* *Contraceptives* 2006; 73: 344-47.

Maeda K, Okubo K, Shimomura I et al. *cDNA cloning and expression of a novel adipose specific collagen-like factor, apM1 (AdiPose Most abundant Gene transcript 1)*. *Biochem Biophys Res Commun* 1996; 221: 286–9.

Maeda N, Takahashi M, Funahashi T et al. *PPARgamma ligands increase expression and plasma concentrations of adiponectin, an adipose-derived protein*. *Diabetes* 2001; 50: 2094–9.

Maffei M, Halaas J, Ravussin E, et al. *Leptin levels in human and rodent: measurements of plasma leptin and ob RNA in obese and weight-reduced subjects*. *Nature Med.*1995; 1: 1155-61.

Marie L. S, Miura G.I., et al. *A metabolic defect promotes obesity in mice lacking melanocortin-4 receptors*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 97 (22) 2000; 12339–12344.

Mark AL, Shaffer RA, Correia ML, et al. *Contrasting blood pressure effects of obesity in leptin-deficient ob/ob mice and agouti yellow obese mice*. *J Hypertens* 1999; 17:1949–53.

Masuzaki H, Ogawa Y, Isse N, et al. *Human obese gene expression: adipocyte-specific expression and regional differences in the adipose tissue*. *Diabetes* 1995; 44: 855-8.

Matsuda J, Yokota I, Iida M, et al. *Serum leptin concentration in cord blood: relationship to birth weight and gender*. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*. 1997; 82(5): 1642-4.

Matsuda M, Shimomura I et al. *Role of adiponectin in preventing vascular stenosis. The missing link of adipo-vascular axis.* J Biol Chem 2002; 277: 37487–91.

Matsumoto S, Takebayashi K, Aso Y. *The effect of spironolactone on circulating adipocytokines in patients with type 2 diabetes mellitus complicated by diabetic nephropathy.* Metabolism. 2006; 55: 1645–1652.

Moschos S, Chan JL, Mantzoros CS. *Leptin and reproduction: a review.* Fertil Steril. 2002;77(3):433-44.

Motoshima H, Wu X, Sinha MK et al. *Differential Regulation of Adiponectin Secretion from Cultured Human Omental and Subcutaneous Adipocytes: Effects of Insulin and Rosiglitazone.* J Clin Endocrinol Metab 2002; 87: 5662–7.

Mouzih K, Lu R, Chehab FF. *Leptin treatment recues the sterility of genetically obese ob/ob males.* Endocrinology 1997; 138:1190-3.

Muhn P, Krattenmacher R, Beier S, et al. *Drospirenone: a novel progestogen with antiminerlocorticoid and antiandrogenic activity: pharmacological characterization in animal models.* Contraception 1995; 51: 99-110.

Muzzin P, Eisensmith RC, Copeland KC & Woo SL. *Correction of obesity and diabetes in genetically obese mice by leptin gene therapy.* Proc Natl Acad Sci U S A. 1996 Dec 10; 93(25): 14804-8.

Nagasaka S, Ishikawa S, Nakamura T, et al. *Association of endogenous insulin secretion and mode of therapy with body fat and serum leptin levels in diabetic subjects*. *Metabolism* 1998; 47(11): 1391-6.

Nakano Y, Tobe T, Choi-Miura NH, et al. *Isolation and characterization of GBP28, a novel gelatin-binding protein purified from human plasma*. *J Biochem* 1996; 120: 803–812.

Neary NM, Goldstone AP, Bloom SR. *Appetite regulation: from the gut to the hypothalamus*. *Clin Endocrinol* 2004; 60: 153-60.

Nishizawa H, Shimomura I, Kishida K, et al. *Androgens decrease plasma adiponectin, an insulin-sensitizing adipocyte-derived protein*. *Diabetes* 2002; 51: 2734-41.

Oelkers W, Berger V, Bolik A. et al. *Drospirenone, a new progestogen with antiminerlocorticoid activity: effects on ovulation, electrolyte excretion, and the renin-aldosterone system in normal women*. *J Clin Endocrinol Metab*. 1991 Oct; 73(4): 837-42.

Oelkers W, Foidart JM, Dombrovicz N, et al. *Effect of a new oral contraceptive containing an antiminerlocorticoid progestogen, drospirenone, on the rennin-aldosterone system, body weight, blood pressure, glucose tolerance, and lipidic metabolism*. *J Clin Endocrinol Metab* 1995; 80: 1816-21.

Oelkers WH. *Drospirenone in combination with estrogens: for contraception and hormone replacement therapy*. *Climacteric* 2005; 8(Suppl. 3): 19–27.

Oelkers WK. *Effects of estrogens and progestogens on the rennin-aldosterone system and blood pressure*. Steroids 1996; 61: 166-171

Ohashi K, Ouchi N, Kihara S et al. *Adiponectin I164T mutation is associated with the metabolic syndrome and coronary artery disease*. J Am Coll Cardiol 2004; 43: 1195–1200.

Okamoto Y, Arita Y, et al. *An adipocyte-derived plasma protein, adiponectin, adheres to injured vascular walls*. Horm Metab Res 2000; 32: 47–50. 103

Okamoto Y, Arita Y, Nishida M et al. *An adipocyte-derived plasma protein, adiponectin, adheres to injured vascular walls*. Horm Metab Res 2000; 32: 47–50.

Ouchi N, Kihara S, Arita Y et al. *Novel modulator for endothelial adhesion molecules: adipocyte-derived plasma protein adiponectin*. Circulation 1999; 100: 2473–2476.

Ouchi N, Kihara S, et al. *Adipocyte-derived plasma protein, adiponectin, suppresses lipid accumulation and class A scavenger receptor expression in human monocyte-derived macrophages*. Circulation 2001; 103: 1057–1063.

Ouchi N, Kihara S, Funahashi T, et al. *Obesity, adiponectin and vascular inflammatory disease*. Curr Opin Lipidol. 2003 Dec; 14(6): 561-6.

Ouchi N, Shibata R, Walsh K. *Cardioprotection by adiponectin*. Trends Cardiovasc Med 2006; 16: 141–46.

Ouchi N, Walsh K. *Adiponectin as an anti-inflammatory factor*. Clin Chim Acta. 2007; 380: 24-30.

Pajvani UB, Combs TP et al. *Structure-Function Studies of the Adipocyte-secreted Hormone Acrp30/Adiponectin. Implications for metabolic regulation and bioactivity*. J Biol Chem 2003; 278: 9073–9085.

Pajvani UB, Hawkins M, Combs TP et al. *Complex distribution, not absolute amount of adiponectin, correlates with thiazolidinedione mediated improvement in insulin sensitivity*. J Biol Chem 2004; 279: 12152–12162.

Paolisso G, Rizzo MR, Mazziotti G, et al. *Lack of association between changes in plasma leptin concentration and in food intake during the menstrual cycle*. Eur J Clin Invest. 1999;29(6):490-5.

Park KG, Park KS, Kim MJ, et al. *Relationship between serum adiponectin and leptin concentrations and body fat distribution*. Diabetes Res Clin Pract. 2004; 63(2): 135-42.

Park SK, Oh SY, Lee MY et al. *CCAAT/enhancer binding protein nuclear factor- γ regulate adiponectin gene expression adipose tissue*. Diabetes 2004; 53: 2757–66.

Park YW, Zhu S, Palaniappan L, Heshka S, et al. *The metabolic syndrome: prevalence and associated risk factor findings in the US population from the Third National Health and Nutrition Examination Survey, 1988-1994*. Arch Intern Med. 2003 Feb 24;163(4):427-36.

Pedersen SB, Fuglsig S, Sjøgren P, Richelsen B. Identification of steroid receptors in human adipose tissue. *Eur J Clin Invest.* 1996 Dec; 26(12):1051-6.

Pelleymounter MA, Cullen MJ, Baker MB, et al. *Effects of the obese gene on body weight regulation in ob/ob mice.* *Science* 1995; 269: 540-543.

Pischon T, Rimm EB. *Adiponectin: a promising marker for cardiovascular disease.* *Clin Chem.* 2006; 52: 797-9.

Pollow K, Juchem M, Elger W, et al. *Dihydrospirorenone (ZK30595): a novel synthetic progestagen characterization of binding to different receptor proteins.* *Contraception.* 1992 Dec; 46(6): 561-74.

Rechberger T, Baranowski W, Postawski K, et al. Serum leptin concentrations in women taking oral contraceptives. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol.* 1999;83(1):105-8.

Riad-Gabriel MG, Jinagouda SD, Sharma A, Boyadjian R, Saad MF. Changes in plasma leptin during the menstrual cycle. *Eur J Endocrinol.* 1998; 139(5):528-31.

Rosenbaum M, Nicolson M, Hirsch J, et al. *Effects of gender, body composition, and menopause on plasma concentrations of leptin.* *J Clin Endocrinol Metab* 1996; 81: 3424 – 7.

S. Bluher, C.S. Mantzoros. *Leptin in humans: lessons from translational research.* *Am J Clin Nutr.* 89 (3) 2009; 991S–997S.

S.M. Hileman, D.D. Pierroz, et al. *Characterization of short isoforms of the leptin receptor in rat cerebral microvessels and of brain uptake of leptin in mouse models of obesity*. *Endocrinology* 143 (3) 2002; 775–783.

Saad MF, Damani S, Gingerich RL, et al. *Sexual dimorphism in plasma leptin concentration*. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* 1997; 82(2):579-584.

Saely CH, Risch L, Hoefle G, et al. *Low serum adiponectin is independently associated with both the metabolic syndrome and angiographically determined coronary atherosclerosis*. *Clin Chim Acta* 2007; 383: 97–102.

Scherer PE, Williams S, Fogliano M, et al. *A novel serum protein similar to C1q, produced exclusively in adipocytes*. *J Biol Chem* 1995; 270: 26746-9.

Scherer PE. *Adipose tissue: from lipid storage compartment to endocrine organ*. *Diabetes* 2006; 55(1): 537–45.

Schorr U, Blaschke K, Turan S, Distler A, Sharma AM. *Relationship between angiotensinogen, leptin and blood pressure levels in young normotensive men*. *J Hypertens*. 1998; 16:1475–1480.

Schürmann R, Holler T, Benda N. *Estradiol and drospirenone for climacteric symptoms in postmenopausal women: a double-blind, randomized, placebo-controlled study of the safety and efficacy of three dose regimens*. *Climacteric*. 2004; 7(2): 189–196.

Schwartz M, Peskind E, Raskind M, et al. *Cerebrospinal fluid leptin levels: relationship to plasma levels and to adiposity in humans*. *Nature Medicine* 1996; 2(5): 589-593.

Shibata R, Sato K, Pimentel DR, et al. *Adiponectin protects against myocardial ischemia-reperfusion injury through AMPK- and COX-2-dependent mechanisms*. *Nat Med*. 2005; 11: 1096-103.

Shimabukuro M, Higa N, Asahi T, et al. *Hypoadiponectinemia is closely linked to endothelial dysfunction in man*. *J Clin Endocrinol Metab*. 2003; 88: 3236-40.

Sieminska L, Wojciechowska C, Niedziolka D, et al. *Effect of postmenopause and hormone replacement therapy on serum adiponectin levels*. *Metabolism Clinical and Experimental* 2005; 54: 1610–1614.

Simpson F, Whitehead JP. *Adiponectin: it's all about the modifications*. *Int J Biochem Cell Biol*. 2010 Jun;42(6):785-8.

Sivan E, Whittaker P, Sinha D, et al. *Leptin in human pregnancy: the relationship with gestational hormones*. *American Journal of Obstetrics and Gynecology* 1998; 179: 1128-32.

Sivitz WI, Fink BD, Morgan DA, et al. *Sympathetic inhibition, leptin, and uncoupling protein subtype expression in normal fasting rats*. *Am J Physiol* 1999; 277:E668–E677.

Sivitz WI, Walsh S, Morgan D, et al. *Plasma leptin in diabetic and insulin-treated diabetic and normal rats*. *Metabolism*. 1998; 45: 584-591.

Sumino H, Takahashi T, Itoh T et al. *Plasma adiponectin levels in postmenopausal women receiving hormone replacement therapy*. J Int Med Res. 2004 Nov-Dec;32(6):639-45.

Swerdloff RS, Batt RA, Bray GA. *Reproductive hormonal function in the genetically obese (ob/ob) mouse*. Endocrinology 1994; 98: 1359-64.

Tan KCB, Xy A, et al. *Hypoadiponectinemia is associated with impaired endothelium-dependent vasodilation*. J Clin Endocrinol Metab. 2004; 89: 765-9.

Tankó LB, Christiansen C. *Effects of 17beta-oestradiol plus different doses of drospirenone on adipose tissue, adiponectin and atherogenic metabolites in postmenopausal women*. J Intern Med. 2005; 258(6):544-53.

Tchernof A, Calles-Escandon J, Sites CK, Poehlman ET. *Menopause, central body fatness, and insulin resistance: effects of hormone-replacement therapy*. Coron Artery Dis. 1998;9(8):503-11. Review.

The Writing Group for the PEPI Trial. *Effects of estrogen or estrogen/progestin regimens on heart disease risk factors in postmenopausal women*. The Postmenopausal Estrogen/Progestin Interventions (PEPI) Trial. JAMA 1995; 273(3):199-208.

Tommaselli GA, Di Carlo C, Nasti A, Giordano E, Pisano G, Pellicano M, Bifulco G, Nappi C. *Effects of bilateral ovariectomy and postoperative hormonal replacement therapy with 17beta-estradiol or raloxifene on serum leptin levels*. Menopause. 2003 Mar-Apr; 10(2): 160-4.

Trout KK, Basel-Brown L, Rickels MR, Schutta MH, Petrova M, Freeman EW, Tkacs NC, Teff KL. *Insulin sensitivity, food intake, and cravings with premenstrual syndrome: a pilot study.* J Womens Health. 2008 May;17(4):657-65.

Vaisse C, Halaas JL, Horvath CM, et al. *Leptin activation of Stat3 in the hypothalamus of wild-type and ob/ob mice but not db/db mice.* Nature Genet. 1996; 14: 95–97.

Vaz M, Jennings G, Turner A, et al. *Regional sympathetic nervous activity and oxygen consumption in obese normotensive human subjects.* Circulation. 1997; 96: 3423–3429.

Wajchenberg BL. Subcutaneous and visceral adipose tissue: their relation to the metabolic syndrome. Endocr Rev. 2000;21(6):697-738.

Walters W.A.W, Lim Y.L. *Haemodynamic changes in women taking oral contraceptives.* J Obstet Gynaecol Br Commown 1970; 77: 1099-99.

Wang Y, Xu A, Knight C, et al. *Hydroxylation and Glycosylation of the Four Conserved Lysine Residues in the Collagenous Domain of Adiponectin. Potential role in the modulation of its insulin-sensitizing activity.* J Biol Chem. 2002; 277: 19521–19529.

Weigle DS, Bukowski TR, Foster DC, et al. Recombinant ob protein reduces feeding and body weight in the ob/ob mouse. J Clin Invest. 1995 Oct; 96(4):2065-70.

Weyer C, Funahashi T, Tanaka S, et al. *Hypoadiponectinemia in obesity and type 2 diabetes: close association with insulin resistance and hyperinsulinemia.* J Clin Endocrinol Metab. 2001; 86: 1930-5.

White WB, Hanes V, Chauhan VB. *Effects of a new hormone therapy, drospirenone and 17- β -estradiol, in postmenopausal women with hypertension.* Hypertension 2006; 48: 246–53.

White WB, Pitt B, Preston RA, Hanes V. *Antihypertensive effects of drospirenone with 17-estradiol, a novel hormone treatment in postmenopausal women with stage I hypertension.* Circulation 2005; 112: 1979–84.

White WB. *Drospirenone with 17beta-estradiol in the postmenopausal woman with hypertension.* Climacteric 2007; 10 (Suppl. 1): 25–31.

Wiesner G, Vaz M, Collier G, et al. *Leptin is released from the human brain: influence of adiposity and gender.* J Clin Endocrinol Metab 1999; 84:2270–2274.

Wilding JP. *Neuropeptides and appetite control.* Diabet Med. 2002; 19: 619-27.

Wunder DM, Yared M, Bersinger NA, et al. *Serum leptin and C-reactive protein levels in the physiological spontaneous menstrual cycle in reproductive age women.* Eur J Endocrinol. 2006;155(1):137-42.

Wu-Peng S, Rosenbaum M, Nicolson M, et al. *Effects of exogenous gonadal steroids on leptin homeostasis in rats.* Obesity Research 1999 7(6): 586 - 592.

Yamagishi SI, Edelstein D, Du XL, et al. *Leptin induces mitochondrial superoxide production and monocyte chemoattractant protein-1 expression in*

aortic endothelial cells by increasing fatty acid oxidation via protein kinase A. J Biol Chem 2001; 276: 25096–25100.

Yamauchi T, Kamon J, Ito Y et al. *Cloning of adiponectin receptors that mediate antidiabetic metabolic effects.* Nature 2003; 423: 762–69.

Yamauchi T, Kamon J, Waki H, et al. *The fat-derived hormone adiponectin reverses insulin resistance associated with both lipodystrophy and obesity.* Nat Med.2001; 7: 941-46.

Yang WS, Lee WJ, Funahashi T et al. *Weight reduction increases plasma levels of an adipose-derived anti-inflammatory protein, adiponectin.* J Clin Endocrinol Metab 2001; 86: 3815–3819.

Yildizhan R, Yildizhan B, Adali E, et al. *Effects of two oral contraceptives containing ethinyl estradiol 30 g combined with either gestodene or drospirenone on hemostatic parameters, lipid profiles and blood pressure.* Arch Gynecol Obstet 2009; 280: 255-261.

Yoda-Murakami M, Taniguchi M, Takahashi K et al. *Change in expression of GBP28/adiponectin in carbon tetrachloride-administrated mouse liver.* Biochem Biophys Res Commun 2001; 285: 372–377.

Zhang Y, Matheny M, Zolotukhin S, et al. *Regulation of adiponectin and leptin gene expression in white and brown adipose tissues: influence of beta 3-adrenergic agonists, retinoic acid, leptin and fasting.* Biochim Biophys Acta 2002; 1584: 115–122.

Zhang Z, Henzel WJ. *Signal peptide prediction based on analysis of experimentally verified cleavage sites*. Protein Sci 2004; 13: 2819–2824.

CURRICULUM VITAE DELLA DOTT.SSA STEFANIA SPARICE

Nata a Napoli il 18.11.78.

Diploma Maturità Scientifica “Istituto Bianchi - Padri Barnabiti”, Napoli con voti 60/60 nell’unica sessione dell’Anno Scolastico 1996/1997.

First Certificate in English conseguito nel 2000 presso il British Council in Napoli.

Laurea in Medicina e Chirurgia con voti 100/110 presso l’Università degli Studi di Napoli “Federico II” il 28.07.2004.

Abilitazione all’esercizio della professione di medico-chirurgo presso l’Università degli Studi di Napoli “Federico II” nella seconda sessione dell’anno 2004.

Specializzazione in Ginecologia e Ostetricia con voto 70/70 e lode presso l’Università degli Studi di Napoli “Federico II” il 15.01.2010.

Vincitrice del concorso per Dottorato di Ricerca in Sviluppo, Riproduzione e Accrescimento dell’Uomo – XXV ciclo a Marzo 2010 (Anno Accademico 2009/2010).

Co-sperimentatrice di numerosi studi sperimentali presso il Dipartimento di Ginecologia, Ostetricia e Fisiopatologia della Riproduzione Umana.

Attività assistenziale presso il Dipartimento di Ginecologia, Ostetricia e Fisiopatologia della Riproduzione Umana del Policlinico Federico II dal 2004 ad oggi.

Socio della Società di Endoscopia Ginecologica Italiana (SEGI), della Società Italiana di Ecografia Ostetrico-Ginecologica (SIEOG), della Società Italiana di Menopausa (SIM) e della Società Italiana di Contraccezione (SIC).

Corsi e Congressi

- 1) VIII Congresso Nazionale della Società della Società Italiana di Fisiopatologia della Riproduzione; Napoli, 13 – 15 Dicembre 2001.
- 2) Congresso “Attualità in Chirurgia Ginecologica”; Pozzuoli (NA), 31 Gennaio 2003.
- 3) Convegno “La menometrorragia: dalla diagnosi al trattamento”; Ascea Marina (SA), 31 Maggio 2003.
- 4) Corso Teorico Pratico “Prevenire le problematiche genitali e sessuali dell’adolescenza: aspetti clinici, psicologici e bioetica”; Napoli, 6 Giugno 2003.
- 5) V Edizione degli Incontri di Fisiopatologia della Riproduzione: Problematiche “pratiche” nella prescrizione in ostetricia e ginecologia”; Napoli, 13 Dicembre 2003.
- 6) VI Corso di Aggiornamento Nazionale A.GI.CO. “Somministrazione di Ormoni e Fertilità”; Pozzuoli, 15 Ottobre 2004.
- 7) I Corso A.O.G.O.I. di Aggiornamento in Ginecologia “La patologia Annessiale: dalla Diagnostica alla Terapia”; Amalfi, 25 – 29 Ottobre 2004.

- 8) Corso Teorico Pratico di “Isteroscopia Ambulatoriale”; Nocera Inferiore (SA), 2-4 Dicembre 2004.
- 9) Corso di aggiornamento in Oncologia Ginecologica – il carcinoma dell’ovaio; Napoli, 28 Settembre 2006.
- 10) Corso di aggiornamento in Oncologia Ginecologica – il carcinoma della cervice uterina; Napoli, 30 Novembre 2006.
- 11) Attualità nell’inquadramento diagnostico e terapeutico dei sanguinamenti uterini anomali (A.U.B.); Bassano del Grappa, 21-22 Settembre 2006.
- 12) VIII Congresso Nazionale A.G.E.O. “Endometriosi e aspetti medico legali in ostetricia”; Capri, 14 Ottobre 2006.
- 13) Corso di aggiornamento “Contraccezione ormonale e benessere della donna”; Amalfi, 10-11 Novembre 2006.
- 14) Corso pratico-teorico di ecografia 3D – 4D in Ostetricia e Ginecologia; Napoli, 22-23 Giugno e 20-21 Novembre 2006.
- 15) II Corso teorico-pratico di isteroscopia diagnostica ed operativa “Trattamento isteroscopico delle patologie endouterine, resettoscopia o “office”? Napoli, 30-31 Gennaio 2007.

- 16) Aggiornamenti in Ostetricia e Ginecologia. Congresso Straordinario AUGUI; Roma, 18-19 Maggio 2007.
- 17) The 1st AAGL Congress in conjunction with SEGI; Palermo, 20-23 June 2007.
- 18) Investigators' Meeting Studio EVRA CONTRAST; Milano, 26 Giugno 2007.
- 19) Corso di aggiornamento in Oncologia Ginecologica – il carcinoma della mammella; Napoli, 28 Giugno 2007.
- 20) Corso di aggiornamento in Oncologia Ginecologica – il carcinoma della vulva; Napoli, 29 Giugno 2007.
- 21) Corso teorico-pratico per l'utilizzo dei prodotti Johnson&Johnson in chirurgia Ginecologica Laparoscopica; Avellino 17 Settembre 2007.
- 22) 83° Congresso Nazionale SIGO; Napoli, 14-17 Ottobre 2007.
- 23) 2° Congresso Nazionale SIC; Napoli, 5-7 Dicembre 2007.
- 24) VIII Training pratico teorico di ecografia Ginecologica Ostetrica e mammaria; Napoli, 27 Marzo 2008.
- 25) VIII Training pratico teorico di ecografia Ginecologica Ostetrica e mammaria; Napoli, 10 Aprile 2008.

- 26) VIII Training pratico teorico di ecografia Ginecologica Ostetrica e mammaria; Napoli, 24 Aprile 2008.
- 27) VIII Training pratico teorico di ecografia Ginecologica Ostetrica e mammaria; Napoli, 15 Maggio 2008.
- 28) III Corso Live di chirurgia ginecologica di base; Avellino, 20-21 Giugno 2008.
- 29) Corso teorico pratico di isteroscopia diagnostica in qualità di relatore; Napoli, 30 Ottobre 2008.
- 30) Workshop Comunicare HPV: Modello di “bad news communication” per il clinico; Napoli, 11 Giugno 2010.
- 31) Incontri di Fisiopatologia della Riproduzione “Contracezione work in progress”; Napoli, 18 Giugno 2010.
- 32) 1° Corso teorico pratico di Laparoscopia Ginecologica; Napoli, 25-27 Ottobre 2010.
- 33) Seminario scientifico “Tiroide e gravidanza”; Napoli, 20 Novembre 2010.
- 34) Antenatal surveillance - The Fetal Medicine Foundation; 27 Marzo 2011.

- 35) The 11 – 13 weeks scan - The Fetal Medicine Foundation; 27 Marzo 2011.
- 36) Responsabilità professionale in tema di encefalopatia perinatale; Napoli, 27-28 Maggio 2011.
- 37) Corso di aggiornamento teorico-pratico – Esame colposcopio e trattamento delle lesioni del basso tratto genitale; Torre del Greco (NA), 6-7 Giugno 2011.
- 38) Simposio di isteroscopia operativa “La chirurgia isteroscopica in diretta: tecniche a confronto”; Napoli, 10-11 Ottobre 2011.
- 39) Giornata AGITE “Percorsi diagnostici-terapeutici in uroginecologia”; Mugnano di Napoli (NA), 26 Maggio 2012.
- 40) Corso pregressuale “Management ecografico ed isteroscopico delle malformazioni dell’apparato genitale”; Napoli, 13-14 Giugno 2012.
- 41) XVIII weekend clinico “Endometriosi e contraccezione”; Napoli, 15-16 Giugno 2012.
- 42) “Gestione della menopausa nello studio del medico di medicina generale: un approccio multidisciplinare”; Caserta, 22 Settembre 2012.
- 43) Corso “Nella vita delle donne. Benessere femminile: la parola agli esperti”; Castellammare di Stabia (NA), 18-19 Ottobre 2012.

- 44) Corso “Ecografia dell’encefalo e dello splancnocranio fetale”; Napoli,
15-17 Novembre 2012.