

**UNIVERSITA' DEGLI STUDI DI NAPOLI
"FEDERICO II"
SCUOLA DI MEDICINA E CHIRURGIA
DIPARTIMENTO DI SCIENZE MEDICHE
TRASLAZIONALI**

**Dottorato di Ricerca in
"Riproduzione, Sviluppo ed Accrescimento
dell'Uomo"**

Coordinatore: Prof. Claudio Pignata



Tesi di Dottorato

"Ormoni del sistema riproduttivo in terapia : nuove evidenze"

**Tutor
Prof. Costantino Di Carlo**

**Candidato
Dott.ssa Virginia Gargano**

Anno Accademico 2013-2014

INDICE

Introduzione

Gli ormoni sessuali femminili e loro possibili impieghi in terapia

Capitolo 1. Ormoni sessuali femminili e metabolismo osseo

1A. Steroidi gonadici e regolazione del turnover osseo

1B. Contraccezione ormonale e metabolismo osseo

Pubblicazione:

Nappi C, Bifulco G, Tommaselli GA, **Gargano V**, Di Carlo C. *Hormonal contraception and bone metabolism: a systematic review*. Contraception. 2012;86:606-21.

Capitolo 2. Effetti clinici di una nuova associazione contraccettiva contenente estradiolo valerato e dienogest

2a. L'associazione contraccettiva estradiolo valerato/dienogest

2b. Studio osservazionale sugli effetti di un contraccettivo orale contenente estradiolo valerato e dienogest sul metabolismo osseo e sulla densità minerale ossea.

Pubblicazione:

Di Carlo C., **Gargano V.**, Sparice S., Tommaselli G.A., Bifulco G., Schettino D., Nappi C. *Short-term effects of an oral contraceptive containing oestradiol valerate and dienogest on bone metabolism and bone mineral density: An observational, preliminary study*. Eur J Contracept Reprod Health Care. 2013;18:388-93.

2c. Studio osservazionale sugli effetti di un contraccettivo orale contenente estradiolo valerato e dienogest sull'iperandrogenismo e sull'acne.

Pubblicazione:

Di Carlo C., **Gargano V.**, Sparice S., Tommaselli G.A., Bifulco G., Nappi C. *Effects of an oral contraceptive containing estradiol valerate and dienogest on circulating androgenic levels and acne in young patients with PCOS: An observational, preliminary study*. Gynecol Endocrinol. 2013;29:1048-50.

Capitolo 3. Ormoni sessuali femminili in terapia: effetti di diverse vie di somministrazione

3a. Vie di somministrazione alternative alla via orale

3b. Somministrazione del progesterone naturale per via vaginale

Pubblicazione:

Di Carlo C., Fabozzi A., **Gargano V.**, De Rosa N., Santoro R., Massaro M., Nappi C. *Bleeding patterns during replacement therapy with continuous transdermal estradiol in association with oral or vaginal sequential natural progesterone: a prospective randomized trial.* Abstracts of the 13th World Congress on the Menopause. Climacteric 2011: 14 S1; 67.

3b. La contraccezione con impianto sottocutaneo

Pubblicazione:

Di Carlo C., Sansone A., De Rosa N., **Gargano V.**, Tommaselli G.A., Nappi C., Bifulco G. *Impact of an implantable steroid contraceptive (etonogestrel-releasing implant) on quality of life and sexual function: a preliminary study.* Gynecol Endocrinol. 2014;30:53-6.

Capitolo 4. Effetti metabolici delle terapie ormonali con Drospirenone

Pubblicazione:

Di Carlo C., **Gargano V.**, Fabozzi A., De Rosa N., Santoro R., Massaro G., Nappi C. *Effects of Drospirenone on plasma leptin and adiponectin levels in postmenopausal women treated with hormonal replacement therapy and in perimenopausal women requesting contraception.* Abstracts of the 13th World Congress on the Menopause. Climacteric 2011: 14 S1; 72.

Bibliografia

Introduzione

Gli ormoni sessuali femminili e loro possibili impieghi in terapia

Gli ormoni del sistema riproduttivo femminile sono ormoni steroidei prodotti dall'ovaio e dal surrene. La sintesi degli ormoni ovarici è regolata dagli ormoni prodotti dall'asse ipotalamo-ipofisi: l'ormone rilasciante le gonadotropine (GnRH) prodotto dall'ipotalamo, svolge infatti un ruolo cruciale nel controllo della produzione e della secrezione delle due gonadotropine ipofisarie, l'ormone follicolo stimolante (FSH) e l'ormone luteinizzante (LH). La secrezione di GnRH deve avvenire in modo pulsatile, con frequenza e ampiezza comprese in un range abbastanza ristretto affinché possa stimolare la liberazione di gonadotropine. Questa pulsatilità è mantenuta da un insieme di elementi cellulari presenti nel nucleo arcuato che fungono da pacemaker. L'ipotalamo e l'ipofisi sono uniti da un distretto vascolare esclusivo definito "sistema portale", attraverso il quale i neuropeptidi giungono a livello ipofisario.

Il GnRH agisce sulle cellule gonadotrope dell'adenoipofisi che producono le gonadotropine. L'FSH e l' LH prodotti dall'ipofisi stimolano l'ovaio a produrre estradiolo (E_2) e progesterone (P).

A loro volta, l'E₂ e il P ovarico, in relazione alle loro concentrazioni plasmatiche assolute o relative, esercitano un feedback positivo o negativo sull'asse ipotalamo-ipofisi, regolando così la secrezione di FSH e LH.

L'ovaio, inoltre, controlla l'asse ipotalamo-ipofisi anche attraverso alcune sostanze di natura peptidica, ad azione stimolatoria o inibitoria. Ad esempio, l'inibina, prodotta dalle cellule della granulosa, costituisce uno dei maggiori inibitori della secrezione dell'FSH, mentre l'activina, prodotta sempre dalle cellule della granulosa, stimola il rilascio di tale gonadotropina.

Il GnRH viene liberato nel circolo portale ipofisario, raggiungendo l'adenoipofisi dove, interagendo con recettori specifici localizzati sulla membrana plasmatica delle cellule gonadotrope, stimola la sintesi e la secrezione delle gonadotropine stesse. Il GnRH, inoltre, con un meccanismo autocrino, induce la sintesi dei suoi recettori, il cui numero varia significativamente in varie condizioni fisiologiche come durante la maturazione sessuale e durante il ciclo. Affinchè si abbia una normale secrezione di gonadotropine, il GnRH deve essere secreto dall'ipotalamo in modo qualitativamente e quantitativamente regolare. La sua secrezione deve avvenire, cioè, in maniera pulsatile, con frequenza ed ampiezza comprese in un range abbastanza ristretto. L'importanza del ruolo del GnRH pulsatile nella secrezione delle gonadotropine è stato evidenziato

inizialmente in scimmie con lesioni dell'ipotalamo medio-basale, nelle quali l'infusione di GnRH pulsatile con frequenza di un *pulse* ogni ora è stata in grado di ripristinare il pattern ciclico di secrezione gonadotropinica caratteristico del ciclo mestruale con normale sviluppo follicolare, ovulazione e comparsa di flusso mestruale. Anche in donne con deficit congenito della secrezione di GnRH, la somministrazione pulsatile di tale ormone stimola la secrezione gonadotropinica, induce la maturazione puberale, riproduce l'andamento ormonale ciclico caratteristico del ciclo mestruale normale ed induce l'ovulazione.

Affinchè si abbia una regolare pulsatilità del GnRH per una normale secrezione di gonadotropine, è necessaria l'esistenza a livello ipotalamico di un generatore di *pulse* responsabile di tale meccanismo. Gli elementi cellulari costituenti tale *pace-maker* sono localizzati prevalentemente nel nucleo arcuato o immediata vicinanza, almeno per quanto riguarda l'ipotalamo della scimmia e dell'uomo. In scimmie *rhesus* castrate è possibile registrare, grazie ad elettrodi posizionati nell'ipotalamo medio-basale, un aumento dell'attività elettrica ad ogni *pulse* di LH rilasciato nella circolazione periferica, evidenziando la stretta relazione tra attività elettrica neuronale ipotalamica e secrezione episodica delle gonadotropine e fornendo un riscontro di tipo elettrofisiologico alla localizzazione del generatore di *pulse* a livello dell'ipotalamo medio-basale.

Alle secrezione pulsatile del GnRH corrisponde un'analogia pulsatilità delle gonadotropine ipofisarie. La pulsatilità dell'LH, tuttavia, non è secondaria alla sola secrezione pulsatile di GnRH, dalla quale, sotto alcuni aspetti, risulta essere indipendente. Come per l'ipotalamo, è stato dimostrato che l'ipofisi possiede *in vitro* una sua pulsatilità intrinseca, responsabile solo della secrezione pulsatile di bassa ampiezza ed alta frequenza dell'LH. Tale attività non sembra avere una funzione determinante *in vivo* ai fini della regolazione del ciclo mestruale.

Gli androgeni nella donna hanno 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. Quando parliamo di 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).

Estrogeni, progesterone ed androgeni esplicano la loro azione sui vari tessuti bersaglio attraverso il legame con specifici recettori che agiscono a

livello del DNA attivando o reprimendo l'espressione di alcuni geni, e che tali recettori sono ubiquitari nell'organismo umano.

In particolare, sono stati identificati due tipi di recettore per gli estrogeni, codificati da due diversi geni, denominati recettore α e recettore β per gli estrogeni (ER α ed ER β), appartenenti alla superfamiglia dei recettori steroidei.

La distribuzione dei due tipi recettoriali varia a seconda dei tessuti. La mammella, l'apparato urogenitale, l'osso, il sistema cardiovascolare, il sistema nervoso centrale e l'asse ipotalamo-ipofisi presentano concentrazioni diverse dei due recettori in diverse condizioni fisiologiche e patologiche.

Anche per il progesterone esistono due tipi di recettore, denominati A e B, che sono espressi dallo stesso gene ed appartengono anch'essi alla superfamiglia dei recettori steroidei. L'interazione dei diversi agenti ad attività progestinica con i due tipi di recettori condurrà a effetti variabili a seconda dei tessuti e delle condizioni fisiologiche e patologiche, in dipendenza del prevalere dell'uno o dell'altro tipo di recettore e delle caratteristiche del ligando.

Nella donna, i recettori per gli androgeni sono stati localizzati a livello della pelle perineale e pubica, dei follicoli piliferi pubici ed ascellari, delle ghiandole sebacee e dell'utero; sono stati, inoltre, identificati a livello

dell'ipotalamo e dell'ipofisi, dei muscoli scheletrici, del fegato e del midollo osseo. I tessuti che operano esclusivamente per mezzo del testosterone sono i derivati del dotto wolffiano, mentre i follicoli piliferi e i derivati del seno urogenitale e del tubercolo urogenitale richiedono la trasformazione del testosterone in DHT. Il processo di aromatizzazione si verifica a livello ipotalamico. Nelle cellule in cui si verifica la trasformazione del testosterone in DHT, all'interno del nucleo sarà presente soltanto DHT che attiva la produzione di mRNA. Tale processo, avendo entrambi gli ormoni alta affinità per lo stesso recettore androgeno, è necessario affinché si abbia un'amplificazione dell'azione androgena, in relazione alla maggiore affinità del recettore stesso per il DHT.

La sequenza aminoacidica del recettore androgeno nel domain legante il DNA è molto simile a quella dei recettori per i mineralcorticoidi e i glucocorticoidi e, in particolare, a quella del recettore per il progesterone. Così, gli androgeni ed i progestinici possono reagire in modo crociato con i loro recettori, ma solo nel caso in cui siano presenti in concentrazioni farmacologiche. L'espressione genica mediata dall'androgeno, inoltre, può anche essere modificata dagli estrogeni. Le risposte biologiche a livello tissutale saranno, in tal caso, determinate da interazioni geniche con i complessi ormone-recettore, l'androgeno con il proprio recettore e l'estrogeno con il suo. L'effetto biologico definitivo riflette l'equilibrio

delle azioni dei diversi ormoni con i loro rispettivi recettori, modificati dai vari regolatori di trascrizione.

I campi di utilizzo degli ormoni sessuali in terapia in medicina sono molteplici e variano dal trattamento delle disfunzioni endocrine alla terapia sostitutiva della postmenopausa, dalla contraccezione al trattamento medico dei tumori e della sterilità.

Capitolo 1 Ormoni sessuali femminili e metabolismo osseo

1a. Steroidi gonadici e regolazione del turnover osseo

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 deficitari del 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 osso 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 e 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'osteoide, 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.

Per comprendere quanto gli estrogeni influenzino il turnover osseo, basta pensare che il deficit estrogenico determina, negli anni postmenopausali, una riduzione della massa ossea di circa il 20-30% a livello dell'osso trabecolare e di circa il 5-10% a livello dell'osso corticale. Più precisamente Genant *et al.*, in uno studio longitudinale della durata di due anni effettuato su donne sottoposte ad ovariectomia, hanno riscontrato una perdita di massa ossea del 18% a livello dell'osso trabecolare e del 4% a livello dell'osso corticale. Recker *et al.* e Guthrie *et al.* hanno invece effettuato studi longitudinali rispettivamente su 75 e 224 donne in perimenopausa. Nei 3 anni precedenti alla menopausa Recker *et al.* hanno riscontrato una perdita di densità ossea pari al 4% associata al calo dei livelli sierici di estrogeni, mentre Guthrie *et al.* hanno riscontrato una perdita pari solo all'1-2%. Recker *et al.* hanno inoltre riportato una perdita di circa il 7% nei tre anni successivi alla menopausa. I risultati di questi studi dimostrano la stretta correlazione tra la riduzione della densità ossea e il decremento dei tassi plasmatici di estrogeni. Il calo dei tassi estrogenici causa infatti, negli anni immediatamente successivi alla menopausa, una fase di riduzione della massa ossea abbastanza rapida a carico soprattutto dell'osso trabecolare che si continua, dopo quattro - cinque anni dalla menopausa, in una fase più lenta ma prolungata che colpisce anche l'osso corticale. Il calo dei tassi estrogenici conseguente

alla menopausa si accompagna ad un aumento del numero di BMU che determina un incremento del processo di rimodellamento. 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-E₂ (PGE₂). 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. Con la menopausa si assiste infatti ad un incremento del riassorbimento osseo del 90%, mentre la neoapposizione è incrementata solo del 45%. 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. La riduzione dei livelli di estrogeni conseguente alla menopausa determina anche

modifiche qualitative dell'architettura dell'osso: gli osteoclasti infatti iniziano ad erodere più in profondità, fino a determinare la rimozione di intere trabecole ossee. Le trabecole residue risultano peggio interconnesse tra loro. Questa erosione più profonda si spiega col fatto che gli estrogeni promuovono l'apoptosi degli osteoclasti maturi e quindi un deficit di estrogeni provoca un aumento della sopravvivenza degli osteoclasti. Più specificamente 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.

Ib. Contraccezione ormonale e metabolismo osseo

Gli effetti esercitati dalla contraccezione ormonale sul metabolismo osseo sono stati oggetto di ampio dibattito negli ultimi anni.

Da un lato, infatti, si era tentati ad attribuire un effetto benefico della somministrazione di estroprogestinici sul metabolismo osseo, sulla scorta di quanto dimostrato nelle pazienti in postmenopausa, nelle quali la somministrazione di terapie estroprogestiniche protegge dall'osteoporosi.

Dall'altro invece, ci si chiedeva se la quantità di estrogeni somministrata con i contraccettivi combinati fosse in grado di ovviare alla diminuita sintesi di estrogeni conseguente all'azione ovariostatica del farmaco.

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 possa 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 combinati è stato quello di migliorarne il profilo di sicurezza e di tollerabilità, senza comprometterne l'efficacia. La ricerca farmacologica ha condotto alla formulazione di regimi fasici, di preparati con dosaggi inferiori di estrogeno e di nuove molecole progestiniche.

Paoletti et al. hanno dimostrato con uno studio prospettico, randomizzato e controllato che l'assunzione per un anno di contraccettivi orali contenenti 20 o 30 µg di etinilestradiolo più 75 mg di gestodene in donne giovani adulte (22-30 anni) è associata ad una riduzione dei parametri di riassorbimento osseo.

Solo pochi studi, invece, 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. Al fine di valutare quale fosse il reale impatto di COCs a diverso dosaggio estrogenico ed a differente componente progestinica sul turnover osseo e sulla BMD, il nostro gruppo ha condotto tre studi longitudinali, ciascuno della durata di 12 mesi, su donne giovani, fertili ed in buona salute assumenti contraccettivi orali.

I parametri considerati per la determinazione qualitativa degli effetti di tali formulazioni sull'osso sono stati: l'escrezione urinaria di piridinolina (PYD) e deossipiridinolina (D-PYD), indici di riassorbimento osseo, e la concentrazione sierica di osteocalcina (BGP), marker di osteoformazione.

Inoltre, abbiamo valutato la BMD mediante esame DEXA (dual-energy X-ray absorptiometry) eseguito a livello del tratto lombare della colonna prima e dopo lo studio.

Nel nostro primo studio abbiamo valutato gli effetti sull'osso di tale formulazione a bassissimo dosaggio, confrontandola con il COC contenente 20 µg di etinilestradiolo e 75 mg di gestodene, somministrato per 21 giorni e con un gruppo di controllo non trattato. I nostri risultati hanno dimostrato che entrambe le formulazioni esercitano un effetto positivo sul metabolismo osseo. Infatti, nei gruppi trattati abbiamo riscontrato una significativa riduzione di PYD e di D-PYD a partire dal terzo mese di trattamento rispetto ai valori basali e del gruppo di controllo. Tra i due gruppi di trattamento non sono state osservate differenze statisticamente significative nel corso dell'intero periodo di assunzione della pillola.

Nei gruppi trattati, inoltre, si è verificata una lieve, non significativa diminuzione dei livelli sierici di osteocalcina rispetto ai valori basali e del gruppo di controllo. Nella valutazione a 12 mesi non sono state riscontrate differenze significative nei valori della BMD nei tre gruppi di studio.

Nel nostro secondo studio abbiamo messo a confronto il COC contenente 30 µg di etinilestradiolo e 3 mg di drospirenone con il COC contenente 30 µg di etinilestradiolo e 75 mg di gestodene, entrambi assunti per 21 giorni e con un gruppo di controllo non trattato. I nostri dati hanno confermato l'azione protettiva sull'osso sia dell'associazione etinilestradiolo/drospirenone che etinilestradiolo/gestodene, con una

significativa riduzione dei livelli di piridinolina e di deossipiridinolina e una lieve, ma non significativa, diminuzione dell'osteocalcina.

Nel gruppo trattato con il drospirenone abbiamo riscontrato una maggiore, sebbene non significativa, riduzione dei valori di PYD e di D-PYDLa BMD non ha subito modificazioni a 12 mesi.

Nel nostro ultimo studio abbiamo, infine, valutato gli effetti esercitati sull'osso e sulla BMD dall'associazione 30 µg di etinilestradiolo/3 mg di drospirenone e 20 µg di etinilestradiolo/3 mg di drospirenone. I nostri dati hanno confermato quanto dimostrato negli studi precedenti ed hanno evidenziato, inoltre, che il COC contenente 20 µg di etinilestradiolo/3 mg di drospirenone conserva gli stessi effetti benefici sull'osso esercitati dall'associazione 30 µg di etinilestradiolo/3 mg di drospirenone.

Recentemente il nostro gruppo ha effettuato una review sistematica degli studi pubblicati sull'effetto dei contraccettivi ormonali sul metabolismo osseo nell'uomo.

In particolare abbiamo ricercato tutti gli studi pubblicati tra Gennaio 1975 e Febbraio 2011 aventi come outcome primario le variazioni della densità minerale ossea (BMD) o del rischio di frattura in pazienti trattate con contraccettivi ormonali. Gli studi inclusi nella review sono stati suddivisi in tre categorie: studi sui contraccettivi orali combinati, studi sulla contraccezione con solo progestinico e studi sulla contraccezione per via

transdermica o vaginale. Per ogni categoria abbiamo analizzato l'effetto della terapia contraccettiva sulla BMD e sul rischio di frattura.

A causa della marcata eterogeneità degli studi riguardo all'età dei partecipanti, al sito ed alla metodica di misurazione della BMD e alla durata del follow-up, non abbiamo effettuato una metanalisi quantitativa degli studi.

I dati raccolti nella nostra review derivati da studi prospettici randomizzati controllati suggeriscono che la terapia con contraccettivi orali combinati non esercita effetti significativi nella popolazione generale. Tuttavia va sottolineato come non esistano studi randomizzati controllati aventi come endpoint primario l'incidenza di frattura e come, mentre per le donne in postmenopausa è ben accertata la correlazione tra riduzione della BMD e aumento del rischio di frattura, tale correlazione non appare invece pienamente chiara nelle donne in età fertile che sono quelle che utilizzano i contraccettivi. Pertanto sarebbero necessari ulteriori studi randomizzati controllati sul rischio di frattura, poiché le migliori evidenze a tale riguardo derivano da studi di coorte. Diversi studi suggeriscono che l'assenza di effetti della terapia con contraccettivi orali sulla BMD nella popolazione generale mascheri in realtà effetti differenti nei diversi sottogruppi. Per questo abbiamo analizzato separatamente gli studi sulle adolescenti e quelli sulle donne in perimenopausa. Nelle adolescenti gli

effetti dei contraccettivi orali sulla BMD sembrano dipendere strettamente dalla dose di estrogeni contenuta nei preparati, essendo i contraccettivi contenenti 30 µg di etinilestradiolo sufficienti a garantire il raggiungimento di un adeguato picco di massa ossea da parte delle adolescenti. Al contrario i contraccettivi contenenti 20 µg non sarebbero in grado di garantire il raggiungimento di un adeguato picco di massa ossea.

Tuttavia va sottolineato come in letteratura non esistano studi randomizzati controllati sugli effetti della contraccezione ormonale nelle adolescenti e come i dati riportati derivino esclusivamente da studi osservazionali.

Riguardo all'utilizzo dei contraccettivi orali nelle donne in perimenopausa, invece, i dati della nostra review suggeriscono che tali farmaci determinano in queste donne un incremento significativo della BMD già alle dosi di 20 µg di etinilestradiolo.

I dati di numerosi studi prospettici randomizzati suggeriscono che l'utilizzo di medrossiprogesterone acetato in formulazione depot si associa ad una significativa riduzione della BMD. Sebbene i dati disponibili sembrano suggerire che tale decremento della BMD sia parzialmente reversibile alla sospensione del trattamento, sono necessari ulteriori studi per chiarire se le donne adulte ritornino alla sospensione del

trattamento ai valori di BMD precedenti all'inizio della terapia e se la terapia influenzi negativamente il raggiungimento del picco di massa ossea nelle adolescenti una volta sospesa. Dalle evidenze disponibili inoltre, non siamo in grado di derivare dati sul rapporto tra utilizzo di medrossiprogesterone acetato in formulazione depot e rischio di frattura. Gli altri tipi di contraccettivi con solo progestinico non sembrano esercitare alcun effetto significativo sulla BMD, sebbene i dati disponibili siano estremamente limitati. Similmente l'utilizzo del cerotto transdermico e dell'anello vaginale non sembra associarsi a variazioni significative della BMD, sebbene siano necessari studi su popolazioni più ampie per confermare questi dati.



ELSEVIER

Contraception 86 (2012) 606–621

Contraception

Review article

Hormonal contraception and bone metabolism: a systematic review

Carmine Nappi*, Giuseppe Bifulco, Giovanni A. Tommaselli,
Virginia Gargano, Costantino Di Carlo

Department of Obstetrics and Gynecology, University of Naples "Federico II," 80131 Naples, Italy
Received 28 February 2012; revised 19 April 2012; accepted 23 April 2012

Abstract

Background: Although a large amount of studies in the literature evaluated the effects of hormonal contraception on bone, many questions remained still unclear, such as the effect of these therapies on fracture risk.

Study Design: We performed a systematic search of the published studies from January 1975 through January 2012 on the effects of hormonal contraceptives on bone metabolism. We analyzed the overall effect on bone mineral density (BMD) and on fracture risk of combined oral contraceptives (COCs), progestogen-only contraceptives, transdermal contraceptives and vaginal ring.

Results: COC therapy does not seem to exert any significant effect on BMD in the general population. In adolescents, the effects of COCs on BMD seem to be mainly determined by estrogen dose. The use of COCs in perimenopausal women seems to reduce bone demineralization and may significantly increase BMD even at a 20-mcg dose. Use of depot medroxyprogesterone acetate is associated with a decrease in BMD, although this decrease seems to be partially reversible after discontinuation. Data on other progestogen-only contraceptives, transdermal patch and vaginal ring are still limited, although it seems that these contraceptive methods do not exert any influence on BMD.

Conclusions: Hormonal contraceptives do not seem to exert any significant effect on bone in the general population. However, other randomized controlled trials are needed to evaluate the effects on fracture risk since the data available are derived from studies having the effects on BMD as the primary end point, and BMD may not accurately reflect the real fracture risk.

© 2012 Elsevier Inc. All rights reserved.

Keywords: Contraceptives; Bone mineral density; Fracture risk

1. Introduction

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 [1–3]. As revealed by in vitro and in vivo studies, estrogens are also important factors in the regulation of bone tissue metabolism [2]. These effects are of utmost importance, in particular during adolescence and after the menopause. Indeed, estrogens are very important for acquiring an adequate peak bone mass during youth, and the fall of their circulating levels during the postmenopausal period induces a fast resorption of bone tissue. Both these

actions concur in determining the risk of developing osteoporosis and bone fractures.

Today, the use of combined or progestogen-only contraceptives for long periods is a worldwide habit, with millions of hormonal contraceptive users. Hormonal contraceptives induce a reduction of estrogen and a suppression of progesterone endogenous production by the ovaries. In these women, 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 steroid levels, bone tissue metabolism might be affected. This holds particularly true during adolescence, when the hypothalamus–pituitary–ovary axis is not completely mature, and during the perimenopausal period, when circulating levels of estrogens and progesterone may be reduced.

In the last decades, the modification of sexual habits among teenagers and the increase of sexual activity in the late 40s induced a significant increase of hormonal

* Corresponding author. Tel.: +39 0817462979; fax: +39 0817462905.
E-mail address: costantino.dicarlo@unina.it (C. Nappi).

contraception use in these ages [4]. The particular hormonal profiles of adolescents and perimenopausal women may expose hormonal contraceptive users of these age periods to modifications of bone metabolism that may respectively prevent the peak bone mass to be reached or induce an early bone loss, finally leading to an increased risk of developing osteoporosis.

In this review, we will briefly analyze the effects of sex steroids on bone formation and resorption via osteoblast and osteoclast activity and discuss *in vivo* studies on animal models evaluating the impact of sex hormones on bone. Furthermore, a systematic review of the data present in the literature dealing with the effect of different hormonal contraceptive formulations on BMD and fracture risk will be performed.

2. Methods

In the first part of this review, the effects of sex hormones on bone metabolism *in vitro* on animal and human tissues and *in vivo* on animals are discussed.

In the second part of the review, we performed a systematic search of the published studies on the effects of hormonal contraceptives on bone metabolism in humans.

We searched for all studies published from January 1975 through January 2012 that report on BMD or fracture outcomes by use of hormonal contraceptives. The following search strategy was executed using the keywords “contraceptives” or “oral contraceptives” or “contraceptive patch” or “contraceptive devices” or “contraceptive ring” or “progestogen only contraception” or “injectable contraceptives” in combination with “bone mineral density” or “bone mineral content” or “bone turnover” or “osteoporosis” or “fracture risk” and searching the following database: PubMed, Embase, Science Citation Index and Cochrane Database of Systematic Reviews.

The search results were then limited to studies in humans but were not limited by language. Reference lists from these articles were hand searched to identify additional articles.

Two authors (G.A.T. and V.G.) independently scrutinized abstracts and retrieved full articles of all citations that were likely to meet the predefined criteria. At the first screening, titles were investigated in order to discard duplicated and to exclude nonrelevant studies. The remaining studies were screened reading the abstracts and included if data on the effects of hormonal contraceptives on BMD values or fracture risk were reported. Studies on women with specific circumstances (e.g., those with anorexia nervosa and endurance athletes) were excluded because of the peculiarity of the subjects studied. We also excluded studies of women who had conditions or diseases known to affect BMD, such as hyperthyroidism, anorexia and premature menopause. The included studies, along with uncertain items, underwent a third screen, during which full articles were collected and read. During this phase, study design, number of patients and

the effect of confounding variables to assess the risk of any study bias were evaluated. All case reports or analyses not reporting the consequences were excluded. Any discrepancy between the screening results was discussed by all the authors, and consensus was reached.

Data extraction was conducted by two reviewers (C.D.C. and V.G.) independently. The data extracted were inputted in an Excel spreadsheet. These included the study design, number of patients and main outcome measure.

Because studies were heterogeneous with regard to age of participants, site and method of BMD measurement and length of follow-up, we did not compute summary estimates. Studies analyzed were divided into three categories: studies about combined oral contraceptives (COCs), studies about progestogen-only contraception and studies about transdermal contraceptives and vaginal ring. For each category, we analyzed the overall effect of the contraceptive on BMD on fracture risk.

3. Bone tissue composition and the process of bone formation and resorption

The skeleton is a metabolically active organ undergoing a continuous process of remodeling throughout life. This remodeling is necessary both to maintain the structural integrity of the skeleton and for the metabolic function of calcium and phosphorus storage [5]. 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. The first step in bone formation is the deposition of mineralized tissue at specific sites, generally preceded by a cartilage analogue. The lengthening of bone involves an orderly sequence of replacement of cartilage by bone, called *endochondral* bone formation. Another mechanism of bone formation in which bone is formed independently of cartilage is the *membranous* bone formation, which takes place particularly in the flat bones, such as those of the skull. However, also in this case, bone formation takes place adjacent to a cartilage template. Bone remodeling begins early in fetal life and depends on the interactions of two cell lines, the mesenchymal osteoblastic and the hematopoietic osteoclastic. The activation stage involves the interaction of osteoclast and osteoblast precursor cells (Fig. 1). This process leads to the differentiation, migration and fusion of the large multinucleated osteoclasts [6]. The differentiation pathway for osteoclasts is illustrated in Fig. 2. These cells attach to the mineralized bone surface and initiate resorption through the secretion of hydrogen ions and lysosomal enzymes, particularly cathepsin K, which can degrade all the components of bone matrix. The attachment of osteoclasts to bone may require specific changes in the so-called *lining cells* on the bone surface, which can release proteolytic enzymes to uncover a mineralized surface [7]. Osteoclastic resorption produces irregular scalloped cavities on the trabecular bone surface, called Howship lacunae, or

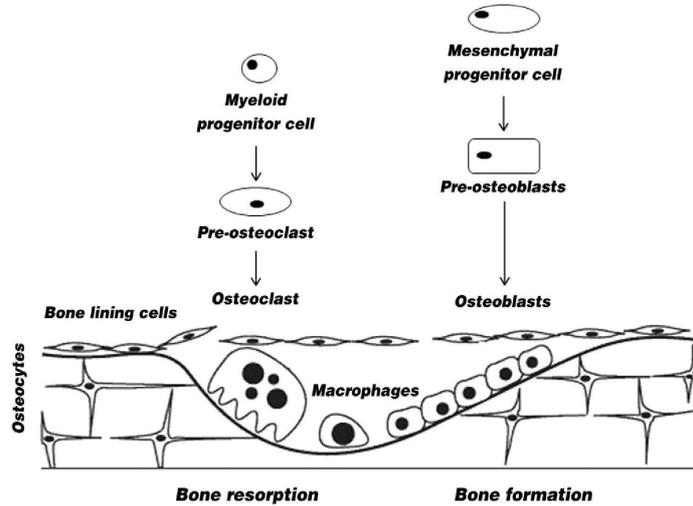


Fig. 1. Bone remodeling process.

cylindrical Haversian canals in cortical bone. Once the osteoclasts have completed bone removal, there is a *reversal* phase during which mononuclear cells, which may be of the macrophage line, are seen on the bone surface. The events during this stage are not well understood, but they may involve further degradation of collagen, deposition of proteoglycans to form the so-called cement line and release of growth factors to initiate the formation phase. During the final *formation* phase of the remodeling cycle, the cavity created by resorption can be completely filled in by successive layers of osteoblasts, which differentiate from their mesenchymal precursors and deposit a mineralizable matrix [8]. The precursor mesenchymal or stromal stem cell for osteoblasts is multipotential and can also differentiate into adipocytes or marrow support cells and, possibly, into fibroblasts, muscle cells or cartilage cells [9].

4. Effects of sex steroids on bone formation and reabsorption

The effects of sex steroids on bone tissue in women are made evident by the changes that occur after menopause, when women undergo a 20%–30% reduction in BMD at trabecular bone and a 5%–10% reduction at cortical bone [10]. Maintenance of bone tissue by estrogens has been attributed to both their antiresorptive and anabolic effects [11,12]. However, loss of bone mass in the first few years after menopause is associated not only with increased bone resorption but also with increased — not decreased — bone formation [11,12].

Progesterone appears to play a role in partnership with estrogen, mainly, in achieving optimal peak bone mass acting in partnership with estrogen [13].

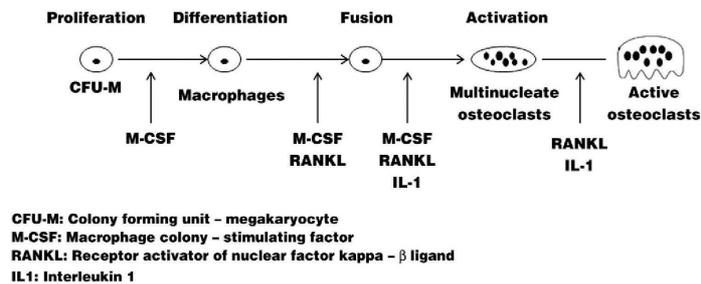


Fig. 2. Differentiation pathway for osteoclasts and involved cytokines.

4.1. Effects of estrogens on bone: *in vitro* studies and *in vivo* studies in animals

Estrogen receptors (ERs) are expressed by osteoblasts [14–16], osteoclasts [17,18] and osteocytes [19]. Immunological studies demonstrated that ER α is preferentially expressed in cortical bone, while ER β is preferentially expressed in trabecular bone [20].

Estrogens suppress osteoclastogenesis and inhibit bone resorption by osteoclasts [21]. Estradiol (E₂) decreases the expression of lysosomal enzymes in osteoclasts and decreases the depth of resorption lacunae [22–25].

However, also osteoblasts express ER and estrogens slow the rate of bone remodeling by suppressing both osteoclastogenesis and osteoblastogenesis. Indeed, the antiresorptive effect of estrogens is mediated by attenuating cell proliferation early in the osteoblast lineage [26,27]. Treatment of osteoblasts with E₂ results in an accelerated apoptosis of cocultured osteoclasts [28]. Moreover, estrogens may stimulate osteoclast apoptosis acting directly on the osteoclast itself in a cell autonomous manner [29–31].

An important pathway influenced by estrogens is the receptor activator of nuclear factor kappa-B (RANK)/RANK ligand (RANKL)/osteoprotegerin (OPG) system [32–34] (Fig. 3). E₂ attenuates RANK/RANKL signaling by stimulating OPG biosynthesis in osteoblasts [35]. *In vivo*, in humans, no significant difference in RANK/RANKL and OPG serum levels was detected between patients treated with hormone replacement therapy (HRT) and untreated postmenopausal women [36], indicating that the effects of E₂ take place at a local level.

Most animal studies concerning the role of estrogens in bone metabolism have been carried out in the rat [37]. The effects of ovariectomy in the rat include a decrease in BMD, cancellous bone area and bone strength, whereas an

increase is observed in radial and longitudinal growth, osteoblast and osteoclast activity and overall rates of bone turnover [38]. Estrogen replacement, including those compounds with mixed agonist/antagonist activity, has been shown to reverse several of the effects induced by ovariectomy [39].

Evidence from studies using knockout mice suggests that estrogens play an important role in maintaining BMD through inhibition of bone resorption [40].

Data from studies in rats also suggest that estrogen loss modifies the concentration and the activity of cytokines involved in osteoblasts and osteoclasts synthesis [26,41–51].

4.2. Effects of progesterone and progestins on bone: *in vitro* studies and *in vivo* studies in animals

Progesterone nuclear receptors are present in human osteoblasts [52–54] and osteoclasts [55]. When considering a progestin drug, it is not clear whether its activities on bone can be ascribed to its progestational activity or to other intrinsic hormonal actions. Besides their progestational activities, indeed, progestogens exert androgenic, corticosteroidal and even estrogenic activities. Furthermore, from a practical point of view, of more interest and importance is the question of whether progestins can interact with the estrogen effects on the skeleton.

In this regard, it is interesting to note that a “pure progestogen” (i.e., binding only to the progesterone receptor), Org 2058, had no effect on cell proliferation when added alone to SaOS-2 human osteogenic osteosarcoma cells. However, in combination with E₂, it had a highly synergistic action on cell proliferation [56].

Long-term (7–21 days) exposure to physiological levels of progesterone leads to a dramatic increase of Alkaline Phosphatase (ALP), a marker of osteoblast differentiation,

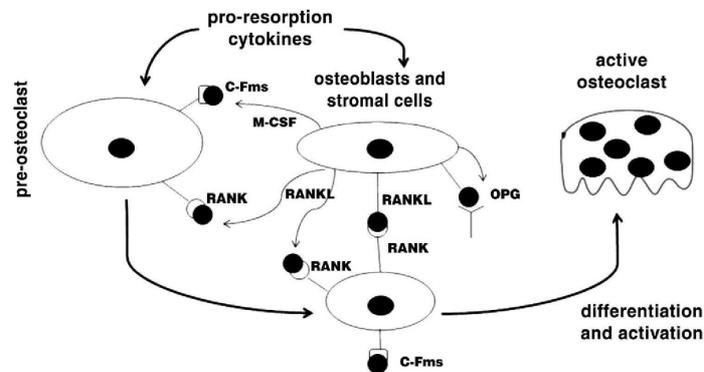


Fig. 3. RANK/RANKL/OPG system. The binding of RANKL to RANK on osteoclasts precursor cells activates the differentiation of these cells toward the osteoclastic pathway, thus promoting bone resorption. OPG binds RANK and inhibits its binding to RANK, thus blocking osteoclasts activation.

while a supraphysiological progesterone concentration causes a significant reduction in ALP. These results suggest an osteoanabolic function of progesterone, while showing for the first time that supraphysiological progesterone concentrations suppress osteoblast differentiation [57].

In animal models, reports on the effects of progesterone on BMD have been variable and are influenced by estrogen, the dose of progesterone administered, skeletal site analyzed and the stage of skeletal maturation [58,59].

A high cancellous bone mass phenotype was reported in female progesterone receptor knockout mice (PRKO) in the proximal tibia metaphysis at 26 weeks of age [60].

Interestingly, the progesterone antagonist, RU486, prevents bone loss in estrogen-deficient rats [61], while it does not stimulate bone formation when used at the same dose in normal, estrogen-intact, sexually mature rats [62]. The Yao et al [63] found that, compared to the wild type littermates, PRKO female mice had accelerated bone formation and cancellous bone gain in the distal femoral metaphysis between 1 and 3 months of age, and the cancellous bone mass was maintained thereafter. Moreover, the PRKO female mice demonstrated a more significant gain in bone mass during the linear bone growth period (between 1 and 3 months of age) compared to the wild type controls. Additionally, treatment with RU486, during the rapid growth period (1–3 months of age), accelerated bone mass

acquisition by stimulating bone formation in the female wild type mice.

5. Effects of hormonal contraceptives on bone metabolism: in vivo studies in humans

5.1. Studies evaluated

Fig. 4 summarizes the search process with inclusion and exclusion criteria and the numbers of studies that were included and excluded. Searching through databases and other sources, we identified 1899 studies matching the search criteria. After duplicates and nonrelevant studies were removed, 1337 studies that were screened remained and studies reporting data on the effects of hormonal contraceptives on BMD values or fracture risk were included. After excluding studies on women with specific circumstances and studies on women who had conditions or diseases known to affect BMD, 142 studies that were evaluated for inclusion in the qualitative synthesis remained. Case reports, analyses not reporting the consequences and studies with a sample size <50 were excluded, leaving 129 studies. Studies analyzed were divided into three categories: studies about COCs, studies about progestogen-only contraception and studies about transdermal contraceptives and vaginal ring. The effects of COCs on bone were evaluated in the general

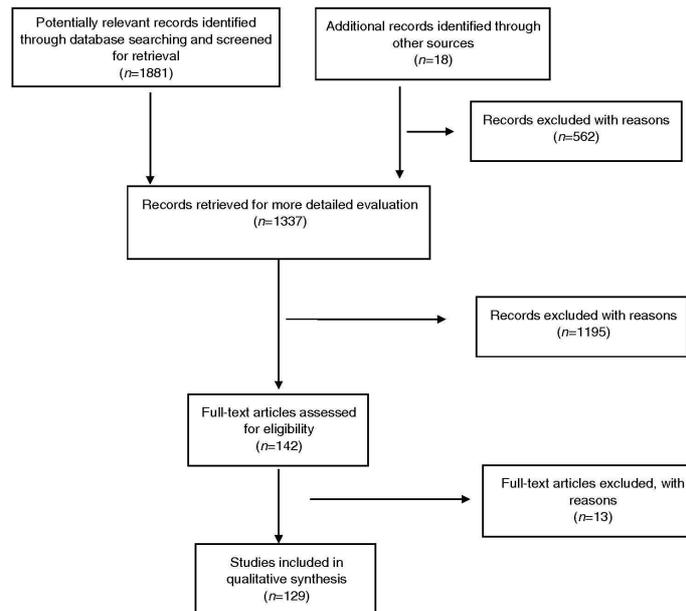


Fig. 4. Flowchart summarizes the search process with inclusion and exclusion criteria, and the numbers of studies that were included and excluded.

population, adolescents and perimenopausal women. For each category, we analyzed the overall effect of the contraceptive on BMD and on fracture risk.

5.2. COCs

5.2.1. General population

A large amount of studies in the literature evaluated the effects of hormonal contraception on bone. Several well-performed reviews examined this subject in recent years [64–66]. The research falls into two broad categories: studies investigating BMDs and studies on fracture risk. BMD is considered a surrogate marker of risk fracture since it is very difficult and time-consuming to perform a randomized controlled trial having the incidence of fracture as the first end point. 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), which recommends using this measurements to screen for osteoporosis in postmenopausal women [67], but the relationship between BMD and fracture risk in premenopausal women, including those using hormonal contraceptives, is still poorly understood. Moreover, although it has been clearly demonstrated that the risk of osteoporosis fracture increases as BMD values decrease [68–71], other factors also can contribute to fracture risk. Data on COCs use and fracture risk are summarized in Table 1.

All randomized controlled studies [72–78] on the effects of COCs on bone used surrogate markers (BMD and bone turnover markers) as end points and not fractures.

Indeed, the studies generally had sufficient duration to detect changes in BMD, not to detect a variation in fracture incidence. Data derived from cohort prospective studies

having the fracture risk as the primary end point found an increased risk in women treated with COCs. Indeed, Cooper et al. [79] performed a study on a cohort of 46,000 women, finding that the risk of subsequent fractures among the women who had ever-used COCs was significantly greater than that among women who had never used it [relative risk (RR), 1.20; 95% confidence intervals (CIs), 1.08–1.34]. Another large cohort study found a highly significant trend ($p < .001$) of increased risk of all fractures with increased duration of COCs use [80]. The authors also found that current or recent (within 1 year) COCs users had a significant 30% increased risk of fracture (RR, 1.30; 95% CI, 1.1–1.5), compared to never-users [80]. Both of these studies included relatively few observations on women > 50 years of age and practically none > 65 years, and the relative short follow-up might not allow the evaluation of a potential, positive, long-term effect of COCs. Moreover, the authors hypothesized an effect of confounding variables such as smoking and alcohol use [80]. A third cohort study found that COCs use is associated with a small, statistically significant increased risk of fracture in postmenopausal women compared with never-users (relative hazard, 1.07; 95% CI, 1.01–1.15) [81].

As expected, due to the limitations of the study design, data from case-control, retrospective studies are conflicting.

La Vecchia et al. [82] performed a case-control study on women with a wide range of ages, finding that ever-users were just as likely as never-users to have a hip fracture. However, this study is limited by a small number of cases. A case-control study on 1327 Swedish women older than 50 years with hip fracture reported that past use of COCs was associated with a 25% reduction of hip fracture risk [83]. However, most oral contraceptives used in this study involved high ethinylestradiol (EE) doses (50 mcg). In Denmark, a nationwide case-control study on all women with a fracture in the year 2000 indicated a small increase in

Table 1
Studies on COCs use and fracture risk

Author	Study design	Number of patients	Main results
Cooper et al. [79]	Cohort prospective	46,000	Risk of fractures among the women who had ever-used COCs significantly greater than that among women who had never used COCs
Vessey et al. [80]	Cohort prospective	17,032	increased fracture risk with total duration of COCs use
Michaelsson et al. [83]	Case control, retrospective	1327	Past use of COCs associated with a reduction of hip fracture risk
La Vecchia et al. [82]	Case control, retrospective	279	No difference in hip fracture risk between ever-users and never-users of COCs
Barad et al. [81]	Cohort prospective	93,725	Slight increased risk of fracture in women with a history of short-term (≤ 5 years) COCs use; no significantly increased risk in women who had used COCs for more than 5 years
Vestergaard et al. [84]	Case control, retrospective	64,548	Fracture risk for COCs users similar to that of nonusers
O'Neill et al. [86]	Case control, retrospective	62	Women with forearm fracture were significantly less likely to have used COCs than controls
O'Neill et al. [87]	Cross-sectional	7530	Women who had ever-used COCs less likely than never-users to have a vertebral deformity
Johansson and Mellstrom [88]	Case control, retrospective	10,000	Prevalence of repeated fracture significantly lower in COCs users than in nonusers
Wei et al. [102]	Cross-sectional	491	Consistent reduction in vertebral deformities in users, although most associations did not reach significance

fracture risk among past users of low-dose COCs [84]. However, when the analysis was adjusted for confounders such as comorbidities, fracture risk for COCs users was similar to that of nonusers. Regarding the risk of forearm fracture in COCs users, the only data available are from two cross-sectional studies [85,86]. Mallmin et al. [85] reported that use of COCs was not related to fracture risk, but that

there was a slight, nonsignificant trend toward decreasing fracture risk with increasing duration of COCs use. On the contrary, O'Neill et al. [86] performed a case-control study on 62 women who had sustained a fracture of the distal forearm and 162 controls, finding that women with forearm fracture were significantly less likely to have used COCs than controls [odds ratio (OR), 0.3; 95% CI, 0.1–0.9].

Table 2
Studies on COCs use and BMD

Author	Study design	Number of patients	Main results
Kritz-Silverstein and Barrett-Connor [96]	Cohort cross-sectional	239	Higher BMD at femoral neck and spine in women treated with COCs for 6 or more years
Kleerekoper et al. [98]	Cross-sectional, retrospective	2297	History of COCs use is protective against low BMD
Sultana et al. [100]	Cross-sectional, retrospective	100	Higher BMD at distal radius in COCs users than nonusers
Pasco et al. [101]	Cross-sectional	710	Greater mean BMD at the lumbar spine in women exposed to COCs
Reed et al. [94]	Longitudinal prospective	245	Similar BMD in COCs users and controls after 36 months
Wanichsetakul et al. [103]	Cross-sectional	59	No significant differences in BMD at all bone sites between COCs users and controls
Castelo-Branco et al. [93]	Longitudinal prospective	67	No significant differences in BMD after 2 years in COCs users in comparison to basal values
Berenson et al. [89]	Cohort longitudinal	191	no significant differences in BMD at lumbar spine after 2 years between COCs users and controls
Cobb et al. [90]	Cohort cross-sectional and longitudinal prospective	476	No significant differences in whole body BMD after 3 years in COCs users in comparison to basal values
Mazess and Barden[91]	Cohort longitudinal	300	No significant differences in BMD after 2 years in COCs users in comparison to basal values
Paoletti et al. [92]	Cohort longitudinal	54	No significant differences in BMD after 6 months in COCs users in comparison to basal values
Allali et al. [104]	Cross-sectional	410	No significant difference in BMD between COCs users and never-user control groups
Afghani et al. [105]	Cross-sectional	39	No significant influence of COCs on BMD
Garnero et al. [107]	Cross-sectional	208	No significant difference in BMD between COCs users and never-user control groups
Hall et al. [109]	Cross-sectional	165	No significant difference in BMD between COCs users and never-user control groups
Hartard et al. [111]	Cross-sectional	128	No differences in mean BMD in groups with short-term exercise but long or brief histories of OC
Hawker et al. [112]	Cross-sectional	963	No significant association between oral contraceptive use and BMD
Hreshchyshyn et al. [113]	Cross-sectional	352	No significant relationships between OC use and BMD at spine and femoral neck
Lloyd et al. [116]	Cross-sectional	25	Long-term, premenopausal COCs use has no effect on vertebral bone density
Murphy et al. [119]	Cross-sectional	841	No relationship between COCs use and BMD in the hip and spine in middleaged women
Ott et al. [121]	Cross-sectional	111	No significant difference in BMD between COCs users and never-user control groups
Perrotti et al. [122]	Cross-sectional	189	No significant difference in BMD between COCs users and never-user control groups at the distal and ultradistal section of the radius
Petitti et al. [123]	Multicentric, cross-sectional	2474	No significant differences in BMD between past users of COCs and never-users
Prior et al. [125]	Cross-sectional	524	BMD neither related to the duration of COCs use nor to age at first use; similar BMD values in current and past users
Sowers et al. [127]	Cross-sectional	86	No relationship between COCs use and BMD
Nappi et al. [73]	Prospective randomized controlled trial	56	At 3, 6, 9, and 12 months, no significant difference in spinal BMD values between COCs users and controls and in comparison with basal values
Nappi et al. [74]	Prospective randomized controlled trial	71	At 12 months, no significant difference in spinal BMD values between COCs users and controls and in comparison with basal values
Endrikat et al. [75]	Prospective, double-blind randomized controlled trial	48	No significant variations of BMD in COCs users during the 3-year observation period
Gargano et al. [76]	Prospective randomized controlled trial	65	At 12 months, no significant difference in spinal BMD values between COCs users and controls and in comparison with basal values

O'Neill and coworkers [87] also performed a cross-sectional study to evaluate the risk of vertebral deformity in women aged 50–79 years, finding that women who had ever-used COCs were less likely to have a vertebral deformity than never-users (OR, 0.76; 95% CI, 0.58–0.99).

The association between COCs use and repeated fractures was evaluated in a case-control study in Sweden [88]. Data from this study demonstrated that the prevalence of repeated fracture was significantly lower in COCs users than in nonusers among both smokers and nonsmokers.

Details from studies having as primary end point the effects of COCs on BMD are reported in Table 2. Studies reviewed by the Cochrane database review [66] are the only randomized controlled trials available on the effects of COCs on BMD, and they do not report any difference in BMD between users and nonusers [73–76]. However, these trials have also measured markers of bone turnover among women treated with COCs, finding an increase in markers of bone formation and a reduction in markers of resorption, even for COCs containing 20 or 15 mcg EE [73,75,76].

Data derived from longitudinal, nonrandomized studies are in agreement with these results [89–94]. In particular, Castelo-Branco et al. [93] performed a longitudinal non-randomized study on 67 women treated with a COC containing 35 mcg EE and 2 mg cyproterone acetate or 30 mcg EE and 150 mg desogestrel for 2 years. After 2 years, the authors did not find any significant difference in BMD in comparison to basal values. More recently, Reed et al. [94] performed a longitudinal study on 89 current COC users (80% using 30–35 mcg EE) and 156 nonusers, finding no differences between groups at 36 months in spine, hip and total BMD.

Data derived from cross-sectional studies are conflicting, with studies reporting COCs to be protective agents against low BMD [95–102] and studies that did not find any significant difference in BMD between users and nonusers [90,103–131].

However, the largest multisite cross-sectional study performed by Petitti et al. [123] report that current, short-term COCs users had a significantly higher BMD at the forearm than never-users but that the mean BMD decreased with longer therapies and, eventually, did not differ from BMD values among never-users.

In conclusion, the best evidence in the literature seems to suggest that COCs have no significant effects on BMD. However, it is important to underline that changes in BMD may not accurately reflect the real fracture risk and that its validity in the setting of steroidal contraceptive use is unknown. Moreover, studies on the effects of COCs on BMD are complicated by the influence on BMD by many factors such as inheritance, diet, exercise and smoking [132]. It is also difficult to find a control group that has never been previously exposed to contraceptive hormones, and often, women who start contraception (even during a clinical trial) discontinue after a short time, resulting in a high dropout rate. Finally, studies on BMD in COCs users are also

difficult to compare since they involve different types of COC and measure BMD at different sites using different techniques and different time intervals.

5.2.2. Adolescents

Increasing evidence seems to suggest that current COCs formulations may act differently in women who have not yet achieved peak bone mass as compared to skeletally mature women [65,133–135].

However, no randomized controlled trial on the effects of COCs on BMD in adolescents is available in the literature, so the clinical evidence on this subgroup is limited. Data derived from longitudinal cohort studies are conflicting, with some studies suggesting a beneficial effect on BMD [72,136] and others that failed to find any detectable effect [137,138].

In particular, data reported in a recent review [139] seem to suggest that COCs with 30 mcg EE are adequate to ensure a sufficient bone accrual during adolescence and a normal bone health into adulthood [72,140–142], while studies on COCs with 20 mcg of EE cast doubt on their ability to support peak bone mass acquisition [133,143–145]. The authors concluded that it is possible that the tonic E_2 level attained using a COC containing 20 mcg EE could be too low to promote an optimal bone metabolism in the adolescent.

Beksinska et al. [146] performed a cross-sectional study on young women aged 19–24 years after 4–5 years using exclusive progestin-only injectable contraception or mixed progestin injectable contraception/COCs contraception, finding a significantly lower BMD in patients treated with injectable contraceptives at the spine ($p=.042$), hip ($p=.025$) and femoral neck ($p=.023$). In the mixed COCs and injectable group, BMD values did not significantly differ from nonusers at all sites (spine $p=.54$, hip $p=.15$, femoral neck $p=.43$). As the COCs evaluated in this study contained 30–40 mcg EE, these data are in accordance with those from longitudinal studies. Very recently, Scholes et al. [147] reported results from a cross-sectional evaluation of both COCs length of use and estrogen dose on BMD in 606 women aged 14 to 30 years distributed into two age strata: adolescents (14–18 years) and young adult women (19–30 years). Among 14- to 18-year-olds, adjusted mean BMD values for duration of use and dose did not differ significantly between COCs users and nonusers at any anatomical site. However, in the 19- to 30-year-old group, adjusted mean BMDs at the spine and whole body were significantly lower in COCs users ($p=.004$ and $p=.02$, respectively) and lowest for >12 months of low-dose (<30 mcg EE) COCs for the hip, spine and whole body ($p=.02$, .003 and .002, respectively).

In conclusion, even though clinical evidence is poor, it may be hypothesized that low-dose COCs (<30 mcg EE) may be insufficient to support peak bone acquisition in adolescents, while >30 mcg EE COCs seem to have no effect. Indeed, the guidelines of WHO on criteria for contraceptive use published in 2009 [148] concluded that

adolescents using 20 mcg EE COCs have a lower BMD compared with non users, while higher-dose EE COCs have little to no effect. Randomized controlled studies are needed to confirm these data.

5.2.3. Perimenopausal women

Gambacciani et al. [149–152] performed four randomized prospective studies evaluating BMD at the hip, heel, spine and radius of perimenopausal women treated with COCs. In each study, women experiencing oligomenorrhea were randomized to COCs (20 mcg EE/150 mg desogestrel or 30 mcg EE/75 mg gestodene) or calcium (500 mg/day). Data from these studies demonstrated that BMD significantly increased in COC-treated perimenopausal women and significantly decreased in women taking calcium alone at all sites. Volpe et al. [153] found a slight, though not significant, bone mass improvement in women treated with COCs in a 36-month prospective study on perimenopausal women aged 46–53 years.

Shargil [154] performed a cohort study on 200 perimenopausal women, finding that women using nonhormonal contraception lost 6% of their bone mass over 3 years, while women treated with triphasic COCs (30 mcg EE/50 mg levonorgestrel, 40 mcg EE/75 mg levonorgestrel, 30 mcg EE/125 mg levonorgestrel) maintained their baseline BMD values.

In contrast with these data, cross-sectional studies evaluating BMD in perimenopausal women [155–159] failed to find any significant difference between COCs users (even current users) and nonusers.

Tacchakraichana et al. [160] demonstrated that COCs therapy is as good as HRT in preserving or increasing BMD in postmenopausal women. A cross-sectional study by Grainge et al. [161] examined the relationship between BMD and age at first use of COCs among postmenopausal women, finding that women in older categories for initiation (23–27 or 28–44 years old) had a lower BMD at all sites compared with women who were aged 15–22 years when they began using COCs. Several studies also demonstrated that a longer duration of exposure to COCs is associated with a greater effect on BMD [96,99,162]. A reduced fracture risk has been demonstrated in postmenopausal women treated with high-dose formulations of COCS after the age of 40 years [83].

A population-based study examined the association between self-reported fracture at any site and COCs use among perimenopausal women [155]. In this study, the prevalence of fracture did not differ between ever-users and never-users or by duration (in years) of COCs use.

In summary, evidence from prospective studies suggests that use of COCs in perimenopausal women may reduce bone demineralization and could significantly increase BMD even at a 20-mcg dose [163,164]. Most cross-sectional studies indicate that having ever-used COCs is not associated with differences in comparison to women who have never used COCs in BMD values at any anatomical site, after the

menopause. Moreover, there is no evidence that COCs use reduces the risk of fracture prior to the menopause.

5.3. Progestogen-only contraception

Many questions have been raised about the effects of progestogen-only contraceptive use on BMD and fracture risk, in particular among young women who have not yet reached peak bone mass and among perimenopausal women who may be starting to lose bone mass. Depot medroxyprogesterone acetate (DMPA) use has been associated with short-term bone loss, probably due to the lower ovarian estrogen production resulting from the suppression of gonadotropin secretion. Data on DMPA use and BMD are summarized in Table 3. Most of the evidence suggests that the use of DMPA before the achievement of peak bone mass is detrimental to bone [72,89,123,165–167]. Indeed, several cross-sectional studies demonstrated lower BMD at the spine, hip and distal radius in women currently using DMPA [89,123,165,167–169]. Moreover, longitudinal studies also demonstrated a decrease in hip and/or spinal BMD in women treated with DMPA for 1 to 2 years compared with nonusers over the same time period [72,166,167]. Kaunitz et al. [170] conducted a prospective cohort study comparing BMD in women initiating DMPA with BMD in women not using hormonal contraception. This study followed participants over 7 years, including 5 years of DMPA use and 2 years of follow-up after its use was discontinued. This study reported a loss of BMD at the spine of approximately –3% to –4% at 1 year, –4% to –5% at 2 years and –5.4% at 4.5 years. The loss of BMD at the hip followed a similar trend and was approximately –2% to –3% at 1 year, –3% to –4% at 2 years and –5.2% at 4.5 years. The loss of BMD was more pronounced during the first 2 years of use and stabilized thereafter. In contrast with these results, Viola et al. [171] recently published a cross-sectional study on 232 users of DMPA matched to a group of 232 copper intrauterine device (IUD) users. The authors did not detect a deleterious effect on forearm BMD among long-term DMPA users with less than 13 years of use; however, a significantly lower BMD was observed at 13–15 years of use in DMPA users when compared to IUD users [171].

Potential effects of DMPA on BMD have been also studied in adolescents. Results from cross-sectional studies demonstrated that the impact on BMD may be more pronounced in adolescents aged 12 to 18 years than in adults [140,141,143,169,172]. Cromer et al. [140] demonstrated a 1.5% and 3.1% decrease in lumbar spine BMD in adolescents treated with DMPA after 1 and 2 years of use compared with a 2.9% and 9.5% BMD increase in controls over the same time period. These findings seem to suggest that DMPA use in adolescents may prevent them from achieving normal peak bone mass.

Harel et al. [173] recently observed a BMD decrease of 2.7% at the lumbar spine, of 4.1% at total hip and of 3.9% at femoral neck in 98 adolescent aged 12–18 years after 240

Table 3
Studies on DMPA use and BMD

Author	Study design	Number of patients	Main results
Cundy et al. [169]	Cross-sectional	550	Significant reduction in BMD in patients treated with DMPA
Peititi et al. [123]	Multicentric, cross-sectional	2474	BMD statistically significantly lower in short-term current users of DMPA compared with those who never used hormonal contraceptives
Berenson et al. [72]	Prospective, controlled	155	DMPA has an adverse effect on BMD in comparison with OCs or nonhormonal methods, when used for 12 months
Albertazzi et al. [165]	Cross-sectional	218	Use of DMPA before achievement of peak bone mass may be particularly detrimental to bone.
Berenson et al. [89]	Longitudinal	191	Loss of BMD associated with DMPA use appears to be linear during the first 2 years of use.
Clark et al. [166]	Prospective longitudinal study	323	Hip and spine BMD declined after one DMPA injection, and this decline continued with each subsequent injection for 24 months.
Cundy et al. [169]	Cross-sectional	90	Women using DMPA have BMD values intermediate between those of normal premenopausal and postmenopausal controls.
Kaunitz et al. [170]	Cohort prospective	248	BMD declines during DMPA use; following discontinuation, significant increases in BMD occur through 96 weeks posttreatment.
Scholes et al. [172]	Cross-sectional	457	Use of DMPA is significantly associated with decreased BMD at the femoral neck, spine and trochanter; major differences in BMD between users and nonusers occurred in the youngest age group (18–21 years).
Lara-Torre et al. [141]	Cohort prospective	148	Statistically significant decrease in BMD of DMPA users at 6, 12, 18 and 24 months
Cromer et al. [143]	Cohort prospective	370	Significant decrease of BMD at lumbar spine in the DMPA group over 12 months
Viola et al. [171]	Cross-sectional	232	significantly lower BMD at 13–15 years of use in DMPA users when compared to IUD users

weeks of treatment with DMPA. This decline in BMD was more pronounced in patients who received more DMPA injections. However, the authors demonstrated that within 60 weeks of discontinuation of DMPA, the mean lumbar spine BMD returned to baseline levels, while the mean BMD at total hip and femoral neck recovered to baseline values after 240 and 180 weeks, respectively.

According to these results, data from many previous studies seem to suggest that the reduction of BMD associated with DMPA administration is partially reversible after discontinuation [123,174–176]. The largest longitudinal study demonstrated that DMPA former-users and never-users had similar spine and hip BMD 3 years after discontinuation [176]. Recently, Gai et al. [177] performed a study on 68 women aged between 25 and 40 years using DMPA for 24 months and 59 women aged between 25 and 40 years using nonhormonal contraception. At 24 months of treatment, as compared to baseline, the mean BMD of DMPA users in lumbar spine and femoral neck decreased by 5.52% and 6.35%, respectively. BMD at lumbar spine and femoral neck significantly decreased in women who used DMPA compared to nonusers. At 24 months after DMPA discontinuation, the mean BMD values in DMPA users increased significantly. Although the values at the lumbar spine and femoral neck BMD in DMPA users were still 1.08% and 2.30%, respectively, below their baseline values, there were no significant differences when compared to nonusers. Recently, Viola et al [178] performed a study in order to reevaluate BMD in postmenopausal women who had used DMPA as contraceptive until they reached menopause and compared them with nonusers, finding no

statistically significant differences in forearm BMD between postmenopausal women who had been long-term users of DMPA and those who had been long-term users of an IUD until menopause.

Notwithstanding these results, it is not yet clear if longer duration of treatment is associated with a complete recovery of BMD.

Regarding fracture risk, Meier et al. [179] performed a case-control study, finding that the use of DMPA is associated with a slight increase in fracture risk. Data from this study demonstrated a higher fracture risk after a longer treatment duration (>2–3 years).

A recent Cochrane review [66] concluded that whether DMPA influences fracture risk cannot be determined from existing evidence and suggested that health care providers and women should consider the cost and benefits of this contraceptive.

The levonorgestrel-containing contraceptive implant has also been evaluated for its effect on BMD, although data are limited. A small study on seven adolescents showed a significant increase in lumbar spine BMD over 12 months [140]. Data on forearm BMD in adults are conflicting, with both increased and decreased BMD reported [123,180]. Taneepanichskul et al. [181] found no significant difference in mean BMD at distal and ultradistal forearm between 41 current users of levonorgestrel implants compared with 41 nonusers. According to these data, Intaraprasert et al. [182] did not find any difference in BMD at distal and ultradistal forearm between levonorgestrel implant users and IUD users. Bahamondes et al. [183] performed a study on 111 women randomly allocated to receive an etonorgestrel-

releasing implant or a levonorgestrel-releasing implant. The authors report a significantly lower BMD at the midshaft of the ulna in both groups of users after 18 months. However, no difference was found at the distal radius. Probably, the levonorgestrel implant may not induce a decrease of BMD similar to that caused by DMPA because estrogen levels are not as consistently suppressed [184] and because 19-nortestosterone progestins have a beneficial effect on bone [185]. Beerthuizen et al. [186] performed an open prospective study on healthy women aged between 18 and 40 years comparing the effects on BMD of etonorgestrel implant and nonhormone-medicated IUD. After 2 years of treatment, the authors found no significant difference in BMD changes from baseline between the two groups.

Recently, Pongsatha et al. [187] performed a study on 100 women using keto-desogestrel implants for at least 2 years. The authors found a significantly lower mean BMD at distal radius and ulna among implants users.

Regarding the use of low-dose progesterone-only pills and the levonorgestrel-releasing IUD, a statement by WHO in 2005 concluded that these contraceptive methods do not appear to have an effect on BMD, although data are limited [188]. Recently, Bahamondes et al. [189] found a similar BMD at the midshaft of the ulna and ultradistal radius in women using levonorgestrel-releasing IUD compared with women using nonhormone-medicated IUD. They also report no significant differences in BMD of levonorgestrel-releasing IUD users between the 7th and 10th years of use.

5.4. Transdermal contraceptives and vaginal ring

Massaro et al. [190] performed a randomized controlled study on 40 young fertile women to compare the effects on bone turnover and BMD of a combined contraceptive vaginal ring releasing 15 mcg EE and 120 mcg of etonorgestrel daily with the effects of a contraceptive patch, a transdermal system that delivers a daily dose of 20 mcg of EE and 150 mcg of norelgestromin.

After 6, 9, and 12 months, urinary pyridinoline and deoxypyridinoline, markers of bone resorption, were significantly reduced in patient treated with vaginal ring and contraceptive patch in comparison with basal values and with control group. However, after 12 months, no significant difference was detected in mean spinal BMD values between the three groups and in comparison with basal values.

These results are in agreement with the previous study by Massai et al. [191] on healthy premenopausal women: the authors found no difference in BMD after 2 years of contraceptive ring use.

Recently, also, Harel et al. [192] reported no differences in BMD of adolescents treated for 12 months with a contraceptive patch releasing 20 mcg of EE and 150 mcg of norelgestromin daily. Conversely, they report a significant increase in BMD of controls, suggesting that the patch attenuates bone mass acquisition in young women who are still undergoing skeletal maturation.

6. Conclusions

The main limit of studies analyzed in this review is the lack of randomized controlled trials reporting on COCs use and fracture risk having the incidence of fracture as the first end point. Indeed, performing such a trial would require an extremely long observational period.

Although BMD is considered a surrogate marker of risk fracture, it is, nevertheless, important to remember that changes in BMD may not accurately reflect the real fracture risk since the relationship between BMD and fracture risk in premenopausal women is still poorly understood. Data reported in this review are often extremely controversial. This is probably due to different studies design, different estrogen content and difference in methods of BMD assessment and in population characteristics. Indeed, BMD is influenced not only by exogenous hormones but also by many other factors such as age, postmenopausal status, cigarette smoking and BMI.

Nevertheless, a few conclusions can be drawn from the studies reported in our review. First of all, it is evident that the use of COCs does not exert any clinically significant effect on BMD in the general population. This conclusion is based on the results of randomized controlled trials. Similarly, it seems that the use of COC does not increase the risk of fracture in the general population. However, the best evidence on this topic has been derived from cohort prospective studies.

In the adolescents, the effects of COCs on BMD seem to be mainly determined by the dose of EE. Indeed, 30 mcg of EE seems to be adequate to ensure a sufficient bone accrual during adolescence, while studies on COCs with 20 mcg of EE cast doubt on their ability to support peak bone mass acquisition. However, no randomized controlled trial on the effects of COCs on BMD in adolescents is available in the literature, and no data on fracture risk could be found.

In perimenopausal women, several randomized controlled trials demonstrated that the use of COCs reduces bone demineralization and may significantly increase BMD even at a 20-mcg dose. Use of COCs in these women has also been associated with a reduction in fracture risk. However, this conclusion is based only on retrospective studies due to the lack of RCT trials.

Evidence from the studies reviewed strongly suggests that use of DMPA is associated with a decrease in BMD. Data on DMPA use and fracture risk are still limited and derived only from case-control studies. Although data from many studies seem to suggest that the reduction of BMD associated to DMPA administration is partially reversible after discontinuation of treatment, it is still unclear if adult women can regain BMD values similar to basal levels and if adolescents can reach peak bone mass after discontinuation of DMPA.

Beyond these conclusions, many important questions still remain unsolved: data on progestogen-only contraceptives, transdermal patch and vaginal ring are still limited, and while

it seems that they do not exert any influence on BMD in adult women, further studies on these subjects are needed.

References

- [1] Fabbri G, Petraglia F, Segre A, et al. Reduced spinal bone density in young women with amenorrhoea. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol* 1991;41:117–22.
- [2] Davies MC, Hall ML, Jacobs HS. Bone mineral loss in young women with amenorrhoea. *Br Med J* 1990;301:790–3.
- [3] Drinkwater BL, Brummer B, Chesnut III CH. Menstrual history as a determinant of current bone density in young athletes. *J Am Med Assoc* 1990;263:545–8.
- [4] ESHRE Capri Workshop Group. Female contraception over 40. *Hum Reprod Update* 2009;15:599–612.
- [5] Feng X, McDonald JM. Disorders of bone remodeling. *Annu Rev Pathol* 2011;6:121–45.
- [6] Roodman GD. Advances in bone biology: the osteoclast. *Endocr Rev* 1996;17:308–32.
- [7] Boyle WJ, Simonet WS, Lacey DL. Osteoclast differentiation and activation. *Nature* 2003;423:337–42.
- [8] Boskey AL. Biom mineralization: conflicts, challenges, and opportunities. *J Cell Biochem* 1998;30–31(Suppl):83–91.
- [9] Gallagher JC, Sai AJ. Molecular biology of bone remodeling: implications for new therapeutic targets for osteoporosis. *Maturitas* 2010;65:301–7.
- [10] Genant HK, Cann CE, Ettinger B, Gordan GS. Quantitative computed tomography of vertebral spongiosa: a sensitive method for detecting early bone loss after oophorectomy. *Ann Intern Med* 1982;97:699–705.
- [11] Riggs BL, Khosla S, Melton III LJ. Sex steroids and the construction and conservation of the adult skeleton. *Endocr Rev* 2002;23:279–302.
- [12] Syed F, Khosla S. Mechanisms of sex steroid effects on bone. *Biochem Biophys Res Commun* 2005;328:688–96.
- [13] Seifert-Klauss V, Prior JC. Progesterone and bone: actions promoting bone health in women. *J Osteoporos* 2010;2010:845180.
- [14] Eriksen EF, Colvard DS, Berg NJ, et al. Evidence of estrogen receptors in normal human osteoblast-like cells. *Science* 1988;241:84–6.
- [15] Komm BS, Terpening CM, Benz DJ, Graeme KA, O'Malley BW, Haussler MR. Estrogen binding receptor mRNA, and biologic response in osteoblast-like osteosarcoma cells. *Science* 1988;241:81–4.
- [16] Davis VL, Couse JF, Gray TK, Korach KS. Correlation between low levels of estrogen receptors and estrogen responsiveness in two rat osteoblast-like cell lines. *J Bone Miner Res* 1994;9:983–91.
- [17] Oursler MJ, Osdoby P, Pyfferoen J, Riggs BL, Spelsberg TC. Avian osteoclasts as estrogen target cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1991;88:6613–66.
- [18] Oursler MJ, Pederson L, Fitzpatrick L, Riggs BL. Human giant cell tumors of the bone (osteoclastomas) are estrogen target cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1994;91:5227–31.
- [19] Braidman I, Baris C, Wood L, et al. Preliminary evidence for impaired estrogen receptor- α protein expression in osteoblasts and osteocytes from men with idiopathic osteoporosis. *Bone* 2000;26:423–7.
- [20] Bord S, Homer A, Beavan S, Compston J. Estrogen receptors α and β are differentially expressed in developing human bone. *Endocrinology* 2001;86:2309–14.
- [21] Chen FP, Wang KC, Huang JD. Effect of estrogen on the activity and growth of human osteoclasts in vitro. *Taiwan J Obstet Gynecol* 2009;48:350–5.
- [22] Oursler MJ, Pederson L, Pyfferoen J, Osdoby P, Fitzpatrick L, Spelsberg TC. Estrogen modulation of avian osteoclast lysosomal gene expression. *Endocrinology* 1993;132:1373–80.
- [23] Mano H, Yuasa T, Kameda T, et al. Mammalian mature osteoclasts as estrogen target cells. *Biochem Biophys Res Commun* 1996;223:637–42.
- [24] Furuyama N, Fujisawa Y. Regulation of collagenolytic cysteine protease synthesis by estrogen in osteoclasts. *Steroids* 2000;65:371–8.
- [25] Parikka V, Lehenkari P, Sassi ML, et al. Estrogen reduces the depth of resorption pits by disturbing the organic bone matrix degradation activity of mature osteoclasts. *Endocrinology* 2001;142:5371–8.
- [26] Jilka RL. Cytokines, bone remodeling, and estrogen deficiency: a 1998 update. *Bone* 1998;23:75–81.
- [27] Di Gregorio GB, Yamamoto M, Ali AA, et al. Attenuation of the self-renewal of transit-amplifying osteoblast progenitors in the murine bone marrow by 17 beta-estradiol. *J Clin Invest* 2001;107:803–12.
- [28] Krum SA, Miranda-Carboni GA, Hauschka PV, et al. Estrogen protects bone by inducing Fas ligand in osteoblasts to regulate osteoclast survival. *EMBO J* 2008;27:535–45.
- [29] Kameda T, Mano H, Yuasa T, et al. Estrogen inhibits bone resorption by directly inducing apoptosis of the bone-resorbing osteoclasts. *J Exp Med* 1997;186:489–95.
- [30] Nakamura T, Imai Y, Matsumoto T, et al. Estrogen prevents bone loss via estrogen receptor alpha and induction of Fas ligand in osteoclasts. *Cell* 2007;130:811–23.
- [31] Imai Y, Youn MY, Kondoh S, et al. Estrogens maintain bone mass by regulating expression of genes controlling function and life span in mature osteoclasts. *Ann N Y Acad Sci* 2009;1173(Suppl 1):E31–9.
- [32] Anderson MA, Maraskovsky E, Billingsley WL, et al. A homologue of the TNF receptor and its ligand enhance T-cell growth and dendritic cell function. *Nature* 1997;390:175–9.
- [33] Hsu H, Lacey DL, Dunstan CR, et al. Tumor necrosis factor receptor family member RANK mediates osteoclast differentiation and activation induced by osteoprotegerin ligand. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1999;96:3540–5.
- [34] Khosla S. The OPG/RANKL/RANK system. *Endocrinology* 2001;142:5050–5.
- [35] Hofbauer LC, Khosla S, Dunstan CR, Lacey DL, Spelsberg TC, Riggs BL. Estrogen stimulates gene expression and protein production of osteoprotegerin in human osteoblastic cells. *Endocrinology* 1999;140:4367–70.
- [36] Di Carlo C, Tommaselli GA, Gargano V, et al. Effects of estrogen-progestin therapy on serum levels of RANKL, osteoprotegerin, osteocalcin, leptin, and ghrelin in postmenopausal women. *Menopause* 2007;14:38–44.
- [37] Turner AS. Animal models of osteoporosis — necessity and limitations. *Eur Cell Mater* 2001;1:66–81.
- [38] Kalu DN. The ovariectomized rat model of postmenopausal bone loss. *Bone Miner* 1991;15:175–91.
- [39] Lane NE, Haupt D, Kimmel DB, Modin G, Kinney JH. Early estrogen replacement therapy reverses the rapid loss of trabecular bone volume and prevents further deterioration of connectivity in the rat. *J Bone Miner Res* 1999;14:206–14.
- [40] Sims NA, Clément-Lacroix P, Minet D, et al. A functional androgen receptor is not sufficient to allow estradiol to protect bone after gonadectomy in estradiol receptor-deficient mice. *J Clin Invest* 2003;111:1319–27.
- [41] Manolagas SC, Jilka RL. Bone marrow, cytokines, and bone remodeling — emerging insights into the pathophysiology of osteoporosis. *N Engl J Med* 1995;332:305–11.
- [42] Pacifici R. Cytokines, estrogen, and postmenopausal osteoporosis — the second decade. *Endocrinology* 1998;139:2659–61.
- [43] Manolagas SC. The role of IL-6 type cytokines and their receptors in bone. *Ann N Y Acad Sci* 1998;840:194–204.
- [44] Lin SC, Yamate T, Taguchi Y, et al. Regulation of the gp80 and gp130 subunits of the IL-6 receptor by sex steroids in the murine bone marrow. *J Clin Invest* 1997;100:1980–90.
- [45] Miyaura C, Kusano K, Masuzawa T, et al. Endogenous bone-resorbing factors in estrogen deficiency: cooperative effects of IL-1 and IL-6. *J Bone Miner Res* 1995;10:1365–73.

- [46] Sunyer T, Lewis J, Collin-Osdoby P, Osdoby P. Estrogen's bone-protective effects may involve differential IL-1 receptor regulation in human osteoclast-like cells. *J Clin Invest* 1999;103:1409–18.
- [47] Srivastava S, Weitzmann MN, Cenci S, Ross FP, Adler S, Pacifici R. Estrogen decreases TNF gene expression by blocking JNK activity and the resulting production of c-Jun and JunD. *J Clin Invest* 1999;104:503–13.
- [48] Srivastava S, Neale WM, Kimble RB, et al. Estrogen blocks M-CSF gene expression and osteoclast formation by regulating phosphorylation of egr-1 and its interaction with Sp-1. *J Clin Invest* 1998;102:1850–9.
- [49] Oursler MJ, Cortese C, Keeting PE, et al. Modulation of transforming growth factor- β production in normal human osteoblast-like cells by 17 β -estradiol and parathyroid hormone. *Endocrinology* 1991;129:3313–20.
- [50] Hughes DE, Dai A, Tiffée JC, Li HH, Mundy GR, Boyce BF. Estrogen promotes apoptosis of murine osteoclasts mediated by TGF- β . *Nat Med* 1996;2:1132–6.
- [51] Kim YY, Kim SH, Oh S, et al. Increased fat due to estrogen deficiency induces bone loss by elevating monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1) production. *Mol Cells* 2010;29:277–82.
- [52] Wei LL, Leach MW, Miner RS, Demers LM. Evidence for progesterone receptors in human osteoblast-like cells. *Biochem Biophys Res Commun* 1993;195:525–32.
- [53] Mac Namara P, O'Shaughnessy C, Manduca P, Loughrey HC. Progesterone receptors are expressed in human osteoblast-like cell lines and in primary human osteoblast cultures. *Calcif Tissue Int* 1995;57:436–41.
- [54] Mac Namara P, Loughrey HC. Progesterone receptor A and B isoform expression in human osteoblasts. *Calcif Tissue Int* 1998;63:39–46.
- [55] Pensler JM, Radosevich JA, Higbee R, Langman CB. Osteoclasts isolated from membranous bone in children exhibit nuclear estrogen and progesterone receptors. *J Bone Miner Res* 1990;5:797–802.
- [56] Sloopweg MC, Ederveen AG, Schot LP, Schoonen WG, Kloosterboer HJ. Oestrogen and progesterone synergistically stimulate human and rat osteoblast proliferation. *J Endocrinol* 1992;133:R5–8.
- [57] Prior JC. Progesterone as a bone-trophic hormone. *Endocr Rev* 1990;11:386–98.
- [58] Kalu DN, Salerno E, Liu CC, et al. A comparative study of the actions of tamoxifen, estrogen and progesterone in the ovariectomized rat. *Bone Miner* 1991;15:109–23.
- [59] Barendolts EI, Lathon PV, Lindh FG. Progesterone antagonist RU486 has bone-sparing effects in ovariectomized rats. *Bone* 1995;17:21–5.
- [60] Rickard DJ, Iwaniec UT, Evans G, et al. Bone growth and turnover in progesterone receptor knockout mice. *Endocrinology* 2008;149:2383–90.
- [61] Barendolts EI, Lathon PV, Lindh FG. Progesterone antagonist RU 486 has bone-sparing effects in ovariectomized rats. *Bone* 1995;17:21–5.
- [62] Abe T, Chow JW, Lean JM, Chambers TJ. The progesterone antagonist, RU486, does not affect basal or estrogen-stimulated cancellous bone formation in the rat. *Bone Miner* 1992;19:225–33.
- [63] Yao W, Dai W, Shahnazari M, et al. Inhibition of the progesterone nuclear receptor during the bone linear growth phase increases peak bone mass in female mice. *PLoS One* 2010;5(7):e11410.
- [64] Practice Committee of American Society for Reproductive Medicine. Hormonal contraception: recent advances and controversies. *Fertil Steril* 2008;90:S103–13.
- [65] Martins SL, Curtis KM, Glasier AF. Combined hormonal contraception and bone health: a systematic review. *Contraception* 2006;73:445–69.
- [66] Lopez LM, Grimes DA, Schulz KF, Curtis KM. Steroidal contraceptives: effect on bone fractures in women. *Cochrane Database Syst Rev* 2011;6(7).
- [67] 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.
- [68] Hui SL, Slemenda CW, Johnston Jr CC. Age and bone mass as predictors of fracture in a prospective study. *J Clin Invest* 1988;81(6):1804–9.
- [69] Ross PD, Wasnich RD, Vogel JM. Detection of prefracture spinal osteoporosis using bone mineral absorptiometry. *J Bone Miner Res* 1988;3(1):1–11.
- [70] Cummings SR, Black DM, Nevitt MC, et al. Appendicular bone density and age predict hip fracture in women. The Study of Osteoporotic Fractures Research Group. *JAMA* 1990;263(5):665–8.
- [71] Gärdsell P, Johnell O, Nilsson BE. The predictive value of bone loss for fragility fractures in women: a longitudinal study over 15 years. *Calcif Tissue Int* 1991;49:90–4.
- [72] Berenson AB, Radecki CM, Grady JJ, Rickert VI, Thomas A. A prospective, controlled study of the effects of hormonal contraception on bone mineral density. *Obstet Gynecol* 2001;98:576–82.
- [73] Nappi C, Di Spiezio Sardo A, Acunzo G, et al. 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;67:355–9.
- [74] 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.
- [75] Endrikat J, Mih E, Dusterberg B, et al. A 3-year double-blind, randomized, controlled study on the influence of two oral contraceptives containing either 20 μ g or 30 μ g ethinylestradiol in combination with levonorgestrel on bone mineral density. *Contraception* 2004;69:179–87.
- [76] 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;78:10–5.
- [77] Hartard M, Kleinmond C, Luppa P, et al. Comparison of the skeletal effects of the progestogens desogestrel and levonorgestrel in oral contraceptive preparations in young women: controlled, open, partly randomized investigation over 13 cycles. *Contraception* 2006;74:367–75.
- [78] Paoletti AM, Orru M, Floris S, et al. Evidence that treatment with monophasic oral contraceptive formulations containing ethinylestradiol plus gestodene reduces bone resorption in young women. *Contraception* 2000;61:259–63.
- [79] Cooper C, Hannaford P, Croft P, Kay CR. Oral contraceptive pill use and fractures in women: a prospective study. *Bone* 1993;14:41–5.
- [80] Vessey M, Mant J, Painter R. Oral contraception and other factors in relation to hospital referral for fracture. Findings in a large cohort study. *Contraception* 1998;57:231–5.
- [81] Barad D, Kooperberg C, Wactawski-Wende J, Liu J, Hendrix S, Watts N. Prior oral contraception and postmenopausal fracture: a Women's Health Initiative observational cohort study. *Fertil Steril* 2005;84:374–83.
- [82] La Vecchia C, Tavani A, Gallus S. Oral contraceptives and risk of hip fractures. *Lancet* 1999;354:335–6.
- [83] Michaelsson K, Baron JA, Farahmand BY, Persson I, Ljunghall S. Oral contraceptive use and risk of hip fracture: a case-control study. *Lancet* 1999;353:1481–4.
- [84] Vestergaard P, Rejnmark L, Mosekilde L. Oral contraceptive use and risk of fractures. *Contraception* 2006;73:571–6.
- [85] Mallmin H, Ljunghall S, Persson I, Bergström R. Risk factors for fractures of the distal forearm: a population-based case-control study. *Osteoporos Int* 1994;4:298–304.
- [86] O'Neill TW, Marsden D, Adams JE, Silman AJ. Risk factors, falls, and fracture of the distal forearm in Manchester, UK. *J Epidemiol Community Health* 1996;50:288–92.
- [87] O'Neill TW, Silman AJ, Naves DM, Cooper C, Kanis J, Felsenberg D. Influence of hormonal and reproductive factors on the risk of

- vertebral deformity in European women. *European Vertebral Osteoporosis Study Group*. *Osteoporos Int* 1997;7:72–8.
- [88] Johansson C, Mellstrom D. An earlier fracture as a risk factor for new fracture and its association with smoking and menopausal age in women. *Maturitas* 1996;24:97–106.
- [89] Berenson AB, Breitkopf CR, Grady JJ, Rickert VI, Thomas A. Effects of hormonal contraception on bone mineral density after 24 months of use. *Obstet Gynecol* 2004;103:899–906.
- [90] Cobb KL, Kelsey JL, Sidney S, Ettinger B, Lewis CE. Oral contraceptives and bone mineral density in white and black women in CARDIA. *Coronary Risk Development in Young Adults*. *Osteoporos Int* 2002;13:893–900.
- [91] Mazess RB, Barden HS. Bone density in premenopausal women: effects of age, dietary intake, physical activity, smoking, and birth control pills. *Am J Clin Nutr* 1991;53:132–42.
- [92] Paoletti AM, Orru M, Lello S, et al. Short-term variations in bone remodeling markers of an oral contraception formulation containing 3 mcg of drospirenone plus 30 microg of ethinyl estradiol: observational study in young postadolescent women. *Contraception* 2004;70:293–8.
- [93] Castelo-Branco C, Martínez de Osaba MJ, Pons F, Vanrell JA. Effects on bone mass of two oral contraceptives containing ethinylestradiol and cyproterone acetate or desogestrel: results of a 2-year follow-up. *Eur J Contracept Reprod Health Care* 1998;3:79–84.
- [94] Reed SD, Scholes D, LaCroix AZ, Ichikawa LE, Barlow WE, Ott SM. Longitudinal changes in bone density in relation to oral contraceptive use. *Contraception* 2003;68:177–82.
- [95] Corson SL. Oral contraceptives for the prevention of osteoporosis. *J Reprod Med* 1993;38:1015–20.
- [96] Kritz-Silverstein D, Barrett-Connor E. Bone mineral density in postmenopausal women as determined by prior oral contraceptive use. *Am J Public Health* 1993;83:100–2.
- [97] Cromer BA. Effects of hormonal contraceptives on bone mineral density. *Drug Saf* 1999;20:213–22.
- [98] Kleerekoper M, Brienza RS, Schultz LR, Johnson CC. Oral contraceptive use may protect against low bone mass. *Henry Ford Hospital Osteoporosis Cooperative Research Group*. *Arch Intern Med* 1991;151:1971–6.
- [99] Gambacciani M, Monteleone P, Ciaponi M, Sacco A, Genazzani AR. Effects of oral contraceptives on bone mineral density. *Treat Endocrinol* 2004;3:191–6.
- [100] Sultana S, Choudhury S, Choudhury SA. Effect of combined oral contraceptives on bone mineral density in pre and postmenopausal women. *Mymensingh Med J* 2002;11:12–4.
- [101] Pasco JA, Kotowicz MA, Henry MJ, Panahi S, Seeman E, Nicholson GC. Oral contraceptives and bone mineral density: a population-based study. *Am J Obstet Gynecol* 2000;182:265–9.
- [102] Wei S, Venn A, Ding C, Foley S, Laslett L, Jones G. The association between oral contraceptive use, bone mineral density and fractures in women aged 50–80 years. *Contraception* 2011;84(4):357–62.
- [103] Wanichsetakul P, Kamudhamas A, Watanarungkovit P, Siripakarn Y, Visutakul P. Bone mineral density at various anatomic bone sites in women receiving combined oral contraceptives and depot-medroxyprogesterone acetate for contraception. *Contraception* 2002;65:407–10.
- [104] Allali F, El Mansouri L, Abourazzak F, et al. The effect of past use of oral contraceptive on bone mineral density, bone biochemical markers and muscle strength in healthy pre and post menopausal women. *BMC Womens Health* 2009;9:31.
- [105] Afghani A, Abbott AV, Wiswell RA, et al. Bone mineral density in Hispanic women: role of aerobic capacity, fat-free mass, and adiposity. *Int J Sports Med* 2004;25:384–90.
- [106] Collins C, Thomas K, Harding A, Cook S, Turner J, Collins J. The effect of oral contraceptives on lumbar bone density in premenopausal women. *J La State Med Soc* 1988;140:35–9.
- [107] Garner P, Sornay-Rendu E, Delmas PD. Decreased bone turnover in oral contraceptive users. *Bone* 1995;16:499–503.
- [108] Goldsmith N, Johnston J. Bone mineral: effects of oral contraceptives, pregnancy, and lactation. *J Bone Joint Surg* 1975;57-A(5):657–68.
- [109] Hall ML, Heavens J, Cullum ID, Ell PJ. The range of bone density in normal British women. *J Bone Joint Surg* 1990;63:266–9.
- [110] Hansen MA. Assessment of age and risk factors on bone density and bone turnover in healthy premenopausal women. *Osteoporos Int* 1994;4:123–8.
- [111] Hartard M, Bottermann P, Bartenstein P, Jeschke D, Schwaiger M. Effects on bone mineral density of low-dosed oral contraceptives compared to and combined with physical activity. *Contraception* 1997;55:87–90.
- [112] Hawker GA, Forsmo S, Cadarette SM, et al. Correlates of forearm bone mineral density in young Norwegian women: the Nord-Trøndelag Health Study. *Am J Epidemiol* 2002;156:418–27.
- [113] Hreshchshyn MM, Hopkins A, Zylstra S, Anbar M. Associations of parity, breast-feeding, and birth control pills with lumbar spine and femoral neck bone densities. *Am J Obstet Gynecol* 1988;159:318–22.
- [114] Kanders B, Lindsay R, Dempster D. Determinants of bone mass in young healthy women. In: Christiansen C, Auaud C, Nordin B, Parfitt A, Peck W, & Riggs B, editors. *Proceedings of the Copenhagen International Symposium on Osteoporosis*. Copenhagen, Denmark: Department of Clinical Chemistry, Glostrup Hospital; 1984, pp. 37–9.
- [115] Laitinen K, Valimäki M, Keto P. Bone mineral density measured by dual-energy X-ray absorptiometry in healthy Finnish women. *Calcif Tissue Int* 1991;48:224–31.
- [116] Lloyd T, Buchanan JR, Ursino GR, Myers C, Woodward G, Halbert DR. Long-term oral contraceptive use does not affect trabecular bone density. *Am J Obstet Gynecol* 1989;160:402–4.
- [117] MacDougall J, Davies MC, Overton CE, et al. Bone density in a population of long term oral contraceptive pill users does not differ from that in menstruating women. *Br J Fam Plann* 1999;25:96–100.
- [118] Melton III LJ, Bryant SC, Wahner HW, et al. Influence of breastfeeding and other reproductive factors on bone mass later in life. *Osteoporos Int* 1993;3:76–83.
- [119] Murphy S, Khaw KT, Compston JE. Lack of relationship between hip and spine bone mineral density and oral contraceptive use. *Eur J Clin Invest* 1993;23:108–11.
- [120] Nelson M, Mayer AB, Rutherford O, Jones D. Calcium intake, physical activity and bone mass in pre-menopausal women. *J Hum Nutr Diet* 1991;4:171–8.
- [121] Ott SM, Scholes D, LaCroix AZ, Ichikawa LE, Yoshida CK, Barlow WE. Effects of contraceptive use on bone biochemical markers in young women. *J Clin Endocrinol Metab* 2001;86:179–85.
- [122] Perrotti M, Bahamondes L, Petta C, Castro S. Forearm bone density in long-term users of oral combined contraceptives and depot medroxyprogesterone acetate. *Fertil Steril* 2001;76:469–73.
- [123] Peititi DB, Piaggio G, Mehta S, Cravioto MC, Meirik O. Steroid hormone contraception and bone mineral density: a cross-sectional study in an international population. *The WHO Study of Hormonal Contraception and Bone Health*. *Obstet Gynecol* 2000;95:736–44.
- [124] Picard D, Ste-Marie LG, Coutu D, et al. Premenopausal bone mineral content relates to height, weight and calcium intake during early adulthood. *Bone Miner* 1988;4:299–309.
- [125] Prior JC, Kirkland SA, Joseph L, et al. Oral contraceptive use and bone mineral density in premenopausal women: cross-sectional, population-based data from the Canadian Multicentre Osteoporosis Study. *CMAJ* 2001;165:1023–9.
- [126] Rodin A, Chapman M, Fogelman I. Bone density in users of combined oral contraception. Preliminary reports of a pilot study. *Br J Fam Plann* 1991;16:125–9.
- [127] Sowers MF, Wallace RB, Lemke JH. Correlates of forearm bone mass among women during maximal bone mineralization. *Prev Med* 1985;14:585–96.

- [128] Stevenson JC, Lees B, Devenport M, Cust MP, Ganger KF. Determinants of bone density in normal women: risk factors for future osteoporosis? *Br Med J (Clin Res Ed)* 1989;298:924–8.
- [129] Thamprisarn W, Taneapanichskul S. Bone mineral density in adolescent and young Thai girls receiving oral contraceptives compared with depot medroxyprogesterone acetate: a cross-sectional study in young Thai women. *Contraception* 2002;66:101–3.
- [130] Ulrich CM, Georgiou CC, Snow-Harter CM, Gillis DE. Bone mineral density in mother–daughter pairs: relations to lifetime exercise, lifetime milk consumption, and calcium supplements. *Am J Clin Nutr* 1996;63:72–9.
- [131] Wallace LS, Ballard JE. Lifetime physical activity and calcium intake related to bone density in young women. *J Womens Health Gen Based Med* 2002;11:389–98.
- [132] The ESHRE Capri Workshop Group. Noncontraceptive health benefits of combined oral contraception. *Hum Reprod Update* 2005;11:513–25.
- [133] Hartard M, Kleinmond C, Wiseman M, Weissenbacher ER, Felsenberg D, Erben RG. Detrimental effect of oral contraceptives on parameters of bone mass and geometry in a cohort of 248 young women. *Bone* 2007;40:444–50.
- [134] Polati F, Perotti F, Filipina N, Gallina D, Nappi RE. Bone mass and long-term monophasic oral contraceptive treatment in young women. *Contraception* 1995;51:221–4.
- [135] Register TC, Jayo MJ, Jerome CP. Oral contraceptive treatment inhibits the normal acquisition of bone mineral in skeletally immature young adult female monkeys. *Osteoporos Int* 1997;7:348–53.
- [136] Cromer BA. Bone mineral density in adolescence and young adult women on injectable or oral contraception. *Curr Opin Obstet Gynecol* 2003;15:353–7.
- [137] Lloyd T, Taylor DS, Lin MH, Matthews AE, Egglis DF, Legro RS. Oral contraceptive use by teenage women does not affect peak bone mass: a longitudinal study. *Fertil Steril* 2000;74:734–8.
- [138] Lattakova M, Borovsky M, Payer J, Killinger Z. Oral contraception usage in relation to bone mineral density and bone turnover in adolescent girls. *Eur J Contracept Reprod Health Care* 2009;14:207–14.
- [139] Agostino H, Di Meglio GJ. Low-dose oral contraceptives in adolescents: how low can you go? *Pediatr Adolesc Gynecol* 2010;23:195–201.
- [140] Cromer BA, Blair JM, Mahan JD. A prospective comparison of bone density in adolescent girls receiving depot medroxyprogesterone acetate (Depo-Provera), levonorgestrel (Norplant), or oral contraceptives. *J Pediatr Adolesc Gynecol* 1996;129:671–6.
- [141] Lara-Torre E, Edwards CP, Perlman S, Hertweck SP. Bone mineral density in adolescent females using depot medroxyprogesterone acetate. *J Pediatr Adolesc Gynecol* 2004;17:17–21.
- [142] Beksinska ME, Kleinschmidt I, Smit JA, Farley TM. Bone mineral density in adolescents using norethisterone enanthate, depot-medroxyprogesterone acetate or combined oral contraceptives for contraception. *Contraception* 2007;75:438–43.
- [143] Cromer BA, Stager M, Bonny A. Depot medroxyprogesterone acetate, oral contraceptives and bone mineral density in a cohort of adolescent girls. *J Adolesc Health* 2004;35:434–41.
- [144] Rome E, Ziegler J, Secic M. Bone biochemical markers in adolescent girls using either depot medroxyprogesterone acetate or an oral contraceptive. *J Pediatr Adolesc Gynecol* 2004;17:373–7.
- [145] Cromer BA, Bonny AE, Stager M. Bone mineral density in adolescent females using injectable or oral contraceptives: a 24-month prospective study. *Fertil Steril* 2008;90:2060–7.
- [146] Beksinska ME, Kleinschmidt I, Smit JA, Farley TM, Rees HV. Bone mineral density in young women aged 19–24 after 4–5 years of exclusive and mixed use of hormonal contraception. *Contraception* 2009;80:128–32.
- [147] Scholes D, Ichikawa L, La Croix AZ, et al. Oral contraceptive use and bone density in adolescent and young adult women. *Contraception* 2010;81:35–40.
- [148] WHO. Medical eligibility criteria for contraceptive use. 4th ed. 2009.
- [149] Gambacciani M, Ciaponi M, Cappagli B, Benussi C, Genazzani AR. Longitudinal evaluation of perimenopausal femoral bone loss: effects of a low-dose oral contraceptive preparation on bone mineral density and metabolism. *Osteoporos Int* 2000;11:544–8.
- [150] Gambacciani M, Cappagli B, Ciaponi M, Benussi C, Genazzani AR. Hormone replacement therapy in perimenopause: effect of a low dose oral contraceptive preparation on bone quantitative ultrasound characteristics. *Menopause* 1999;6:43–8.
- [151] Gambacciani M, Spinetti A, Taponeco F, Cappagli B, Piaggese L, Fioretti P. Longitudinal evaluation of perimenopausal vertebral bone loss: effects of a low-dose oral contraceptive preparation on bone mineral density and metabolism. *Obstet Gynecol* 1994;83:392–6.
- [152] Gambacciani M, Spinetti A, Cappagli B, et al. Hormone replacement therapy in perimenopausal women with a low dose oral contraceptive preparation: effects on bone mineral density and metabolism. *Maturitas* 1994;19:125–31.
- [153] Volpe A, Amram A, Cagnacci A, Battaglia C. Biochemical aspects of hormonal contraception: effects on bone metabolism. *Eur J Contracept Reprod Health Care* 1997;2:123–6.
- [154] Shargil AA. Hormone replacement therapy in perimenopausal women with a triphasic contraceptive compound: a three-year prospective study. *Int J Fertil* 1985;30:15–28.
- [155] Fortney JA, Feldblum PJ, Talmage RV, Zhang J, Godwin SE. Bone mineral density and history of oral contraceptive use. *J Reprod Med* 1994;39:105–9.
- [156] Tuppurainen M, Kroger H, Saarikoski S, Honkanen R, Alhava E. The effect of previous oral contraceptive use on bone mineral density in perimenopausal women. *Osteoporos Int* 1994;4:93–8.
- [157] Beksinska M, Smit J, Kleinschmidt I, Farley T, Mbatha F. Bone mineral density in women aged 40–49 years using depot-medroxyprogesterone acetate, norethisterone enanthate or combined oral contraceptives for contraception. *Contraception* 2005;71:170–5.
- [158] Johnell O, Nilsson BE. Life-style and bone mineral mass in perimenopausal women. *Calcif Tissue Int* 1984;36:354–6.
- [159] Masaryk P, Lunt M, Benevolenskaya L, et al. Effects of menstrual history and use of medications on bone mineral density: the EVOS study. *Calcif Tissue Int* 1998;63:271–6.
- [160] Taechakraichana N, Limpaphayom K, Nimglam T, Panyakhamlerd K, Chaikittisilpa S, Dusitsin N. A randomized trial of oral contraceptive and hormone replacement therapy on bone mineral density and coronary heart disease risk factors in postmenopausal women. *Obstet Gynecol* 2000;95:87–94.
- [161] Grainge MJ, Coupland CAC, Cliffe SJ, Chilvers CED, Hosking DJ. Reproductive, menstrual and menopausal factors: which are associated with bone mineral density in early postmenopausal women? *Osteoporos Int* 2001;12:777–87.
- [162] Enzelsberger H, Metka M, Heytmanek G, Schurz B, Kurz C, Kusztrich M. Influence of oral contraceptive use on bone density in climacteric women. *Maturitas* 1988;9:375–8.
- [163] Kuohung W, Borgatta L, Stubblefield P. Low-dose oral contraceptives and bone mineral density: an evidence-based analysis. *Contraception* 2000;61:77–82.
- [164] Gambacciani M, Cappagli B, Lazzarini V, Ciaponi M, Fruzzetti F, Genazzani AR. Longitudinal evaluation of perimenopausal bone loss: effects of different low dose oral contraceptive preparations on bone mineral density. *Maturitas* 2006;54:176–80.
- [165] Albertazzi P, Bottazzi M, Steel SA. Bone mineral density and depot medroxyprogesterone acetate. *Contraception* 2006;73:577–83.
- [166] Clark MK, Sowers MR, Nichols S, Levy B. Bone mineral density changes over two years in first-time users of depot medroxyprogesterone acetate. *Fertil Steril* 2004;82:1580–6.
- [167] Curtis KM, Martins SL. Progestogen-only contraception and bone density: a systematic review. *Contraception* 2006;73:470–87.
- [168] Cundy T, Cornish J, Roberts H, Elder H, Reid IR. Spinal bone density in women using depot medroxyprogesterone contraception. *Obstet Gynecol* 1998;92:569–73.

- [169] Cundy T, Evans M, Roberts H, Wattie D, Ames R, Reid IR. Bone density in women receiving depot medroxyprogesterone acetate for contraception. *BMJ* 1991;303:13–6.
- [170] Kaunitz AM, Miller PD, Rice VM, Ross D, McClung MR. Bone mineral density in women aged 25–35 years receiving depot medroxyprogesterone acetate: recovery following discontinuation. *Contraception* 2006;74:90–9.
- [171] Viola AS, Castro S, Bahamondes MV, Fernandes A, Viola CF, Bahamondes L. A cross-sectional study of the forearm bone mineral density in long-term current users of the injectable contraceptive depot medroxyprogesterone acetate. *Contraception* 2011;84(5):e31–7.
- [172] Scholes D, LaCroix AZ, Ott SM, Ichikawa LE, Barlow WE. Bone mineral density in women using depot medroxyprogesterone acetate for contraception. *Obstet Gynecol* 1999;93:233–8.
- [173] Harel Z, Johnson CC, Gold MA, et al. Recovery of bone mineral density in adolescents following the use of depot medroxyprogesterone acetate contraceptive injections. *Contraception* 2010;81:281–91.
- [174] Cundy T, Cornish J, Evans MC, Roberts H, Reid IR. Recovery of bone density in women who stop using medroxyprogesterone acetate. *BMJ* 1994;308:247–8.
- [175] Orr-Walker BJ, Evans MC, Ames RW, Clearwater JM, Cundy T, Reid IR. The effect of past use of the injectable contraceptive depot medroxyprogesterone acetate on bone mineral density in normal postmenopausal women. *Clin Endocrinol (Oxf)* 1998;49:615–8.
- [176] Scholes D, LaCroix AZ, Ichikawa LE, Barlow WE, Ott SM. Injectable hormone contraception and bone density: results from a prospective study. *Epidemiology* 2002;13:581–7.
- [177] Gai L, Zhang J, Zhang H, Gai P, Zhou L, Liu Y. The effect of depot medroxyprogesterone acetate (DMPA) on bone mineral density (BMD) and evaluating changes in BMD after discontinuation of DMPA in Chinese women of reproductive age. *Contraception* 2011;83:218–22.
- [178] Viola AS, Castro S, Marchi NM, Bahamondes MV, Viola CF, Bahamondes L. Long-term assessment of forearm bone mineral density in postmenopausal former users of depot medroxyprogesterone acetate. *Contraception* 2011;84(2):122–7.
- [179] Meier C, Brauchli YB, Jick SS, Kraenzlin ME, Meier CR. Use of depot medroxyprogesterone acetate and fracture risk. *J Clin Endocrinol Metab* 2010;95:4909–16.
- [180] Naessen T, Olsson SE, Gudmundson J. Differential effects on bone density of progestogen-only methods for contraception in premenopausal women. *Contraception* 1995;52:35–9.
- [181] Taneepanichskul S, Intaraprasert S, Theppisai U, Chaturachinda K. Bone mineral density during long-term treatment with Norplant implants and depot medroxyprogesterone acetate. A cross-sectional study of Thai women. *Contraception* 1997;56:153–5.
- [182] Intaraprasert S, Taneepanichskul S, Theppisai U, Chaturachinda K. Bone density in women receiving Norplant implants for contraception. *J Med Assoc Thai* 1997;80:738–41.
- [183] Bahamondes L, Monteiro-Dantas C, Espejo-Arce X, et al. A prospective study of the forearm bone density of users of etonogestrel- and levonorgestrel-releasing contraceptive implants. *Hum Reprod* 2006;21:466–70.
- [184] Meckstroth KR, Darney PD. Implant contraception. *Semin Reprod Med* 2001;19:339–54.
- [185] Horowitz M, Wishart JM, Need AG, Morris HA, Nordin BE. Effects of norethisterone on bone related biochemical variables and forearm bone mineral in post-menopausal osteoporosis. *Clin Endocrinol (Oxf)* 1993;39:649–55.
- [186] Beerthuizen R, van Beek A, Massai R, Mäkäräinen L, Hout J, Bennink HC. Bone mineral density during long-term use of the progestagen contraceptive implant Implanon compared to a non-hormonal method of contraception. *Hum Reprod* 2000;15:118–22.
- [187] Pongsatha S, Ekmahachai M, Suntornlimsiri N, Morakote N, Chaovitsaree S. Bone mineral density in women using the subdermal contraceptive implant Implanon for at least 2 years. *Int J Gynaecol Obstet* 2010;109:223–5.
- [188] WHO statement on hormonal contraception and bone health. *Wkly Epidemiol Rec* 2005.
- [189] Bahamondes MV, Monteiro I, Castro S, Espejo-Arce X, Bahamondes L. Prospective study of the forearm bone mineral density of long-term users of the levonorgestrel-releasing intrauterine system. *Hum Reprod* 2010;25:1158–64.
- [190] 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;81:209–14.
- [191] Massai R, Mäkäräinen L, Kuukankorpi A, Klipping C, Duijkers I, Dieben T. The combined contraceptive vaginal ring and bone mineral density in healthy pre-menopausal women. *Hum Reprod* 2005;20:2764–8.
- [192] Harel Z, Riggs S, Vaz R, Flanagan P, Harel D, Machan JJJ. Bone accretion in adolescents using the combined estrogen and progestin transdermal contraceptive method Ortho Evra: a pilot study. *Pediatr Adolesc Gynecol* 2010;23(1):23–31.

Capitolo 2 Effetti clinici di una nuova associazione contraccettiva contenente estradiolo valerato e dienogest

2.a L'associazione contraccettiva estradiolo valerato/dienogest

Sin dalla nascita della contraccezione ormonale estroprogestinica si è tentato di introdurre, al posto dell'etinilestradiolo, l'estradiolo naturale, il più potente degli estrogeni endogeni. L'utilizzo dell'estradiolo naturale, infatti, è associato a una riduzione degli effetti collaterali e metabolici tipici dell'etinilestradiolo. Tuttavia la scarsa biodisponibilità orale dell'estradiolo naturale e l'alto tasso di sanguinamenti intermestruali hanno sempre ostacolato la formulazione di un contraccettivo con queste caratteristiche. Per anni, quindi, l'etinilestradiolo ha continuato a rappresentare l'estrogeno principale nei contraccettivi orali.

A parte la sua elevata biodisponibilità orale, l'etinilestradiolo, quando combinato al progestinico, non è rapidamente metabolizzato a livello endometriale. Al contrario l'estradiolo, in presenza di un progestinico, è rapidamente ossidato a estrone, estrogeno dotato di bassa attività biologica e scarso impulso proliferativo sull'endometrio. Il progestinico, infatti, induce la 17-deidrogenasi che ossida l'estradiolo in corrispondenza dell'anello D della struttura steroidea. L'etinilestradiolo, invece, è protetto da questa induzione metabolica perché possiede un gruppo 17 α -etinilico

sull'anello D della molecola che ne previene l'ossidazione. L'etinilestradiolo, quindi, aggiunto al progestinico, sostiene il meccanismo proliferativo dell'endometrio che conduce a sanguinamento soltanto durante la sospensione della pillola. La maggior parte dei contraccettivi orali a base di etinilestradiolo garantisce un buon controllo del ciclo mestruale in circa il 90% delle donne che ne fanno uso.

Per risolvere il primo grande ostacolo alla formazione di un contraccettivo contenente l'estradiolo naturale si è cercato di migliorare la biodisponibilità orale dell'estradiolo attraverso diversi approcci, incluse micronizzazioni ed esterificazioni. È nato così l'estradiolo valerato (E2V), estere valerato dell'estradiolo naturale. Se somministrato per via orale viene rapidamente convertito a livello intestinale ed epatico in estradiolo (E2). L'effetto estrogenico e il profilo farmacocinetico dell'estradiolo naturale e del suo estere valerato sono comparabili. Inoltre la tollerabilità epatica e cardiovascolare dell'estradiolo naturale è maggiore rispetto all'etinilestradiolo. È stato dimostrato che, a dosaggi equivalenti, è evidente un più favorevole effetto dell'estradiolo rispetto all'etinilestradiolo sui livelli di lipidi e una riduzione della produzione di proteine epatiche quali la SHBG (sex hormone-binding globulin), l'angiotensinogeno e i fattori della coagulazione. A parte l'estradiolo valerato, hanno cominciato ad essere utilizzate anche altre molecole quale,

ad esempio, l'estradiolo ciclo octil acetato, in combinazione a diversi progestinici come noretisterone acetato, desogestrel e ciproterone acetato principalmente come formulazioni monofasiche. Tuttavia questi contraccettivi non hanno dimostrato avere una buona applicabilità alla pratica clinica. Nel 1980, infatti, l'Organizzazione Mondiale della Sanità ha riportato una significativa incidenza di irregolarità mestruali tra le donne randomizzate che facevano uso di noretisterone e estradiolo naturale rispetto a quelle trattate con una dose equiparabile di etinilestradiolo. Simili sanguinamenti furono osservati anche in donne trattate con estradiolo naturale e ciproterone acetato o desogestrel. Nonostante ciò nel 1993 fu messa in commercio in Finlandia la prima pillola contraccettiva a base di estradiolo naturale e ciproterone acetato (Femilar[®], Bayer Schering Pharma Oy). Anche questa nuova formulazione ha, però, dimostrato un'incidenza di spotting e di sanguinamenti intermestruali del 20-40%, non accettabile dalle donne che ne fanno uso, tant'è che ad oggi la commercializzazione di questa pillola è di solo circa il 5%.

Per risolvere il problema dello scarso controllo del ciclo è stata sviluppata una nuova formulazione contenente estradiolo sotto forma di estradiolo valerato combinato con il DNG, dati i potenti effetti endometriali di questo progestinico.

Il dienogest, chimicamente conosciuto come 17 α -17-idrossi-3-ossio-19-norpregna-4,9-diene-21-nitrile, ha formula empirica C₂₀H₂₅NO₂. È un progestinico derivato dal C19-nortestosterone (NET) che non presenta il gruppo etilico in posizione C17, ma il gruppo cianometilico (CNCH₃). Una seconda peculiarità strutturale del DNG è rappresentata dal doppio legame nell'anello steroideo B, che determina la formazione del cosiddetto "conjugated double-bond system" tra gli anelli steroidei A e B; questo doppio legame conferisce alla molecola un'elevata affinità per i recettori del progesterone (RP). La particolare struttura del DNG fa sì che possieda una farmacodinamica per alcuni aspetti simile a quella dei derivati del C-19 nortestosterone per altri a quella dei derivati del progesterone. Similmente ai derivati del NET, il DNG ha un'elevata biodisponibilità orale (>90%), diversamente da quanto accade per altri derivati del progesterone. È ampiamente distribuito e circola nel siero legato all'albumina per il 91% e per il 9% è libero e biodisponibile. Ha una breve emivita (circa 10 ore) che deriva dalla sua affinità con il NET. Non ci sono effetti di accumulo e ciò è dovuto alla sua scarsa affinità con le sex-hormone binding globulin (SHBG). Conseguenza diretta di ciò è che il DNG non spiazzava il testosterone dal legame con le SHBG, il che lo differenzia dagli altri derivati del C-19 nortestosterone. Ma l'aspetto più importante è il suo potente effetto progestinico sull'endometrio descritto

in svariati studi inclusi studi istologici di sicurezza endometriale. Il dienogest presenta la più potente efficacia endometriale se paragonato al noretisterone, al medrossiprogesterone acetato e al diidrogesterone. Questo è il motivo per cui garantisce un buon controllo del ciclo se utilizzato in associazione all'estradiolo valerato. Al contrario dei derivati del progesterone, ha una breve emivita (11h) che evita accumuli dopo dosi ripetute. Come i derivati del progesterone, invece, ha una moderata azione d'inibizione delle gonadotropine e un effetto neutrale sui parametri metabolici (lipidi, carboidrati, emostasi) e sul sistema vascolare. In particolare è importante sottolineare che il dienogest non contrasta le proprietà vasodilatatorie degli estrogeni. La neutralità del dienogest sul sistema cardiovascolare è anche dovuta al fatto che manca di attività glucocorticoide e antimineralcorticoide. Inoltre il dienogest non antagonizza gli effetti degli estrogeni, neppure a livello del sistema nervoso centrale: gli effetti positivi degli estrogeni su sonno, umore, attenzione, funzione cognitiva, stato di veglia sono conservati. Come gli altri progestinici simili al progesterone, il dienogest ha un'azione diretta antiandrogenica. Gli studi presenti in letteratura hanno dimostrato che il dienogest esercita un'attività antiandrogenica pari al 40% rispetto a quella del ciproterone acetato. Nella pratica clinica quest'azione è amplificata dal fatto che il dienogest manca d'interazione con specifiche proteine

epatiche di trasporto come la SHBG. Infatti, al contrario degli altri derivati del nortestosterone, il dienogest non spiazza il testosterone.

La maggior parte dei contraccettivi orali attualmente in commercio contiene etinilestradiolo (EE) per la parte estrogenica, ormone sintetico, molto potente, che libera estrogeno se somministrato per via orale.

Nel Maggio del 2010, la Food and Drug Administration ha approvato, a scopo contraccettivo, una pillola quadrifasica contenente estradiolo valerato e dienogest. La confezione contiene 28 compresse con uno schema che prevede una progressiva riduzione della componente estrogenica associata ad un aumento del dosaggio del progestinico seguiti poi da un breve intervallo “hormone free” di 2 giorni:

- 2 compresse contengono 3 mg di E2V
- 5 compresse contengono 2 mg di E2V e 2 mg di DNG
- 17 compresse contengono 2 mg di E2V e 3 mg di DNG
- 2 compresse contengono 1 mg di E2V
- 2 compresse sono placebo

La dose media di dienogest è 2,2 mg al giorno.

L'associazione con il DNG in un regime quadrifasico è finalizzata ad ottenere un preparato in grado di inibire l'ovulazione e di minimizzare i sanguinamenti irregolari. Il rationale di tale regime consiste in una predominanza estrogenica iniziale finalizzata a preparare l'endometrio

all'attività progestinica di metà ciclo; le crescenti dosi di DNG forniscono poi stabilità allo stroma endometriale, soprattutto nelle fasi intermedie e finali del ciclo.

L'efficacia e la sicurezza nonché il profilo mestruale dell'associazione estradiolo valerato/dienogest in regime dinamico quadrifasico sono stati valutati in tre studi di Fase III condotti tra Europa, USA e Canada.

Per quanto riguarda l'efficacia contraccettiva, il primo studio fu condotto da Palacios S et al. in Europa. Si tratta di un ampio studio multicentrico che ha valutato un totale di 1377 donne di età compresa tra i 18 e i 50 anni per oltre 20 cicli di terapia. Tra tutte le pazienti trattate si sono verificate 13 gravidanze, 6 delle quali attribuibili al fallimento del metodo (Pearl index non aggiustato = 0.73; Pearl index aggiustato = 0.34). Nel sottogruppo di donne di età inferiore compresa tra i 18 e i 35 anni, si sono verificate 12 gravidanze, 5 delle quali attribuibili al fallimento del metodo (Pearl index non aggiustato = 0.94; Pearl index aggiustato = 0.40) . Il secondo studio, condotto da Nelson A et al (). in USA e Canada, ha reclutato 490 donne tra i 18 e i 35 anni che sono state seguite per 28 cicli di terapia. Infine il terzo studio, condotto in Europa da Ahrendt HJ et al ha confrontato l'associazione E2V/DNG con un contraccettivo monofasico contenente 20 mcg di EE e 100 mcg di levonorgestrel (LNG) per 7 cicli di terapia. I dati ottenuti da questi ultimi due studi hanno confermato

l'elevata efficacia contraccettiva della formulazione E2V/DNG con effetti simili all'associazione EE/LNG (20 mcg/100 mcg).

Gli effetti collaterali riportati non sono diversi da quelli di recenti contraccettivi a basso dosaggio. Nei dati raccolti dai tre studi sono riportati fastidi al seno (4,9%), metrorragia (4,9%) e mal di testa (3,1%).

Gravi eventi avversi considerati almeno possibilmente correlati al farmaco in studio si sono verificati nello 0,3% delle donne e includono due casi di rottura di cisti ovarica e un caso ciascuno di trombosi venosa profonda, infarto miocardico, iperplasia focale nodulare epatica, istoplasmosi oculare e leiomioma uterino. Un secondo infarto miocardico è stato riportato in uno studio che analizzava l'effetto del contraccettivo in pazienti con flusso mestruale abbondante e prolungato. Tuttavia entrambi gli episodi ischemici riportati si sono verificati in donne con più di 45 anni e con anamnesi familiare positiva per eventi di questo tipo.

Per quanto riguarda gli indici di emostasi i dati ottenuti con l'associazione E2V/DNG in regime quadrifasico, sono stati messi a confronto con un'associazione di EE/LNG, che contenendo un progestinico di seconda generazione rappresenta il gold standard di riferimento in ambito dell'emocoagulazione e del rischio trombotico associato all'uso di contraccettivi ormonali. Nel gruppo trattato con E2V/DNG non si sono avute modificazioni dei livelli di protrombina 1 e 2, mentre un lieve

incremento si è registrato nel gruppo LNG, ma le differenze tra i 2 gruppi non sono risultate essere significative. Significativamente maggiore è stato invece l'incremento del D-dimero con l'utilizzo del LNG, a indicare una maggiore attivazione del sistema coagulativo. Anche gli effetti metabolici del regime quadrifasico E2V/DNG, sono stati confrontati con quelli esercitati da un contraccettivo trifasico contenente EE/LNG. Rispetto all'associazione EE/LNG, i livelli di HDL sono aumentati in modo statisticamente significativo nel trattamento con DNG e non si sono verificate variazioni significative dei livelli di LDL o degli indici del metabolismo glucidico. Con entrambi i tipi di formulazioni si rileva un incremento della SHBG, maggiore con la seconda combinazione piuttosto che con la prima tant'è che i livelli di SHBG, sebbene aumentati, restano nel range di normalità nelle pazienti trattate con la pillola contenente E2V/DNG mentre eccedono nelle pazienti che utilizzano la pillola con EE/LNG. È comunemente accettato che l'influenza dei contraccettivi orali sulla coagulazione e fibrinolisi dipende principalmente dalla componente estrogenica. Il risultato di un minore impatto sui parametri emostatici della combinazione E2V/DNG sembra essere attribuibile proprio all'estradiolo valerato poiché si tratta di un estrogeno naturale, meno potente dell'etinilestradiolo nell'indurre la sintesi di proteine epatiche come la SHBG, gli indici di emostasi e l'angiotensinogeno. La minore

potenza dell'E2V rispetto all'etinilestradiolo a livello epatico è confermata dal fatto che nonostante il levonorgestrel sia un progestinico a parziale azione androgenica, in grado, maggiormente rispetto al dienogest, di contrastare l'effetto dell'estrogeno sulla sintesi della SHBG, i livelli complessivi di questa proteina, prodotta a livello epatico, s'innalzano di più con l'associazione EE/LNG che con l'associazione E2V/DNG. Dai dati emersi è quindi possibile supporre un ottimo profilo di sicurezza dell'associazione E2V/DNG sia dal punto di vista metabolico che emostatico, ma poiché mancano ancora studi epidemiologici di maggiore portata, è utile considerare controindicazioni alla prescrizione di questo nuovo contraccettivo le stesse utilizzate per gli altri contraccettivi orali. L'ultima considerazione da fare sull'associazione E2V/DNG riguarda il pattern mestruale. Il controllo del ciclo è un obiettivo da cui non è possibile prescindere nella formulazione di un nuovo contraccettivo poiché rappresenta uno dei principali eventi avversi nei primi cicli di terapia (30-50%) e una delle principali cause di abbandono del metodo. Come anticipato in precedenza quest'aspetto riveste ancora più importanza quando la componente estrogenica non è rappresentata dall'EE ma da un estrogeno naturale. L'associazione del DNG in un regime quadrifasico ha permesso di risolvere in maniera più che soddisfacente quest'aspetto. Uno studio randomizzato ha confrontato il

profilo mestruale del quadrifasico E2V/DNG con il classico EE/LNG. Sono state randomizzate 804 donne trattate per 7 cicli. I dati raccolti hanno dimostrato un efficace controllo del ciclo di E2V/DNG. I sanguinamenti programmati per ogni ciclo di trattamento sono stati 77.7% - 83.2% nel gruppo DNG e 89.5% - 93.8% nell'altro gruppo ($P < 0.01$). In linea con questo risultato una maggior percentuale ha riportato amenorrea rispetto al gruppo LNG ($P < 0.01$). Per quanto riguarda l'intensità del sanguinamento programmato, il DNG ne ha ridotto sia la durata (4.1-4.7 giorni vs 5.0-5.2 giorni, $P > 0.05$) che l'intensità. La percentuale di donne che ha avuto almeno un ciclo amenorroico sui 7 cicli di trattamento è stata del 56.9% nel gruppo DNG e 37.8% nel gruppo LNG. La quota di donne che ha riportato sanguinamenti non programmati è stata simile nei due gruppi (14% per il DNG e 12% per il LNG) e si è registrata per lo più nel primo mese di trattamento. In entrambi i gruppi, la maggior parte (75%) di tali episodi è stata definita come spotting o sanguinamento di lieve entità. Tali episodi sono durati meno nel gruppo E2V/DNG sia nei primi tre mesi sia nei successivi. Da quanto riportato risulta implicita la possibilità di utilizzare questo contraccettivo nel trattamento dei flussi mestruali abbondanti. Due studi, il primo condotto nel Nord America e il secondo tra Europa e Australia, a tale proposito, hanno valutato donne con sanguinamenti prolungati, frequenti o abbondanti. Le partecipanti sono

state randomizzate ad assumere E2V/DNG in regime quadrifasico o placebo. I dati ottenuti hanno rilevato che il flusso mestruale si è ridotto nel gruppo trattato farmacologicamente ($P < 0.01$) e i livelli di emoglobina, ematocrito e ferritina sono migliorati significativamente.

L'effetto sui flussi mestruali abbondanti rappresenta un importante effetto non contraccettivo dell'associazione E2V/DNG. Le peculiarità delle due molecole presenti in questo contraccettivo fanno sì che esso determini altri importanti effetti non contraccettivi. In particolare in questo lavoro di tesi esporrò i risultati di tre studi clinici effettuati presso il Dipartimento di Neuroscienze e Scienze Riproduttive ed Odontostomatologiche.

2b. Studio osservazionale sugli effetti di un contraccettivo orale contenente estradiolo valerato e dienogest sul metabolismo osseo e sulla densità minerale ossea.

Scopo dello studio è stato quello di stabilire quale impatto può avere un contraccettivo contenente un estrogeno naturale sul turnover osseo e sulla densità minerale ossea in donne giovani, fertili e in buona salute, attraverso la valutazione della densità minerale ossea e dei marcatori di turnover ossei sia sierici sia urinari. Da quanto riportato in letteratura, la quota di etinilestradiolo presente nelle più moderne formulazioni estroprogestiniche, anche se molto bassa, è sufficiente a sostenere il metabolismo osseo e a mantenere la densità minerale ossea a livelli adeguati. Gli studi presenti in letteratura, però, riguardano solo formulazioni contenenti l'etinilestradiolo e non l'estradiolo valerato, che potrebbe esercitare un'azione più debole compromettendo il metabolismo osseo.

Abbiamo pertanto effettuato uno studio osservazionale longitudinale su 30 donne afferenti agli ambulatori del nostro Dipartimento per necessità contraccettiva.

Criteri d'inclusione sono stati:

- Et  compresa tra i 21 e i 34 anni, perch  il picco di massa ossea si raggiunge, nella maggior parte delle donne, a 20 anni e comincia a diminuire dopo i 35 anni;
- Et  del menarca tra i 12 e i 14 anni;
- Cicli mestruali regolari;
- Indice di massa corporea (BMI) < 25;
- Normale introito calorico, valutato mediante questionario secondo Block.
- Anamnesi negativa per precedente terapia con estrogeni orali.

I criteri di esclusione sono stati:

- Gravidanza sospetta o confermata;
- Gravidanza o allattamento al seno durante l'anno precedente;
- Malattie del fegato;
- Disturbi vascolari o metabolici;
- Disturbi del metabolismo osseo (Morbo di Paget, iperparatiroidismo, osteodistrofia renale);
- Trattamento con farmaci che influenzano il metabolismo osseo (bifosfonati, fluoruro di sodio, calcitonina, estrogeni,

progestinici, steroidi anabolizzanti, corticosteroidi, calcio o vitamina D, fosforo, diuretici tiazidici);

- Trattamento con farmaci che interferiscono con i contraccettivi ormonali (barbiturici, antiepilettici, rifampicina, griseofulvina);
- Fumo di sigaretta;
- Tutte le altre controindicazioni all'uso di contraccettivi orali combinati.

All'atto del reclutamento, ciascuna paziente è stata informata circa gli scopi e le modalità dello studio e da tutte le pazienti è stato ottenuto un consenso informato scritto. Lo studio è stato approvato dal Comitato Etico. Prima di essere arruolata, ogni donna è stata sottoposta a: anamnesi generale e ginecologica, Pap-test, esame pelvico bimanuale, misurazione della pressione arteriosa sistolica e diastolica, calcolo dell'indice di massa corporea (BMI) e valutazione ematochimica completa.

Al momento del reclutamento e dopo 3 e 6 mesi sono stati misurati i marcatori di osteolisi (calcio sierico e urinario, piridinolina (PYD) e deossipiridinolina (D-PYD) urinarie) e di osteosintesi (osteocalcina).

Al momento del reclutamento e dopo 6 mesi di terapia, inoltre, è stata determinata la densità minerale ossea (BMD) mediante esame DEXA (dual-energy X-ray absorptiometry) (DEXA QDR 1000; Hologic,

Waltham, MA, USA) eseguito a livello del tratto lombare della colonna vertebrale (L₁-L₄).

Delle 30 pazienti reclutate, 2 hanno deciso di interrompere l'assunzione della pillola, una per motivi personali, l'altra per irregolarità mestruali. I livelli sierici di calcio hanno mostrato una tendenza all'incremento rispetto ai valori basali che ha raggiunto la significatività statistica dopo 6 mesi di terapia, mentre i livelli di calcio urinari non hanno presentato significative variazioni. I livelli di PYD e di D-PYD urinari sono significativamente più bassi a 3 e a 6 mesi rispetto al reclutamento ($p < 0.05$). I livelli sierici di osteocalcina sono diminuiti, ma non significativamente, durante tutto il periodo di osservazione. A 6 mesi dal reclutamento non è stata registrata alcuna differenza significativa né nei livelli di BMD lombare né in quelli di BMI rispetto ai valori basali.

I risultati di questo studio dimostrano che la terapia contraccettiva con l'associazione E2V/DNG non determina modifiche significative della BMD e si associa ad un decremento degli indici di turnover osseo. Vista la natura osservazionale dello studio, la scarsa numerosità del campione e la breve durata del follow up, i risultati sono da considerarsi preliminari e necessitano di essere confermati da studi randomizzati controllati su popolazioni più ampie.

Invece i dati emergenti suggeriscono che i contraccettivi orali possono esercitare effetti diversi nelle adolescenti rispetto alle donne in perimenopausa. Quindi sarebbe interessante includere questi gruppi in studi futuri, anche considerando il fatto che il contraccettivo E2V/DNG è largamente prescritto a donne in perimenopausa che soffrono di flusso mestruale abbondante.

Short-term effects of an oral contraceptive containing oestradiol valerate and dienogest on bone metabolism and bone mineral density: An observational, preliminary study

Costantino Di Carlo, Virginia Gargano, Stefania Sparice, Giovanni A. Tommaselli, Giuseppe Bifulco, Daniela Schettino and Carmine Nappi

Department of Obstetrics and Gynaecology, University of Naples Federico II, Naples, Italy

ABSTRACT **Objectives** To evaluate the effects of a combined oral contraceptive (COC) containing dienogest/oestradiol valerate (DNG/E₂V) on bone mineral density (BMD) and on serum and urinary bone turnover markers in young, healthy, fertile women.

Methods At baseline and after three and six months of intake of the aforementioned COC, serum and urinary calcium, osteocalcin, urinary pyridinoline (PYD), and deoxypyridinoline (D-PYD) of 30 women aged 21 to 34 years were measured. At baseline and after six months, lumbar bone mineral density was determined by dual-energy X-ray absorptiometry (DEXA).

Results Urinary levels of PYD and D-PYD were significantly lower at three and six months in comparison with basal values ($p < 0.05$). Serum calcium levels showed an increasing trend, which reached statistical significance after six months in comparison with basal values while urinary levels of calcium did not vary significantly. Serum osteocalcin levels were somewhat, but not significantly, lower during pill use in comparison with basal values. After six months, spinal BMD values did not differ significantly from basal values.

Conclusions The DNG/E₂V COC has no short-term adverse effect on bone turnover markers. No significant change in BMD was observed after six months of use of that pill.

KEY WORDS Contraception, Dienogest, Oestradiol valerate, Bone metabolism, Bone mineral density

INTRODUCTION

Bone is metabolically active; it undergoes continuous remodelling by osteoclasts and osteoblasts. The bone remodelling cycle involves sequential steps with a

highly complex regulation in which sex steroids play a pivotal role. Oestrogens are major determinants of bone mass, affecting the acquisition of peak bone mass during adolescence and young adult age, and

Correspondence: Costantino Di Carlo, Department of Obstetrics and Gynaecology, University of Naples "Federico II", Via S. Pansini 5, 80131 – Naples, Italy. Tel: + 390817462979. Fax: + 390817462905. E-mail: costantino.dicarlo@unina.it

modulating bone mineral density (BMD) and the risk of osteoporosis later in life¹⁻³. Combined oral contraceptives (COCs) induce a reduction of the endogenous production of oestrogen by the ovaries, and a suppression of that of progesterone. In women taking those hormonal contraceptives, circulating levels of sex steroids are mainly determined by the dosages present in the contraceptive formulation. If the latter does not achieve sufficiently high oestrogen levels, bone tissue metabolism may be affected. Studies on the effects of COCs on bone have given divergent results. This is probably due to differences in study design, duration of pill use, methods of BMD assessment, and population characteristics. Varying doses of oestrogen and different progestins could exert divergent effects on bone metabolism.

Our group recently did a systematic review of the data about the effects of different hormonal contraceptive formulations on BMD and fracture risk⁴. We concluded that, according to results derived from randomised controlled studies, the use of COCs is not associated with any clinically significant effect on BMD in the general population⁵⁻¹¹. However all these studies concerned COCs with ethinylestradiol (EE).

In 2009, a new oral contraceptive (Klaira[®]; Bayer Schering Pharma AG, Berlin, Germany) was introduced in Italy. In this COC, oestradiol valerate (E₂V) is combined with dienogest (DNG) in a quadriphasic dose regimen, using an oestrogen step-down and progestogen step-up approach (E₂V 3 mg on days 1-2; E₂V 2 mg/DNG 2 mg on days 3-7; E₂V 2 mg/DNG 3 mg on days 8-24; E₂V 1 mg on days 25-26; and placebo on days 27-28).

E₂V is cleaved to oestradiol at its first passage in the gut and liver¹² so that the circulating molecule reaching the oestrogen receptors is the natural 17β-oestradiol. DNG is a 19-nortestosterone derivative (a C-19 progestogen) with a cyanomethyl- instead of an ethinyl group at the C-17 position¹³. It is similar to 19-nortestosterone derivatives with a short plasma half-life (11 hours), a high oral bioavailability (more than 90%), and a strong progestational effect on the endometrium. However, DNG also has some properties typical of progesterone derivatives, including a lack of effect on metabolism and the cardiovascular system, and considerable antiandrogenic activity (corresponding to 40% of that of cyproterone acetate)¹⁴. The latter is increased by dienogest's lack of affinity for the sex-hormone binding globulin (SHBG), in contrast to other C-19 progestogens.

DNG/E₂V achieves good cycle control and causes no important side effects¹⁵. However, the influence of this pill on bone metabolism has not been investigated so far. The oestradiol content in the DNG/E₂V pill brings about a much less pronounced oestrogenic climate than do low-dose combined COCs releasing EE, so that an adverse effect of this pill on bone metabolism is within the realms of possibility. The aim of this study was to evaluate the effects of this combined DNG/E₂V oral contraceptive on BMD and on serum and urinary bone turnover markers in young, healthy, fertile women.

METHODS

Participants

From January 2011 to July 2011, we evaluated, before initiation of their treatment, all patients attending the contraception clinic of our department to whom Klaira[®] had just been prescribed by one of the gynaecologists, on the basis of his/her personal clinical judgement. We decided to enrol into this observational study subjects aged between 21 and 34 years because peak total body BMD in most women is achieved by age 20 and starts to decrease from 35 years onwards. Participants needed to meet the following inclusion criteria: age of menarche between 12 and 14 years, regular menstrual cycle, body mass index (BMI) <25 kg/m², and normal caloric intake determined by means of a questionnaire of similar design to that employed by Block *et al.*¹⁶. None of the women had ever used hormonal contraceptives before enrolment.

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, oestrogens, progestins, anabolic steroids, corticosteroids, calcium or vitamin D, phosphate, thiazidic diuretics) or drugs known to interfere with hormonal contraceptives (barbiturates, antiepileptics, rifampicine, griseofulvin), current cigarette smoking. Obviously, all (other) relevant contraindications for the use of COCs were considered exclusion criteria. Before entering the study, the protocol was clearly explained and a written informed consent was obtained from all participants. The study was approved by our institutional review board.

A complete medical history was taken from all women contemplating participation. In accordance with our Department routine, all had submitted to a pelvic examination during which a cervical smear had been taken and had had their blood pressure measured. The BMI of potential participants was calculated. Forty-eight women were evaluated, until 30 met all inclusion criteria and agreed to participate in the study.

Participants were instructed to start pill intake on the first day of the next spontaneous menses, to take one pill a day without interruption and, hence, to start a new blister on the day after the last pill of the previous one had been ingested.

Biochemical evaluation

At baseline, and after three and six months, indices of bone resorption (levels of serum and urinary calcium, urinary pyridinoline [PYD], and deoxypyridinoline [D-PYD]) and formation (osteocalcin) were measured. Blood and second void urine samples were collected between 8:00 and 9:00 a.m. after a 12-h fast, between day 5 and day 8 of the menstrual cycle. Blood samples collected in tubes with clot-activating factor were immediately centrifuged at a low temperature. Sera were stored at -80°C until assayed. Urine samples were kept at -20°C until biochemical analysis. All samples from the same woman were analysed in the same assay in a laboratory. Serum and urinary levels of calcium were determined as part of the biochemical routine evaluation (complete blood count, aspartate aminotransferase, 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 the PYD/urinary creatinine and D-PYD/urinary creatinine ratios. Osteocalcin was measured by radioimmunoassay (Nichols Institute Diagnostic, San Clemente, CA, USA). At the end of the study period, each participant's BMI was calculated again.

Determination of bone mineral density

Quantitative longitudinal changes of BMD were determined by dual X-ray absorptiometry (DEXA QDR 1000; Hologic, Waltham, MA) performed on the lower spine (L1–L4) at baseline and after six months of

treatment. The precision of the measurements, expressed as coefficients of variation (CV) *in vitro* for repeated BMD determinations in two standard phantoms, was 0.42%. The CV *in vivo*, evaluated by comparing two measurements performed at seven-day intervals in 33 volunteers, was 1.2% for the lumbar spine.

Bone mineral content (g) was divided by bone width (cm) to give an index (g/cm^2) that was used to standardise the findings for bone size. The absorptiometry was always done by the same observer. Absorptiometric findings are expressed as percentage of change from baseline values. Baseline scans were performed between the third and the seventh day of the pre-treatment cycle.

Statistical analysis

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 carried out with SPSS 9.0 (SPSS Inc, Chicago, IL, USA). Statistical significance was set at <0.05 . Data are expressed as mean \pm SD.

RESULTS

Of the 30 women selected, 28 completed the study. One had discontinued the treatment for personal reasons, and another one because of irregular bleeding. The baseline characteristics of the participants are listed in Table 1.

Serum calcium levels showed a rising trend, which reached statistical significance after six months, in comparison with basal values, whereas urinary levels of calcium did not vary significantly. At three and six months, urinary levels of PYD and D-PYD were significantly lower than at baseline ($p < 0.05$; Table 2).

Serum osteocalcin levels decreased, but not significantly so, over the study period (Table 2).

After six months, no significant difference was detected in spinal BMD values ($1.042 \pm 0.11 \text{ g}/\text{cm}^2$) in comparison with basal values ($1.041 \pm 0.08 \text{ g}/\text{cm}^2$). No significant changes in BMI were observed over the six-month study period.

Table 1. Demographic characteristics of the 30 participants at baseline.

Age (years)	BMI (kg/m ²)	SP (mm Hg)	DP (mm Hg)	Age at menarche (years)	Serum calcium (mmol/l) ^a	Urinary calcium (mmol/mmol Cr) ^b	BGP (ng/ml) ^c	U-D-PYD (nmol/mmol Cr) ^d	U-PYD (nmol/mmol Cr) ^e
28.4 ± 2.5	22.3 ± 1.4	126.4 ± 5.2	74.5 ± 3.2	13.5 ± 1.3	2.52 ± 0.05	275 ± 42	6.8 ± 0.7	8.1 ± 1.1	33.2 ± 5.2

BMI, body mass index; SP, systolic pressure; DP, diastolic pressure; Cr, creatinine; BGP, serum osteocalcin; U-D-PYD, urinary deoxypyridinoline; U-PYD, urinary pyridinoline

Data are expressed as mean ± standard deviation

^aReference interval (RI): 2.15–2.6; ^bRI: 200–520; ^cRI: 1.5–10; ^dRI: 5–14; ^eRI: <95

DISCUSSION

Findings and interpretation

Over six months of use the quadruphasic COC containing E₂V and DNG exerted no significant effects on BMD and bone turnover of young women.

Biochemical markers of bone resorption evaluated in our trial included urinary PYD and D-PYD, and serum and urinary calcium. PYD and D-PYD are the two major cross-link molecules involved in collagen stabilisation¹⁷. 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.

Serum osteocalcin was measured as a marker of bone formation. It is the most abundant non-collagenous protein in bone and is produced almost exclusively by osteoblasts. Serum osteocalcin concentration, therefore, is a sensitive index of bone formation that correlates with histo-morphometric measurements of bone formation in bone biopsy specimens¹⁸.

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 be clinically relevant, they suggest the lack of negative biological effect of this contraceptive formulation on bone turnover. Moreover, only a discrete, not significant drop in serum levels of osteocalcin was observed in comparison to basal values, indicating that bone formation was not negatively affected by treatment.

Our observation that serum calcium levels had risen, reaching statistical significance after six months of treatment, puzzled us. Since we did not evaluate dietary intake of the participants during the study, one possible explanation may be that a change in calcium intake could have caused this increase. Another hypothesis may be considered, namely, that a six-month follow-up period, encompassing different seasons, may have led to changes in vitamin D metabolism. Urinary calcium excretion decreased, but not significantly so, during treatment.

Strengths and weaknesses of the study

The main limitation of this study is its uncontrolled observational design. We chose this design considering

Table 2. Urinary pyridinoline (U-PYD), urinary deoxypyridinoline (U-D-PYD), serum calcium, urinary calcium and serum osteocalcin at baseline and after three and six months of treatment with a quadruphasic combined oral contraceptive containing oestradiol valerate and dienogest.

	Baseline	Three months	Six months
U-PYD (nmol/mmol Cr)	33.2 ± 5.2	28.3 ± 4.6*	24.6 ± 4.1*
U-D-PYD (nmol/mmol Cr)	8.1 ± 1.1	5.8 ± 0.9*	4.3 ± 1.0*
Serum calcium (mmol/l)	2.52 ± 0.05	2.57 ± 0.11	2.58 ± 0.12**
Urinary calcium (mmol/mmol Cr)	275 ± 42	282 ± 51	279 ± 45
Osteocalcin (ng/ml)	6.8 ± 0.7	6.7 ± 0.7	6.4 ± 0.6

Cr, creatinine; * $p < 0.05$ vs. baseline; ** $p < 0.01$ vs. baseline

that our previous studies on the effect of COCs on bone turnover had shown no significant changes in bone turnover markers and BMD in the untreated groups. In the literature there are no data on the effects of DNG/E₂V on bone. We decided to perform a preliminary study to determine whether this formulation affects bone metabolism and to have a reference for a power calculation for a future randomised controlled trial (RCT) with a longer follow-up period. This consideration taken into account, we felt that an untreated control group would be of limited usefulness. Another important drawback of this study is the short duration of follow-up, in particular with regard to the assessment of BMD changes.

Studies on the effects of COCs on BMD are complicated by the influence on BMD of many factors such as inheritance, diet, exercise and smoking¹⁹. To minimise the impact of these confounding factors, we recruited women having a normal caloric intake who did not smoke.

Differences in results and conclusions in relation to other studies

Our findings are in agreement with results of previous studies by our group, assessing other combined hormonal contraceptives^{4,6,7,9}. Indeed, similar effects on bone turnover without a modification of BMD were observed after treatment with a 21-day COC containing 20 µg EE and 75 µg gestodene⁶; an ultra-low-dose, 24-day COC containing 15 µg EE and 60 µg gestodene⁷; and 21-day COCs containing either 20 µg or 30 µg EE and 3 mg drospirenone⁹.

Relevance of the findings, unanswered questions and future research

The most innovating aspect of this study was the evaluation of the effects on bone of a COC of low oestrogenic potency. Indeed, all studies on record concerned COCs containing EE.

The systematic review we recently performed revealed that none of the RCTs assessing the effects of COCs on bone showed any significant change in BMD⁴⁻¹¹. But emerging data suggest that COCs may exert different effects in adolescents and perimenopausal women^{4,20}. Inclusion of both these age groups in future studies of this COC should be considered as it is often prescribed to perimenopausal women suffering from heavy menstrual bleeding.

CONCLUSION

The DNG/E₂V COC exerted no short-term adverse effect on bone. This observational, uncontrolled preliminary study requires confirmation by RCTs involving larger study samples and with longer follow-up.

Declaration of interest: Prof. C. Di Carlo and Prof. C. Nappi have taken part in the past in many trials run by pharmaceutical firms (Teva, Bayer Schering, Grunenthal, Formenti, Janssen Cilag, Organon). The authors alone are responsible for the content and the writing of the paper.

The cost of all laboratory tests and of the DEXA was defrayed by the Department of Obstetrics and Gynaecology of the University of Naples Federico II.

REFERENCES

- Fabbri G, Petraglia F, Segre A, et al. Reduced spinal bone density in young women with amenorrhea. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol* 1991;41:117–22.
- Davies MC, Hall ML, Jacobs HS. Bone mineral loss in young women with amenorrhea. *Br Med J* 1990;301:790–3.
- Drinkwater BL, Brummer B, Chesnut CH III. Menstrual history as a determinant of current bone density in young athletes. *JAMA* 1990;263:545–8.
- Nappi C, Bifulco G, Tommaselli GA, et al. Hormonal contraception and bone metabolism: A systematic review. *Contraception* 2012;86:606–21.
- Berenson AB, Radecki CM, Grady JJ, et al. A prospective, controlled study of the effects of hormonal contraception on bone mineral density. *Obstet Gynecol* 2001;98:576–82.
- Nappi C, Di Spiezio Sardo A, Acunzo G, et al. 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;67:355–9.
- Nappi C, Di Spiezio Sardo A, Greco E, et al. Effects of an oral contraceptive containing drospirenone on bone turnover and bone mineral density. *Obstet Gynecol* 2005;105:53–60.
- Endrikat J, Mih E, Dusterberg B, et al. A 3-year double-blind, randomized, controlled study on the influence of two oral contraceptives containing either 20 µg or 30 µg ethinylestradiol in combination with levonorgestrel on bone mineral density. *Contraception* 2004;69:179–87.
- Gargano V, Massaro M, Morra I, et al. 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;78:10–5.
- Hartard M, Kleinmond C, Luppä P, et al. Comparison of the skeletal effects of the progestogens desogestrel and levonorgestrel in oral contraceptive preparations in young women: Controlled, open, partly randomized investigation over 13 cycles. *Contraception* 2006;74:367–75.
- Paoletti AM, Orru M, Floris S, et al. Evidence that treatment with monophasic oral contraceptive formulations containing ethinylestradiol plus gestodene reduces bone resorption in young women. *Contraception* 2000;61:259–63.
- Düsterberg B, Nishino Y. Pharmacokinetic and pharmacological features of oestradiol valerate. *Maturitas* 1982;4:315–24.
- Ruan X, Seeger H, Mueck AO. The pharmacology of dienogest. *Maturitas* 2012;71:337–44.
- Oettel M, Graser T, Hoffman H. Why dienogest as a progestogenic component of postmenopausal nonandrogenic hormone replacement therapy. *Drugs Today* 2001;37:3–15.
- Guida M, Bifulco G, Di Spiezio Sardo A, et al. Review of the safety, efficacy and patient acceptability of the combined dienogest/estradiol valerate contraceptive pill. *Int J Womens Health* 2010;2:279–90.
- Block G, Hartman AM, Dresser CM, et al. A data-based approach to diet questionnaire design and testing. *Am J Epidemiol* 1986;124:453–69.
- Robin SP. Biochemical markers of bone metabolism. *CPD Bulletin Clin Biochem* 1999;1:116–21.
- Delmas PD. Biochemical markers of bone turnover for the clinical assessment of metabolic bone disease. *Endocrinol Metab Clin North Am* 1990;19:1–18.
- The ESHRE Capri Workshop Group. Noncontraceptive health benefits of combined oral contraception. *Hum Reprod Update* 2005;11:513–25.
- Warholm L, Petersen KR, Ravn P. Combined oral contraceptives' influence on weight, body composition, height, and bone mineral density in girls younger than 18 years: A systematic review. *Eur J Contracept Reprod Health Care* 2012;17:245–53.

2c. Studio osservazionale sugli effetti di un contraccettivo orale contenente estradiolo valerato e dienogest sull'iperandrogenismo e sull'acne.

Abbiamo effettuato uno studio osservazionale prospettico, longitudinale, a singolo braccio sugli effetti dell'associazione E2V/DNG sull'iperandrogenismo.

Da Aprile 2011 a Ottobre 2011, abbiamo valutato 124 donne che hanno richiesto contraccezione ormonale orale. I criteri d'inclusione sono stati:

- Età tra 15 e 22 anni;
- Diagnosi di PCOS secondo quanto stabilito dai Criteri di Rotterdam;
- Acne di grado lieve o moderato secondo i Criteri di James e Tisserand.

Sono state escluse dallo studio tutte le pazienti con:

- Diagnosi o sospetto di gravidanza;
- Grado 4 (severo) di acne;
- Iperandrogenismo da cause diverse dalla PCOS;
- Controindicazioni all'utilizzo di contraccettivi combinati orali.

Al momento del reclutamento, ciascuna paziente è stata informata circa gli scopi e le modalità dello studio e da tutte le pazienti è stato ottenuto un

consenso informato scritto. Lo studio è stato approvato dal Comitato Etico.

Tutte le partecipanti sono state valutate mediante un'accurata anamnesi medica e ginecologica, hanno praticato un Pap-test e una visita ginecologica bimanuale e a tutte le pazienti è stata misurata la pressione arteriosa sistolica e diastolica. Delle 124 donne che sono state valutate, 49 hanno soddisfatto i criteri di inclusione e 40 di queste hanno accettato di partecipare allo studio. Le pazienti sono state istruite circa i tempi di assunzione del contraccettivo: a tutte le partecipanti è stato detto di iniziare a prendere la pillola il primo giorno del successivo ciclo mestruale, continuando, poi, per 28 giorni senza interruzione, con un nuovo blister.

Al momento del reclutamento, a 6 e a 12 mesi, a ciascuna paziente, è stato eseguito un prelievo ematico per la misurazione dei livelli di testosterone libero e di SHBG. I campioni prelevati sono stati sierati e congelati immediatamente a -80° C. I livelli di testosterone libero sono stati determinati utilizzando un kit ELISA (Genway Biotech, Inc. San Diego, CA, USA) con una sensibilità di 0,07 ng/ml e con un coefficiente di variabilità (CV) intraesame di 5.8 ed un CV interesame di 10.5. I livelli di SHBG sono stati misurati mediante kit ELISA (Genway Biotech, Inc. San

Diego, CA, USA) con una sensibilità di 0,77 nmol/L, un coefficiente di variabilità (CV) intraesame di 9.0 ed un CV interesame di 8.0.

Al momento del reclutamento e dopo 12 mesi in tutte le pazienti è stato valutato l'indice di massa corporea (BMI) mediante la formula: $\text{Peso (Kg)} / \text{Altezza}^2 \text{ (m)}$ e il grado di acne mediante lo score di James e Tisserand.

L'analisi statistica è stata effettuata utilizzando il programma Statistical Package for Social Science versione 9.0 (SPSS Inc., Chicago, IL, USA).

Per valutare la distribuzione dei dati, abbiamo utilizzato il test di Shapiro-Wilks. Tutte le variabili continue hanno mostrato una distribuzione normale e le differenze tra i livelli di testosterone e di SHBG, ai diversi tempi, sono state valutate con ANOVA seguito da test di Bonferroni. Le differenze in proporzione sono state calcolate con il test χ^2 . La significatività statistica è stata fissata per un valore di $P < 0.05$.

Delle 40 donne reclutate per lo studio, 4 hanno deciso di interrompere il trattamento per motivi personali, le restanti 36 hanno portato a termine il protocollo. All'inizio dello studio, 24 pazienti (66.7%) avevano un acne di grado 1-2 (lieve) e 12 pazienti (33.3%) avevano un acne di grado 3 (moderato). Dopo 12 cicli di terapia abbiamo riscontrato nel gruppo di pazienti con acne di grado lieve una scomparsa dell'acne in 12 pazienti, una riduzione delle lesioni in 9 pazienti e un peggioramento dell'acne in 3 pazienti. Tra le 12 pazienti con acne di grado moderato, 7 hanno

presentato una forma lieve di acne alla fine dello studio e 5 una riduzione delle lesioni non sufficiente perché ad esse si potesse attribuire una forma di acne di grado 2. Complessivamente abbiamo riscontrato un peggioramento dell'acne in 3 pazienti (8.4%) e una riduzione delle lesioni acneiche in 19 pazienti (52.8%). Il numero delle pazienti migliorate è statisticamente significativo ($p < 0.01$). I livelli di SHBG hanno dimostrato un aumento statisticamente significativo dopo 6 e 12 mesi ($p < 0.001$) di terapia, al contrario dei livelli di testosterone libero che, nonostante siano più bassi a 6 e a 12 mesi, non hanno raggiunto la significatività statistica.

L'efficacia dei contraccettivi orali combinati con progestinici antiandrogeni nel trattamento dell'acne è stata dimostrata da diversi studi. Tuttavia questi studi riguardano contraccettivi orali contenenti EE. Il contenuto di estradiolo nella pillola a base di E2V e DNG fornisce un effetto estrogenico molto inferiore anche rispetto alle formulazioni a basso dosaggio di EE. Quindi si può ipotizzare un effetto più debole di questa nuova formulazione sui livelli di SHBG, portando così ad una mancanza di effetti benefici sui sintomi dell'iperandrogenismo nonostante le proprietà antiandrogene del dienogest.

Tuttavia i risultati di studi precedenti hanno dimostrato che il trattamento con E2V/DNG aumenta i livelli di SHBG. In accordo a questi dati, nel

nostro studio abbiamo riscontrato un significativo aumento dei livelli di SHBG già dal sesto mese di terapia. Dopo un anno di terapia abbiamo rilevato bassi livelli di testosterone in tutte le pazienti, anche se questi dati non hanno raggiunto la significatività statistica. Anche questo risultato è in accordo con quanto riportato già in letteratura.

In questo studio osservazionale abbiamo riscontrato un miglioramento dell'acne nel 52,8% delle pazienti e un peggioramento nel 12,5%. La mancanza di un forte effetto della terapia è dovuto, probabilmente, alla breve durata del trattamento. Infatti, è stato dimostrato che vi è una correlazione importante tra la durata del trattamento con il contraccettivo e il suo effetto terapeutico. È stato dimostrato che l'effetto terapeutico completo si raggiunge dopo circa 2 anni di trattamento.

L'effetto positivo sull'acne dell'associazione E2V/DNG in assenza di una significativa riduzione dei livelli di T può essere spiegato anche con un'azione diretta del DNG su 5 α -reduttasi. Infatti, seborrea e acne possono essere associati sia a elevate concentrazioni di testosterone nel siero sia a un'eccessiva azione locale di DHT dovuta all'iperattività dell'enzima 5 α -reduttasi o a una maggiore sensibilità ai suoi effetti.

In conclusione, i risultati di questo studio suggeriscono che il contraccettivo orale a base di E2V e DNG esercita un effetto positivo sull'acne e sull'iperandrogenismo sebbene i nostri dati siano preliminari e

abbiano bisogno di essere confermati da studi randomizzati controllati su popolazioni più ampie e con una maggiore durata del follow-up, anche per determinare gli effetti di questo contraccettivo per più lunghi periodi di utilizzo.

ORIGINAL ARTICLE

Effects of an oral contraceptive containing estradiol valerate and dienogest on circulating androgen levels and acne in young patients with PCOS: an observational preliminary study

Costantino Di Carlo, Virginia Gargano, Stefania Sparice, Giovanni A. Tommaselli, Giuseppe Bifulco, and Carmine Nappi

Department of Neurosciences and Reproductive Sciences, University of Naples Federico II, Naples, Italy

Abstract

This study shows the effect of a 1 year treatment with an estradiol valerate/dienogest pill in 36 women suffering from polycystic ovaries and mild or moderate acne. 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, we found an improvement of acne in 19 (52.8%) patients and a worsening of acne in 3 (8.4%) patients. The percentage of patients recovered was statistically significant ($p < 0.01$). SHBG levels were significantly higher after 6 and 12 months of therapy ($p < 0.001$), while total testosterone levels were lower in all patients at 6 and 12 months although this trend did not reach statistical significance. In conclusion, the present study suggests that the E2V/DNG pill could exert a positive influence on acne and hyperandrogenism. Since this is an observational study on a very limited population number, additional randomized controlled studies on larger populations are needed also to determine the effects of this contraceptive over longer periods of use.

Keywords

Acne, dienogest, estradiol valerate, PCOS

History

Received 12 June 2013
Revised 18 July 2013
Accepted 1 August 2013
Published online 9 September 2013

Introduction

Polycystic ovary syndrome (PCOS) is one of the most common endocrine disorders in women characterized by a heterogeneous combination of signs and symptoms [1]. Hyperandrogenism is a key element of PCOS. It is largely of ovarian origin, though the adrenal contribution cannot be ignored [2]. High androgens levels may cause hirsutism and acne in women, although acne is only a weak feature of hyperandrogenemia. Indeed, sebaceous glands, hair follicles and several types of skin cells contain androgen receptors and 5 α -reductase, a peripheral enzyme that converts T to dihydrotestosterone (DHT), a more active androgen. Combined oral contraceptives (COCs) are considered in clinical practice the first line treatment for women suffering from ovarian hyperandrogenism [3], although according to The Endocrine Society's Clinical Guidelines on hirsutism, this therapy is supported by low-quality evidence [4].

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

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 [5]. However, the increase in plasma SHBG concentration is blunted by the androgenic activity of the progestin component. Therefore, progestins with low androgenic activity or with antiandrogenic activity are generally considered better for women suffering from hyperandrogenism-related symptoms [10].

In 2009, a new oral contraceptive has been introduced in Italy. In this oral contraceptive, estradiol valerate (E2V) is combined with dienogest (DNG) in a quadruphasic dose regimen, using an estrogen step-down and progestogen step-up approach (E2V 3 mg on days 1–2, E2V 2 mg/DNG 2 mg on Days 3–7, E2V 2 mg/DNG 3 mg on Days 8–24, E2V 1 mg on Days 25–26 and placebo on Days 27–28).

E2V is immediately cleaved to estradiol after oral intake: so the circulating molecule reaching the estrogen receptors is the natural 17 β -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]. 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.

Address for correspondence: Prof. Costantino Di Carlo, Department of Neurosciences and Reproductive Sciences, University of Naples Federico II, Via Pansini 5, 80131 Naples, Italy. Tel: +390817462979. Fax: +390817462905. E-mail: costantino.dicarlo@unina.it

Methods

This prospective, longitudinal, single-arm, baseline controlled, one-year follow-up observational 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 E2V and DNG were evaluated for inclusion in the study. Inclusion criteria were: age between 15 and 22 years, PCOS as defined according to the Rotterdam criteria (oligo and/or anovulation, clinical and/or biochemical signs of hyperandrogenism, polycystic ovaries and exclusion of other etiologies) [16], acne as graded by the James and Tisserand grading scheme [17]. Exclusion criteria were: confirmed or suspected pregnancy, grade 4 acne, causes of hyperandrogenism different from PCOS, current use of anti-androgens, insulin-sensitizers and topic drugs for acne 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. For patients aged less than 18 years, we obtained consent from their parents. The study was approved by the Institutional Review Board.

Before inclusion, as is standard procedure for all patients prescribed COC in our institution, all women evaluated underwent a complete medical and gynecological history, pap smear, bimanual pelvic examination and evaluation of systolic and diastolic pressure. A total of 49 women satisfied all inclusion criteria and 40 agreed to participate in 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. Patients in amenorrhea due to anovulation, started pill the first day of a progestogen-induced uterine bleeding.

At baseline and after 6 and 12 months, free T levels were measured by ELISA kit (Genway Biotech, Inc., San Diego, CA) with a sensitivity of 0.07 ng/ml, an intra assay coefficient of variation (CV) $\leq 5.8\%$ and an inter assay CV $\leq 10.5\%$. At baseline and after 6 and 12 months, SHBG levels were measured by ELISA kit (Genway Biotech, Inc.), with a sensitivity of 0.77 nmol/L, an intra assay CV $\leq 9.0\%$ and an inter assay CV $\leq 8.0\%$.

BMI was calculated for all patients at the beginning of the study and after 12 months. Moreover, at baseline and after 12 months all patients underwent acne grading by the same physician. Acne grading was performed using the James and Tisserand grading scheme [17]. In this grading system, four 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 that was used to evaluate differences in T and SHBG levels at different times. Difference in proportions was evaluated using the χ^2 test. Statistical significance was set for a *p* value of <0.05 .

Table 1. Baseline characteristics of patients.

Age (years)	19.46 \pm 2.5
Body mass index (kg/m ²)	27.8 \pm 1.6
Systolic pressure (mmHg)	115.4 \pm 6.2
Diastolic pressure (mmHg)	70.0 \pm 5.4
Menarche (years)	12.9 \pm 1.5
Free testosterone levels (pg/ml)	3.6 \pm 0.6
SHBG levels (nmol/l)	24.0 \pm 5.2

Values are reported as mean \pm SD.

Table 2. Effects of estradiol valerate/dienogest treatment on acne.

Grade of acne	Baseline (n)	12 cycles (n)
0	0	12 (33.3%) ^a
Mild	24 (66.7%)	16 (44.4)
Moderate	12 (33.3%)	8 (22.3%)
Severe	0	0

Values are given as n (%).

^a*p* < 0.01 versus baseline.

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. PCOS phenotypes in study population were: polycystic ovaries and oligo- and/or anovulation *n* = 15 (41.7%); polycystic ovaries and clinical and/or biochemical signs of hyperandrogenism *n* = 9 (25%); oligo and/or anovulation and clinical and/or biochemical signs of hyperandrogenism *n* = 7 (19.4%); polycystic ovaries, oligo and/or anovulation and clinical and/or biochemical signs of hyperandrogenism *n* = 5 (13.9%).

At the 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 nine patients with mild acne we found an improvement in lesions, while three patients with mild acne worsened. Among the 12 patients suffering from moderate acne, seven presented a mild form at the end of the study and five presented an improvement in lesions that was not sufficient to score them as grade 2. Overall, we found a worsening of acne in three patients (8.4%) and an improvement of acne in 19 (52.8%) patients (Table 2). Number of patients recovered was statistically significant (*p* < 0.01).

SHBG levels were significantly higher after 6 and 12 months of therapy (*p* < 0.001) (Table 3), while total testosterone levels were lower in all patients at 6 and 12 months although this trend did not reach statistical significance (Table 3).

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, and acne is not a criteria for PCOS diagnosis, 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 [19,20].

However, all these studies concerned COCs with EE. The estradiol content in the DNG/E₂V pill provides a much lower estrogenic effect than low dose combined COCs with EE.

Table 3. Effects of estradiol valerate/dienogest treatment on SHBG and free testosterone levels.

	Baseline	6 cycles	12 cycles
SHBG	24.0 ± 5.2	44 ± 6.7*	46 ± 6.1 ^a
Free testosterone levels	3.6 ± 0.6	3 ± 0.5	2.8 ± 0.6

Values are reported as mean ± SD.

^a*p* < 0.001 versus baseline.

So, it may be hypothesized a weaker effect of this COC on SHBG, leading to a lack of beneficial effects on hyperandrogenism-related symptoms in spite of the antiandrogenic properties of DNG.

Nevertheless, results of previous studies demonstrated that treatment with DNG/E₂V increases SHBG levels [21,22]. According to these data in the present study we found a significant increase of SHBG levels already from the sixth month of therapy. After 12 months, we found lower testosterone levels in all patients, although this trend did not reach statistical significance. Also this result is in agreement with previous data in literature [21,23].

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 [24].

The positive effect on acne of DNG/E₂V pill in the absence of a significative reduction of T levels may be explained also with a direct action of DNG on 5 α -reductase. Indeed, seborrhea and acne may be associated with either elevated serum testosterone concentrations or an excessive local action of DHT due to skin 5 α -reductase overactivity or to increased sensitivity to its effects [25].

In conclusion, the present study suggests that the E2V/DNG pill could exert a positive influence on acne and hyperandrogenism. A *post-hoc* power analysis evaluating the proportion of improved versus worsened patients showed a power of the study of 89.4%.

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.

Declaration of interest

The authors report no conflicts of interest.

References

1. Franks S. Polycystic ovary syndrome. *N Engl J Med* 1995; 333: 853–61.
2. De Leo V, La Marca A, Petraglia F. Insulin-lowering agents in the management of polycystic ovary syndrome. *Endocr Rev* 2003; 24: 633–67.

3. Oláh KS. The modern management of hirsutism. *Rev Gynaecol Practice* 2004;4:211–20.
4. The Endocrine Society's Clinical Guidelines. Evaluation & Treatment of Hirsutism in Premenopausal Women: an Endocrine Society Clinical Practice Guideline. *J Clin Endocr Metab* 2008;93: 1105–20.
5. Murphy AA, Cropp CS, Smith BS, et al. Effect of low-dose oral contraceptive on gonadotropins, androgens, and sex hormone binding globulin in non-hirsute women. *Fertil Steril* 1990;53:35–9.
6. van der Vange N, Blankenstein MA, Kloosterboer HJ, et al. Effects of seven low-dose combined oral contraceptives on sex hormone binding globulin, corticosteroid binding globulin, total and free testosterone. *Contraception* 1990;41:345–52.
7. 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.
8. Azziz R, Gay F. The treatment of hyperandrogenism with oral contraceptives. *Semin Reprod Endocrinol* 1989;7:246–54.
9. Dewis P, Patsos 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;61:151–7.
13. Sitruk-Ware R, Nath A. The use of newer progestins for contraception. *Contraception* 2010;82:410–7.
14. Bitzer J. The importance of antiandrogenicity of progestogens. *Gynaecol Forum* 2009;14:21–3.
15. Mueck AO, Seeger H. Pharmacology of dienogest. *Gynaecol Forum* 2009;14:9–12.
16. Rotterdam ESHRE/ASRM-Sponsored PCOS Consensus Workshop Group. Revised 2003 consensus on diagnostic criteria and long-term health risks related to polycystic ovary syndrome. *Fertil Steril* 2004; 81:19–25.
17. Ramlı R, Malik AS, Hani AFM, Jamil A. Acne analysis, grading and computational assessment methods: an overview. *Skin Res Technol* 2012;18:1–14.
18. Lasek RJ, Chen MM. Acne vulgaris and the quality of life of adult dermatology patients. *Arch Dermatol* 1998;134:454–8.
19. Palombo-Kinne E, Schellschmidt I, Schumacher U, Gräser T. Efficacy of a combined oral contraceptive containing 0.030 mg ethinylestradiol/2 mg dienogest for the treatment of papulopustular acne in comparison with placebo and 0.035 mg ethinylestradiol/2 mg cyproterone acetate. *Contraception* 2009;79:282–99.
20. van Vloten WA, van Haselen CW, van Zuren EJ, et al. The effect of 2 combined oral contraceptives containing either drospirenone or cyproterone acetate on acne and seborrhea. *Cutis* 2002;69:2–15.
21. Caruso S, Agnello C, Romano M, et al. Preliminary study on the effect of four-phasic estradiol valerate and dienogest (E2V/DNG) oral contraceptive on the quality of sexual life. *J Sex Med* 2011;8: 2841–50.
22. Guida M, Bifulco G, Di Spiezio Sardo A, et al. Review of the safety, efficacy and patient acceptability of the combined dienogest/estradiol valerate contraceptive pill. *Int J Womens Health* 2010;2: 279–90.
23. Wiegatz I, Jung-Hoffmann C, Kuhl H. Effect of two oral contraceptives containing ethinylestradiol and gestodene or norgestimate upon androgen parameters and serum binding proteins. *Contraception* 1995;51:341–6.
24. Arrington EA, Patel NS, Gerancher K, Feldman SR. Combined oral contraceptives for the treatment of acne: a practical guide. *Cutis* 2012;90:83–90.
25. Del Marmol V, Teichmann A, Gertsen K. The role of combined oral contraceptives in the management of acne and seborrhea. *Eur J Contracept Reprod Health Care* 2004;9:107–24.

Capitolo 3. Ormoni sessuali femminili in terapia: effetti di diverse vie di somministrazione

3a. Vie di somministrazione alternative alla via orale

La somministrazione di ormoni per vie alternative a quella orale presenta numerosi vantaggi legati ad un minor impatto metabolico, e ad una maggiore biodisponibilità farmacologica. Riguardo all'impatto metabolico, ad esempio, è noto che l'Etinil-estradiolo (EE) somministrato per via orale, va incontro ad un "first-pass" epatico che si associa un aumento della Sex Hormon Binding Globulin (SHBG), dell'Angiotensinogeno, e dell'LDL, determinando uno switch verso una pattern pro trombotico del quadro ematico.

Inoltre, la somministrazione per vie differenti alla via orale, determina una biodisponibilità del farmaco costante nel tempo e non soggetta a fluttuazioni nell'arco delle 24 ore. Il diminuito impatto a livello epatico e la minore influenza su fattori di rischio presenti all'anamnesi della paziente fanno preferire molte volte l'utilizzo della contraccezione transdermica, transmucosale e sottocutanea a quella orale.

Di contro, la somministrazione di ormoni per vie differenti a quella orale, può determinare possibili svantaggi, come ad esempio una minore regolarità del ciclo o una ridotta compliance da parte della paziente.

Riguardo agli estrogeni, attualmente esiste la possibilità di utilizzare in terapia 17β estradiolo per via transdermica, 17β estradiolo in gel percutaneo, 17β estradiolo spray nasale e ancora estrogeni per via vaginale.

La somministrazione di 17β estradiolo per via transdermica determina livelli terapeutici di estradiolo nel plasma circolante con più bassi livelli di estrone ed estrone solfato, per cui richiede dosi minori rispetto alla via orale. Si ha una variabilità interindividuale nell'assorbimento e nel 6-8% dei casi il cerotto non aderisce perfettamente o si hanno problemi di allergia. Dopo la rimozione del cerotto i livelli di estradiolo declinano in 12-24 ore.

La formulazione in gel percutaneo è costituita da un gel idroalcolico attraverso il quale il principio attivo è assorbito dalla pelle determinandosi a livello sottocutaneo un "effetto riserva" dell'ormone della durata di 24 ore.

Le concentrazioni plasmatiche di E1 ed E2 sono significativamente elevate, stabili e con una ridotta variabilità intraindividuale, contrariamente a quanto avviene con la somministrazione orale di E2 in cui sono presenti ampie fluttuazioni. Si ha una minore incidenza di reazioni cutanee rispetto alla via transdermica.

Questa modalità terapeutica si adatta facilmente alle singole esigenze, con possibilità di somministrare dosaggi da 0.5 a 3 mg/die di E2.

L'E2 può essere inoltre essere somministrato in soluzione acquosa come spray nasale. Anche questa via di somministrazione abolisce il primo passaggio epatico dell'ormone.

Il suo profilo farmacocinetico è caratterizzato da alti e rapidi livelli di concentrazione plasmatica di E2, che raggiunge il picco già dopo 10-30 minuti.

Non vi è accumulo né di E2 né di E1 e conseguentemente si ha una ridotta variabilità intra ed interindividuale dei livelli ormonali circolanti. In particolare la concentrazione di E1 è tre volte più bassa di quella dell'E2.

Al contrario, con la somministrazione di E2 per via orale o come patch transdermico, si hanno prolungati ed elevati plateau estrogenici.

Questa via di somministrazione consente un facile aggiustamento del dosaggio e la modalità di assorbimento rende il farmaco rapidamente efficace. Generalmente nella pratica clinica si impiega il dosaggio di 300 µg/die pari a 2 nebulizzazioni in un'unica somministrazione.

Riguardo alla somministrazione di estrogeni per via vaginale, questa via di somministrazione, bypassando il fegato, è indicata per il mantenimento o il ripristino del trofismo a livello urogenitale in assenza di una sintomatologia sistemica. Sono disponibili preparati contenenti ECE, E2 ,

E3 e promestriene. E' importante ricordare che le modificazioni ormonali che si ottengono dopo l'applicazione topica di ECE sono analoghe a quelle ottenibili con lo stesso dosaggio somministrato per via orale, si ha infatti un significativo incremento di E1, che costituisce una riserva circolante di E2. Questo si traduce nella pratica clinica quotidiana nella necessità di dover usare estrema cautela nel suo impiego, raccomandando, dopo una terapia di attacco giornaliera, in genere di 14 giorni, la somministrazione di 2 volte alla settimana, evitando così che la somministrazione prolungata possa comunque determinare una stimolazione dell'endometrio.

L'E2 può essere somministrato sotto forma di compresse vaginali, il picco plasmatico della concentrazione di E2 ottenuto con questa via è due-quattro volte più alto del livello plasmatico basale in menopausa e simile alla concentrazione ottenibile con lo stesso dosaggio assunto per via orale. L'E3 disponibile in crema vaginale e ovuli, determina gli stessi livelli plasmatici dell'ormone somministrato per os, anche se col trascorrere dei giorni di terapia si ha un importante decremento nell'assorbimento del farmaco che è meno marcato quando l'epitelio vaginale è meno atrofico e più maturo. L'E3 è un estrogeno debole con scarsi effetti a livello della mucosa endometriale.

Il promestriene, derivato estrogenico di sintesi, è un interessante prodotto ad azione locale, privo di attività sistemica a seguito dell'applicazione in vagina, dove esplica effetti biologici paragonabili a quelli dell'estradiolo. Diversi studi hanno mostrato la sua efficacia sulla sintomatologia urogenitale.

Per quanto attiene ai progestinici, questi possono essere somministrati per via intrauterina, tramite l'impiego di un dispositivo intrauterino (LNG-IUS) a forma di T, della durata di 5 anni. Questa tipologia di rilascio determina bassi livelli plasmatici dell'ormone, mentre le sue concentrazioni tissutali sono particolarmente elevate a livello endometriale.

Il Noretisterone acetato e il Levonorgestrel possono essere inoltre somministrati sotto forma di patch in associazione a 17β -E2. Questi ormoni vengono rilasciati da una matrice acrilica adesiva che li incorpora.

In questi anni il nostro gruppo di ricerca ha effettuato due studi sulla somministrazione di progesterone per vie alternative a quella orale. Il primo studio ha riguardato il confronto tra via di somministrazione orale e vaginale del progesterone naturale in terapia ormonale sostitutiva. Il secondo studio ha riguardato gli effetti sulla qualità di vita e sulla sfera sessuale di una nuova metodica contraccettiva consistente nell'impianto sottocutaneo di etonorgestrel (ENG).

3b. Somministrazione del progesterone naturale per via vaginale

I composti chimicamente uguali al progesterone di origine ovarica vengono definiti “progesterone naturale” (P). La via orale di somministrazione del P ne determina una biodisponibilità relativamente bassa con uno scarso assorbimento ed un rapido metabolismo epatico (first-pass effects) ma la micronizzazione rende la biodisponibilità del P simile a quella dello steroide naturale e la variabilità intra ed interindividuale è simile a quella dei progestinici di sintesi. Inoltre, la sospensione in olio ed il confezionamento in capsule in gelatina aumenta ulteriormente l’assorbimento intestinale del progesterone micronizzato. La concentrazione plasmatica è proporzionale alla dose somministrata ed il picco plasmatico varia da caso a caso. L’ingestione concomitante di alimenti ne incrementa i livelli plasmatici stimolandone quindi assorbimento e biodisponibilità senza modificare la percentuale assorbita. L’affinità dei metaboliti del P a recettori GABA-ergici fa sì che la sua somministrazione per questa via abbia un’effetto ipno-inducente che può essere desiderata da soggetti che hanno disturbi del sonno e che per questo preferiranno l’assunzione serale del farmaco.

La possibilità di utilizzare il P naturale per una via diversa dall’orale consente di impiegare il preparato a basse dosi, soprattutto disponibili proprio là dove serve a livello endometriale, dove esso è altamente

efficace nell'indurre la maturazione secretiva. Inoltre, la somministrazione non orale di P non determina gli effetti psicotropi tipici della somministrazione per os.

Lo studio prospettico "Postmenopausal Estrogens/Progestin Intervention trial" ha raccomandato l'utilizzo del progesterone naturale micronizzato come prima scelta per bilanciare gli effetti degli estrogeni nelle donne in postmenopausa che effettuano terapia ormonale sostitutiva. Infatti, questa formulazione somministrata per via orale, si è dimostrata efficace quanto i progestinici sintetici nel controllo della proliferazione endometriale col vantaggio di determinare minori effetti metabolici. Inoltre, l'utilizzo del progesterone naturale è stato associato ad un rischio inferiore di sviluppo di cancro della mammella rispetto ai progestinici di sintesi.

Tuttavia il nostro gruppo ha effettuato uno studio sulla somministrazione orale di 4 differenti progestinici (medrossiprogesterone acetato, 10 mg/die; nomegestrolo acetato, 5 mg/die; dydrogesterone, 10 mg/die; progesterone naturale micronizzato 200 mg/die) in associazione all'estradiolo somministrato per via trans dermica in terapia ormonale sostitutiva, osservando una incidenza di bleeding regolari significativamente inferiore ed una incidenza di spotting significativamente superiore nelle pazienti trattate con progesterone naturale.

Dati i potenziali vantaggi legati all'utilizzo del progesterone naturale rispetto ai progestinici sintetici e considerando la bassa compliance alla terapia nelle pazienti che presentano bleeding irregolari, è importante valutare quale dose di progesterone naturale e quale via di somministrazione si associa ad un miglior controllo del ciclo.

Pertanto presso il nostro Dipartimento abbiamo effettuato uno studio per valutare gli effetti sul pattern di bleeding della somministrazione del progesterone naturale micronizzato a diverse dosi per via orale o vaginale in associazione ad estrogeni per via transdermica, in donne 100 in postmenopausa desiderose di terapia ormonale sostitutiva.

Criteri di inclusione sono stati: presenza di sintomatologia climaterica, body mass index (BMI) < 30 kg/m²; assenza di patologie significative e di controindicazioni all'utilizzo di terapia ormonale sostitutiva, assenza di precedenti trattamenti per la sintomatologia climaterica.

Criteri di esclusione sono stati: patologie in atto, fumo di sigaretta, anomalie all'ecografia transvaginale.

Le pazienti sono state randomizzate utilizzando una lista di randomizzazione generata al computer, in 4 gruppi di trattamento di 25 pazienti ciascuno. Tutte le pazienti hanno ricevuto 17β-estradiolo per via trans dermica alla dose di 50 µg/die, associato a 100 mg die di progesterone naturale micronizzato somministrato per os (gruppo A), a

200 mg die di progesterone naturale micronizzato somministrato per os (gruppo B), a 100 mg die di progesterone naturale micronizzato somministrato via vaginale (gruppo C), o a 200 mg die di progesterone naturale micronizzato somministrato per via vaginale (gruppo D).

L'outcome primario dello studio è stato la valutazione degli effetti di questi regimi terapeutici sul pattern di bleeding in termini di regolarità del sanguinamento, episodi di amenorrea, episodi di bleeding irregolare, episodi di spotting, giorno di inizio del sanguinamento e durata del sanguinamento stesso.

Outcome secondario è stata la determinazione dello spessore endometriale valutato con ecografia pelvica transvaginale all'inizio dello studio e dopo 12 mesi.

Alle pazienti è stato richiesto di registrare su un diario l'insorgenza del bleeding vaginale e di ogni evento avverso.

Delle 100 pazienti arruolate, 80 hanno completato lo studio. Dopo 12 cicli di trattamento non si sono osservate differenze significative nello spessore endometriale tra i gruppi, con uno spessore < 6 mm in tutte le pazienti.

Su un totale di 960 cicli di trattamento, 15 non sono risultati valutabili per incompletezza dei diari. Gli episodi di bleeding regolare sono risultati significativamente maggiori nei gruppi C e D rispetto al gruppo A ma significativamente più bassi nel gruppo D rispetto al gruppo C. Nel

gruppo C si è inoltre osservato un tasso di bleeding regolare significativamente maggiore di quello osservato nel gruppo B.

Nel gruppo D si è osservata una maggiore incidenza di amenorrea rispetto agli altri gruppi, mentre nel gruppo A si è osservata una incidenza di bleeding irregolare maggiore rispetto altri gruppi. Non si sono osservate differenze significative negli episodi di bleeding irregolare tra i gruppi C e D, mentre tali episodi sono risultati significativamente più bassi nel gruppo D rispetto al gruppo B.

Gli episodi di spotting osservati sono risultati significativamente inferiori nei gruppi C e D rispetto ai gruppi A e B, senza significative differenze tra i gruppi C e D. Non si sono osservate differenze significative tra i gruppi riguardo al giorno di insorgenza del bleeding e alla sua durata.

I risultati di questo studio dimostrano che la somministrazione di progesterone micronizzato per via vaginale si associa ad un miglior controllo del pattern di bleeding, associato ad una migliore compliance alla terapia, come dimostrato dal maggior numero di pazienti che hanno completato lo studio (rispettivamente il 96% e il 92% nei gruppi C and D rispetto al 76% e all'80% osservato nei gruppi A e B).

Per questo questa via di somministrazione dovrebbe essere quella di scelta per le pazienti in postmenopausa che necessitano di terapia ormonale

sostitutiva, cominciando dal dosaggio più basso (100 mg/die) anche per prevenire il rischio di amenorrea.

BLEEDING PATTERNS DURING REPLACEMENT THERAPY WITH CONTINUOUS TRANSDERMAL ESTRADIOL IN ASSOCIATION WITH ORAL OR VAGINAL SEQUENTIAL NATURAL PROGESTERONE: A PROSPECTIVE, RANDOMIZED TRIAL

Di Carlo Costantino (IT), Annamaria Fabozzi, Virginia Gargano, Nicoletta De Rosa Romina Santoro, Mariangela Massaro, Carmine Nappi

University of Naples

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 hypothetical 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 mg/day of transdermal 17 β -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.

3b. La contraccezione con impianto sottocutaneo

L'impianto a base di ENG (Implanon®, NV Organon, Oss, The Netherlands ; per l'Italia Nexplanon® da MSD, Milano) è stato approvato dalla Food and Drug Administration (FDA) nel 2006 ed è attualmente utilizzato in più di 30 paesi. Questo metodo contraccettivo provvede a fornire una contraccezione efficace, di lunga durata e velocemente reversibile, rappresentando un' eccellente opzione per le donne che abbiano controindicazioni all' utilizzo di estrogeni. L' impianto a base di ENG è una singola bacchetta di 4 cm in lunghezza e 2 mm di diametro con un core di vinile etilene acetato (EVA) impregnato con 68 mg di ENG, il metabolita attivo del desogestrel.

L'inserimento dell'impianto a base di ENG deve essere effettuato dal 1[^] al 5[^] giorno dell'ultimo ciclo mestruale e deve essere effettuato da un medico esperto nell' inserimento al fine di minimizzare il rischio di insorgenza di eventi indesiderati nel sito d'inserzione e la minor efficacia contraccettiva.

L'efficacia della contraccezione con l'impianto sottocutaneo è data dal continuo rilascio di ENG che a differenza dei composti contenuti nei COCs non presenta significative variazioni nel tempo date dalla somministrazione giornaliera.

Livelli sierici di ENG sopra i 90 pg/ml sono stati dimostrati sufficienti nel prevenire l'ovulazione.

Otto ore dopo l'inserzione, i livelli di ENG salgono ad una concentrazione media di 265.9 ± 80.9 pg/mL, con una massima concentrazione osservata verso il 4^a giorno di utilizzo.

Dopo un anno di utilizzo i livelli sierici di ENG diminuiscono fino ad una concentrazione media di 196 pg/mL e si abbassano ancora fino ai 3 anni di utilizzo ad una concentrazione di 156 pg/mL. I livelli sierici di ENG diventano indosabili già ad una settimana dopo la rimozione. L'ovulazione si ripresenta nella maggioranza delle donne entro le sei settimane dalla rimozione dell'impianto.

Dopo l'inserzione dell'impianto all'ENG, i livelli di estradiolo (E2) inizialmente decrescono sino ai livelli della fase follicolare precoce per poi risalire, creando di fatto una situazione di anovularietà in una situazione di normoestrogenismo endogeno.

L'efficacia contraccettiva dell'impianto a base di ENG si è dimostrata superiore a qualsiasi altro tipo di contraccettivo non definitivo.

Le controindicazioni all'inserzione dell'impianto sono le stesse degli altri tipi di terapia contraccettiva a base di progestinici, così come gli effetti indesiderati sono assimilabili a quella della stessa classe di progestinici, oltre a possibili effetti collaterali al sito di inserzione.

Blumenthal et al al termine di uno studio su 942 soggetti ha riportato come effetti indesiderati sicuramente dovuti al farmaco acne (11%), cefalea (15%) , aumento di peso (11%), tensione mammaria (12%), dolore addominale (5%) e cambiamenti dell' umore tra i quali nervosismo e depressione (10%). Tra gli eventi avversi gravi (al di sotto dell'1% di prevalenza nello studio) sono stati riportati disturbi gastrointestinali, cisti ovariche, depressione, asma, febbre e cefalea grave. L'accettabilità di questi sintomi varia da donna a donna, cosicchè gli effetti indesiderati più comuni non sempre rappresentano il motivo legato alla sospensione del trattamento.

Un'alterazione del profilo di sanguinamento vaginale è comune ed aspettato nei soggetti in trattamento con una terapia contraccettiva a base di progestinici è deve essere un punto da analizzare e sottolineare nella decisione della scelta contraccettiva nel del counseling con la paziente. Come tale non deve essere visto come effetto indesiderato in senso assoluto in quanto risente di una forte variabilità interindividuale.

I dati in letteratura riportano in maniera sostanziale un cambiamento del normale profilo di sanguinamento della paziente soprattutto nei primi 3-6 mesi di trattamento influenzando soprattutto nel primo anno di trattamento per poi ritornare a percentuali trascurabili nei periodi successivi. Esso rappresenta il 10% delle cause di interruzione al trattamento influenzando

molto sulla qualità di vita della paziente, aggravando un pre-esistente quadro anemico o interferendo con la vita di relazione e sessuale del soggetto.

D'altro canto, i contraccettivi a base di progestinici sono noti per essere efficaci nella cura di diverse cause di dolore pelvico come endometriosi, dismenorrea e dispareunia. La grande efficacia contraccettiva dell'impianto, inoltre, libera la donna dal timore di gravidanze indesiderate e dovrebbe dunque incoraggiare una più rilassante e coinvolgente esperienza sessuale. Tutti questi benefici certamente possono comportare un miglioramento della qualità di vita.

Scopo del nostro studio sperimentale è stato quello di valutare l'influenza a breve e medio termine dell'impianto contraccettivo sottocutaneo contenente 68 mg di ENG (Nexplanon® , MSD, Italy) sulla qualità di vita (QOL) e sulla funzione sessuale (*Female sexual function*, FSF) in donne giovani, fertili ed in buona salute. Abbiamo utilizzato a tale scopo questionari standardizzati e riconosciuti internazionalmente come l' SF-36(Short Form Questionary 36) e il FSFI(Female Sexual Function Index).

Inoltre abbiamo analizzato l'efficacia, la sicurezza e la tollerabilità degli effetti indesiderati dell' impianto a base di ENG che si sono presentati con maggiore frequenza durante lo studio.

Abbiamo effettuato uno studio osservazionale longitudinale su 52 donne afferenti presso la nostra Unità di Centro di Pianificazione Familiare per l'inserzione di Nexplanon per la prima volta.

I criteri di inclusione sono stati: età compresa tra i 18 e i 45 anni, body mass index (BMI) $20 < X < 22 \text{ Kg/m}^2$, vita sessuale attiva (almeno 4 rapporti vaginali nell'ultimo mese), desiderio di una contraccezione a lungo termine con Nexplanon, buona comprensione della lingua italiana.

Criteri di esclusione sono stati: evidenza di patologie annessiali, evidenza di patologie cardiovascolari, epatiche o renali, controindicazioni generiche ad una contraccezione a base di progestinici, utilizzo di contraccettivo (incluso dispositivo intrauterino) nelle precedenti 4 settimane.

Al termine della fase di screening, 46 pazienti hanno soddisfatto i criteri di inclusione e sono state reclutate nel nostro studio. All'atto del reclutamento, ciascuna paziente è stata informata sugli scopi e le modalità dello studio e, da tutte le pazienti è stato ottenuto un consenso scritto informato. Inoltre, ciascuna paziente è stata sottoposta ad anamnesi generale e ginecologica, Pap-Test, esame pelvico bi-manuale, ecografia trans vaginale, misurazione della pressione arteriosa sistolica e diastolica, calcolo dell'indice di massa corporea (BMI) e valutazione ematochimica completa.

Nexplanon® è stato inserito tra il 1^o e il 5^o giorno dall' inizio dell' ultimo ciclo mestruale.

Dopo l'impianto e a distanza di 3 e 6 mesi, alle pazienti è stato somministrato un questionario corrispondente alla versione italiana e convalidata del Short Form-36 (SF-36) sulla qualità di vita delle pazienti ed un questionario corrispondente alla versione italiana e convalidata del Female Sexual Function Index (FSFI).

Il questionario SF-36 contiene 36 domande raggruppate in 8 categorie:

- AF-attività fisica (10 domande)
- RP-limitazioni di ruolo dovute alla salute fisica (4 domande)
- RE-limitazioni di ruolo dovute allo stato emotivo (3 domande)
- BP-dolore fisico (2 domande),
- GH-percezione dello stato di salute generale (5 domande),
- VT-vitalità (4 domande),
- SF-attività sociali (2 domande),
- MH- salute mentale (5 domande)

e una singola domanda sul cambiamento nello stato di salute ().

Il questionario FSFI contiene 19 domande raggruppate in sei domini: (i) libido; (ii) eccitamento sessuale; (iii) grado di lubrificazione; (iv) raggiungimento dell' orgasmo; (v) grado di soddisfazione sessuale; (vi) esperienza di dolore durante il rapporto sessuale (dispareunia).

Tutte le domande sono state sottoposte usando un sistema a risposta a multipla. Si è assegnato un punteggio ad ognuna delle risposte, ed è stato ricavato matematicamente un valore finale di soddisfazione sessuale compreso in un range tra 2 e 36. I dati raccolti dalle analisi sono stati elaborati mediante il pacchetto software SPSS 15.0 (SPSS Inc. Chicago, IL, USA). La significatività è stata posta con $p < 0.05$.

Delle 46 pazienti arruolate 33 hanno completato lo studio. Dai questionari effettuati sulla qualità di vita, è risultato che l'impianto non sembra avere un impatto significativo sul dolore fisico. L'attività fisica (physical role functionig) e lo stato di salute generale (GH: general health status) hanno mostrato un significativo miglioramento rispetto al basale già dopo 3 mesi di follow-up con un ulteriore miglioramento a 6 mesi.

D'altro canto, la vitalità, lo stato di benessere mentale, l'attività sociale e lo status emotivo sono risultati peggiorati a 3 mesi rispetto al basale. Tutti questi aspetti della qualità di vita sono ritornati paragonabili a valori simili a quelli basali verso il 6[^] mese di utilizzo dell'impianto sottocutaneo e anzi, l'attività sociale e lo stato di benessere mentale a 6 mesi sono risultati significativamente più alti rispetto al basale e a tre mesi. Riguardo all'Indice di Funzione Sessuale Femminile (*Female Sex Function Index*, FSFI), un significativo miglioramento sulla funzione generale sessuale

delle pazienti è stato osservato già al 3° mese di follow up ($p < 0.1$), senza ulteriori incrementi significativi a 6 mesi.

D'altro canto sono insorti eventi avversi durante i primi tre mesi di trattamento: 4 pazienti (12.1%) hanno riportato aumento di peso; 2 pazienti (6.0%) vampate di calore; 6 pazienti (18%) ipomenorrea/amenorrea, 1 paziente (3%) ha riportato sanguinamento mestruale e 3 pazienti (9%) hanno riportato menorragia senza discontinuità.

Tutte le pazienti hanno riportato un miglioramento dei sintomi al follow up di 6 mesi ad eccezione per 2 pazienti, le quali hanno riportato inoltre episodi di franca menorragia che hanno provocato la rimozione dell'impianto. In definitiva per l'impianto a base di ENG abbiamo avuto un tasso di discontinuità a 6 mesi del 15,2 % ovvero di 7 soggetti su 42.

I nostri dati dimostrano che l'impianto migliora significativamente la qualità generale di vita delle donne determinando anche alcuni effetti positivi sull'attività sessuale femminile.

Il progesterone sembra avere un effetto inibitorio sulla sessualità umana: la caduta pre mestruale è associata ad un aumento del desiderio perimestruale.

Nelson et al hanno dimostrato che donne in trattamento contraccettivo con un progestinico iniettabile come il Medrossiprogesterone Acetato Depot (DMPA) riportano una perdita o riduzione della libido.

Gezginc et al ha riportato dati comparabili anche con l'impianto subdermico a base di etonogestrel.

D'altronde, in accordo con i nostri dati, Ott et al e Fortenberry et al non hanno trovato l'interesse sessuale non influenzato significativamente nelle donne che utilizzavano DMPA.

I nostri dati hanno mostrato un miglioramento tangibile con l'aumento dei punteggi dell'SFSI soprattutto nei domini riguardanti l'eccitamento, il raggiungimento dell'orgasmo e soddisfazione sessuale al follow up di 3 mesi. Questo effetto positivo è dovuto probabilmente all'effetto contraccettivo dell'impianto che potrebbe così contribuire ad avere una vita sessuale più serena, senza il rischio di gravidanze indesiderate ed una maggiore vicinanza e affinità verso il partner.

Una significativa riduzione del dolore durante il rapporto sessuale (dispareunia) è stata riportata significativamente al follow up di 6 mesi. Questo effetto è stato inoltre dimostrato durante un trattamento con i contraccettivi orali combinati (COC).

Questi dati potrebbero riflettere l'effetto positivo del trattamento continuativo con progesterone sulla dismenorre e dispareunia.

Inoltre lo stesso effetto può essere responsabile di un miglioramento delle limitazioni delle attività di ruolo dovute alla salute fisica (*PRF* del SF-36) e dello stato di salute generale (*GH* del SF-36).

Di converso abbiamo una significativa riduzione delle attività di ruolo dovute allo stato emotivo (*RE* del SF-36) e delle attività sociali (*SF* del SF-36). Queste indicazioni sono state precedentemente associate ai disturbi del sanguinamento vaginale o meglio alle modifiche dei profili di sanguinamento (*bleeding pattern* in letteratura) delle pazienti con impianto a base di ENG.

Matsumoto *et al* hanno dimostrato che in pazienti con cicli irregolari la QOL delle pazienti è stata significativamente migliorata durante il trattamento con COC, specie nella vita sociale.

Un ruolo importante nella aderenza alla terapia con l'impianto a base di ENG per tutto il periodo di trattamento triennale sembra essere profondamente legato al profilo di sanguinamento che le pazienti riportano. Infatti, il cambiamento dei profili di sanguinamento è un effetto indesiderato comune associato ad una contraccezione a base di progestinici. Di conseguenza ciò sembra essere la più frequente causa di rimozione dell'impianto progestinico.

Comunque, l'accettabilità dei profili di sanguinamento è influenzata da diversi fattori (personali, sociali e culturali) più che dai profili di sanguinamento stessi.

E' stata inoltre dimostrata una diminuzione dell'attività del ruolo sociale nella QOL delle pazienti in trattamento con COC.

Il meccanismo di questo presunto effetto negativo della contraccezione ormonale sull'attività e sulla funzione sociale della paziente non è ancora chiaro. I nostri dati, sorprendentemente, mostrano un miglioramento di questi indici dopo 6 mesi di terapia.

Recentemente, un'analisi incrociata di Williams et al ha osservato che donne sessualmente attive in età fertile che usano qualsiasi tipo di contraccezione hanno maggiori probabilità di riportare un punteggio nello stato di benessere mentale nella media o superiore al questionario SF-36 sulla QOL, rispetto a chi non fa alcun tipo di contraccezione.

Differenti sono i motivi per cui l'inizio di una terapia contraccettiva può riflettersi in maniera differente sulla QOL.

I nostri dati mostrano che all'interno della popolazione italiana sana, coloro le quali hanno scelto l'impianto a base di progestinici per una terapia contraccettiva a lungo termine non hanno mostrato nessun effetto negativo persistente sull'emotività e sulla funzione sessuale. D'altro canto si è visto un aumento significativo della QOL in generale.

Il ruolo del counseling con il clinico sulla scelta del metodo contraccettivo da adottare è fondamentale per permettere alla paziente di compiere una scelta sulla base di una adeguata informazione e quindi autodeterminazione che di conseguenza si riflette in un più lungo ed efficace uso contraccettivo.

L'effetto sulla qualità della vita e sulla funzione sessuale indotta da questa nuova forma di contraccettivo suggerisce che l'impianto a base di etonogestrel è stata la scelta migliore per donne in salute ed in età fertile che desideravano una contraccezione a lungo termine.

ORIGINAL ARTICLE

Impact of an implantable steroid contraceptive (etonogestrel-releasing implant) on quality of life and sexual function: a preliminary study

Costantino Di Carlo, Anna Sansone, Nicoletta De Rosa, Virginia Gargano, Giovanni Antonio Tommaselli, Carmine Nappi, and Giuseppe Bifulco

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

Abstract

The aim of the study was to determine the impact of etonogestrel (ENG)-implant used for contraceptive purpose on Quality of life (QoL) and on sexual function (FSF) of healthy Italian women. The Female Sexual Function Index (FSFI) questionnaire and the Short Form-36 (SF-36) validated questionnaire were administered at baseline, 3 and 6 months after insertion of Nexplanon. The implant seems to have a positive impact on QoL after the first three months of therapy. Users showed an improved general health status and physical role status. The implant did not show negative effects on libido and on sexual function. In the first three months of treatment, users experienced a temporary reduction of vitality, mental health, social functioning and emotional role functioning, which seem to disappear after six months of therapy.

Keywords

Contraception, etonogestrel-implant, quality of life, sexual function

History

Received 18 June 2013
Revised 26 June 2013
Accepted 23 September 2013
Published online 16 October 2013

Introduction

The etonogestrel (ENG)-releasing implant Nexplanon® (or Implanon NXT® in other countries; MSD, Milan, Italy) is a subdermal, progestin-only contraceptive that provides effective contraceptive protection for up to 3 years [1,2].

The single implant contains 68 mg ENG, the active metabolite of desogestrel, a progestin widely used in hormonal contraceptives [1].

The decision to use hormonal contraception and the choice of its type made by women are largely affected by their satisfaction with the different methods, which, in turn, influenced by their subjective experience and by the impact on their quality of life (QoL) as well as sexual function (FSF). Available data support an impact of contraceptive use on the psychosocial well-being of women [3,4]. Many studies on hormonal contraceptives systematically assessed how these methods affect sexual functioning or pleasure [5-9].

While many researchers have thoroughly documented the effects of hormonal contraceptive methods on ovulation [10], far fewer have demonstrated their effect on the peak in sexual interest that many women experience during ovulation or have explored how hormonal contraceptives enhance or hinder sexual enjoyment, thereby altering use patterns [11].

Moreover, there is also a paucity of data on the effects of hormonal contraception on QoL, with most reports focusing on contraceptive safety and efficacy, weight gain, bleeding irregularities, nausea and effects on mood.

Hormonal progestin-only contraceptives are known to be effective in decreasing pelvic pain caused by various disorders

such as endometriosis, menorrhagia, dysmenorrhea and dyspareunia. Moreover, they are a highly effective form of contraception, which may help eliminate the fear of pregnancy, presumably providing a more relaxed and enjoyable sexual experience. All these effects may improve quality of life. On the other hand, these contraceptives are associated with weight gain and, seldomly, with acne, hair loss and hirsutism [12,13]; it is reasonable to consider that a deterioration of appearance would disappoint self-confidence and self-esteem, thereby having negative effect on QoL and sexual function. Mood changes, including nervousness and depression, are commonly mentioned side effects of implants [14]; however, the influence of progestin-contraceptive on mood and emotional state is not fully understood. The aim of this study was to evaluate the short-term influence of Nexplanon® on QoL and sexual function using validated questionnaires.

Methods

Between November 2011 and November 2012, a total of 52 subjects were referred to the Unit of Family Planning Center of our Institution for the first Nexplanon implant.

Inclusion criteria were: age between 18 and 45 years; body mass index (BMI) $> 20 \leq 22 \text{ kg/m}^2$; active sexual life (≥ 4 vaginal intercourses in the last month); desire of long-term contraception with Nexplanon; good understanding of the Italian language.

Exclusion criteria were: evidence of adnexal pathologies; cardiovascular, hepatic or renal impairment; the same contraindications and special warnings or precautions for progestin-only contraceptive use; pregnancy, lactation or abortion in the previous 4 months; known or suspected malignant or premalignant disease; hypersensitivity to any component of the study drug; contraceptive (included intrauterine device) use in the previous 4 weeks.

Forty-six patients satisfied the inclusion criteria and were included in the study after having signed informed consent. For this observational study design a submission of Institutional

Address for correspondence: Prof. Di Carlo Costantino, MD, Department of Gynecology and Obstetrics, University of Naples "Federico II", Via S. Pansini ndeg 5, 80131 Naples, Italy. Tel/ Fax: +39 081 746 29 05. E-mail: costantino.dicarlo@unina.it

Review Board was not sought, since this was an observational study on a contraceptive device requested by the patients.

Demographic data were collected from all participants. Before inclusion in the study, medical and gynecological history was taken and all subjects underwent a gynecological examination, Pap smear, evaluation of blood pressure, calculation of the BMI and complete hematological tests. Nexplanon was inserted between the first and the fifth day from the beginning of the last menstrual cycle. Before implant, and after 3 and 6 months, patients were interviewed by two female medical doctors, who evaluated effects of Nexplanon on QoL using the Italian validated version of the Short Form-36 (SF-36) questionnaire [15] and on sexual activity using the Italian validated version of the Female Sexual Function Index (FSFI) questionnaire [16,17]. The SF-36 questionnaire contains 36 questions grouped into eight categories: physical functioning, physical role functioning, bodily pain, general health, vitality, mental health, social functioning and emotional role functioning [15]. The FSFI questionnaire contains 19 questions grouped into six domains: (i) sexual desire; (ii) sexual excitement; (iii) the need for lubrication; (iv) attainment of orgasm; (v) general sexual satisfaction; and (vi) experience of pain during sex. All questions are formatted using a multiple-choice system. A score of 0–5 is assigned to each response, and a final sexual satisfaction value is derived mathematically, with the ultimate sexual function score ranging from 2 to 36. A lower score indicates poorer sexual function. A score of 26.55 or less indicates a risk of sexual dysfunction [16,17].

Data analyses were performed using the SPSS 15.0 software package (SPSS Inc. Chicago, IL). The level of significance for all tests was set at $p < 0.05$.

Data were evaluated for distribution by Shapiro–Wilks' test and descriptive statistics reported accordingly. Friedman's two-way analysis on ranks test with *post hoc* test by Conover [18] was used to compare questionnaires scores at baseline and at follow-up visits.

Results

Forty-six new implant-users were recruited for the study. Three women refused to insert the implant after enrollment and baseline evaluation, having changed their mind, and five were excluded from the study because during 6 months of treatment the relationship with their partner finished. Five patients maintained the implant for less than 3 months. Consequently, QoL score and SF were examined in 33 patients, those who filled the final follow-up questionnaire.

Baseline demographic characteristics of the patients are reported in Table 1. The SF-36 scores before implant insertion and after 3 and 6 months are presented in Table 2. The implant did not seem to have a significant impact on physical functioning and bodily pain. Physical role functioning and general health scores showed a significant improvement at 3-month follow-up in comparison with baseline; these scores had a further significant improvement at 6-month follow-up both in comparison with baseline and with 3-month follow-up. On the other hand, vitality, mental health, social functioning and emotional role functioning were reduced at 3-month follow-up in comparison to baseline. All these domains returned to the values similar to baseline by 6 months. Social functioning and mental health was significantly higher in comparison with both baseline and 3 months values (Table 2).

Table 3 shows the changes of FSFI scores at the 3rd and 6th months of treatment with respect to baseline values. A significant improvement in general sexual function score was observed at 3-month follow-up ($p < 0.01$). FSFI scores did not significantly

improve at 6-month follow-up in comparison with 3-month follow-up. The early global positive effect indeed, was related to improvement at 3 months in arousal, orgasm, satisfaction and pain domains.

Adverse events arose during the first 3 months of treatment: 4 patients (12.1%) reported weight gain; 2 patients (6.0%) reported hot flashes; 6 (18.1%) had hypomenorrhea/amenorrhea, one (3.0%) had menstrual bleeding, and 3 (9.1%) reported menorrhagia, without discontinuation. All subjects reported relief of symptoms at the 6-month follow-up except for 2 (6.0%) patients, who reported further menorrhagia episodes.

Discussion

To our knowledge, this was the first study investigating the effects on a novel, progestin-only contraceptive implant (Nexplanon) on QoL and sexual function of healthy Italian women.

Table 1. Baseline demographic characteristics of the patients.

Age (years)	31.1 ± 7.2
BMI (kg/m ²)	23.3 ± 1.3
Duration of menses (d)	4.9 ± 2.1
Menstrual cycle length (d)	28.4 ± 2.2
Vaginal delivery (n)	0 [0–4]
Cesarean section (n)	0 [0–4]
Abortion (n)	0 [0–3]

Data are given as mean ± SD or median [range], as appropriate.

Table 2. The QoL domains (SF-36 scores) before implant insertion, after 3 and 6 months.

SF-36 Score	Baseline	3 months	6 months
PF	100 [88.78–99.10]	100 [84.13–96.48]	100 [86.73–96.30]
PRF	50 [52.99–74.29]	100 [75.62–91.65]*	100 [85.56–96.25]†,‡
BP	100 [83.88–95.76]	80 [79.62–87.78]	80 [82.49–91.44]
GH	72 [59.05–73.74]	76 [73.08–82.01]†	92 [87.13–93.84]†,§
VT	70 [62.92–71.93]	45 [36.22–49.54]†	70 [61.12–72.82]
SF	62 [57.77–71.63]	50 [42.72–58.31]	75 [77.95–83.32]†,§
ERF	100 [59.81–87.40]	33 [26.50–51.86]†	100 [51.21–81.94]†
MH	64 [61.49–74.02]	52 [36.89–51.42]†	72 [69.40–76.78]†,§

PF: physical functioning, PRF: physical role functioning, BP: bodily pain, GH: general health, VT: vitality, MH: mental health, SF: social functioning, ERF: emotional role functioning. Data are reported as median [CI, 95%].

* $p < 0.05$ versus baseline.

† $p < 0.01$ versus baseline.

‡ $p < 0.05$ versus 3-month follow-up.

§ $p < 0.01$ versus 3-month follow-up.

Table 3. The Female Sexual Function domain (FSFI scores) before implant insertion, after 3 and 6 months.

FSFI score	Baseline	3 months	6 months
Desire	4.8 [4.3–5.0]	4.8 [3.6–6.0]	4.8 [4.5–5.1]
Arousal	5.7 [4.2–5.2]	5.7 [2.7–6.0]*	5.7 [4.8–5.5]
Lubrication	5.4 [4.5–5.2]	5.1 [3.0–5.7]	5.1 [4.3–5.0]
Orgasm	5.6 [4.2–5.0]	5.6 [4.4–6.0]*	5.6 [5.2–5.6]
Satisfaction	4.8 [4.2–5.0]	5.6 [3.6–6.0]†	5.6 [4.8–5.4]†
Pain	5.6 [4.3–5.3]	5.6 [3.6–6.0]†	5.6 [4.9–5.6]
Total	27.8 [25.1–29.5]	31.6 [21.5–34.7]†	31.6 [28.4–31.5]*

Data are reported as median [CI, 95%].

* $p < 0.05$ versus baseline.

† $p < 0.01$ versus baseline.

Our data show that the implant significantly improved general QoL of women, after an early phase in which it reduced some index related to the emotional sphere, as vitality, mental health, social functioning and emotional role functioning. Moreover, our data demonstrated that the implant does not have a negative impact on female sexual function, but have some positive effects.

Mood changes, including nervousness and depression, are commonly mentioned side effects of implants [13,19], although these effects accounted for low rates of removal [19]. QoL scores for each domain were not significantly changed or even significantly improved after 6 months, suggesting that subjects were generally satisfied with the implant; therefore, they continued treatment.

Progesterone seems to have an inhibitory effect on human sexuality: the pre-menstrual progesterone fall is associated with an increase of peri-menstrual desire [20]. Nelson et al. showed that women using injectable progestin as Depot Medroxyprogesterone Acetate (DMPA) reports loss or reduction of libido [21]. Comparable data have been reported by Gezgin on the ENG-implant [22]. On the other hand, and in accordance with our data, Ott et al. [23] and Fortenberry et al. [24] found that sexual interest did not change significantly in DMPA users.

Our data showed an increase in arousal, orgasm and satisfaction domains at 3-month follow-up. This positive effect was probably due to the contraceptive effect that may ensure a more relaxed sexual life, without risk of undesired pregnancies and with a high closeness to the male partner. A significant reduction of pain during sex intercourse at 6 months of follow-up was demonstrated. This effect has also been shown during treatment with combined oral contraceptive (COC) [8]. This data may reflect the positive effect of continued progesterone treatment on dysmenorrhea and dyspareunia [25]. Moreover, the same effect may be responsible of an improvement in physical role functioning and in general health. On the other hand, social functioning and emotional role functioning was significantly reduced in first 3 months of treatment. These indexes have been previously associated with disturbance of vaginal bleeding. Matsumoto et al. have demonstrated that in patients with irregular cycle, the QoL in social relationship was significantly improved during treatment with COC [26]. The disturbance of vaginal bleeding patterns is a common adverse events associated with progestin-only contraception. Indeed, it seems to be one the most frequent reason for discontinuing progestin-implant [27–29]. However, acceptability of bleeding patterns is influenced by factors (personal, social or cultural) other than bleeding patterns themselves. A decrease in social relationship QoL score has yet been demonstrated in OC users [30]. The mechanism of the presumed negative effect of hormonal contraception on social relationship is still unclear. Our data, surprisingly, show a restoration of these indexes after 6 months of therapy. Recently, a cross-sectional analysis found that sexually active women of reproductive age who use any form of contraception have greater odds of reporting average or better mental QoL than those who use no contraception [31].

Different motivations for using contraception may result in differential impact on QoL. Our data show that in a healthy Italian population, choosing implant only for long-term contraception, there was no persistent negative effect on emotiveness and on sexual function but significant positive effects on general QoL. Counseling about the choice of contraceptive methods is known to help women make informed choices and to result in longer and more effective contraceptive use [32]. The effect on QoL and on sexual function induced by this new form of contraceptive suggests that the ENG-implant was the favorable choice in healthy women in presence of desire of long-term contraception.

Declaration of interest

All authors disclose no conflicts of interest.

References

1. Etonogestrel implant (Implanon) for contraception. *Drug Ther Bull* 2001;39:57–9.
2. Blumenthal PD, Gemzell-Danielsson K, Marintcheva-Petrova M. Tolerability and clinical safety of Implanon. *Eur J Contracept Reprod Health Care* 2008;13:29–36.
3. Rosenfield JA, Zahorik PM, Saint W, Murphy G. Women's satisfaction with birth control. *J Fam Pract* 1993;36:169–73.
4. Oddens BJ. Women's satisfaction with birth control: a population survey of physical and psychological effects of oral contraceptives, intrauterine devices, condoms, natural family planning, and sterilization among 1466 women. *Contraception* 1999;59:277–86.
5. Schaffir J. Hormonal contraception and sexual desire: a critical review. *J Sex Marital Ther* 2006;32:305–14.
6. Sanders SA, Graham CA, Bass JL, Bancroft J. A prospective study of the effects of oral contraceptives on sexuality and well-being and their relationship to discontinuation. *Contraception* 2001;64:51–8.
7. Davis AR, Castano PM. Oral contraceptives and libido in women. *Annu Rev Sex Res* 2004;15:297–320.
8. Caruso S, Agnello C, Romano M, et al. Preliminary study on the effect of four-phasic estradiol valerate and dienogest (E2V/DNG) oral contraceptive on the quality of sexual life. *J Sex Med* 2011;8: 2841–50.
9. Guida M, Di Spiezio Sardo A, Bramante S, et al. Effects of two types of hormonal contraception-oral versus intravaginal-on the sexual life of women and their partners. *Human Reprod* 2005;20: 1100–6.
10. Hatcher RA. *Contraceptive technology*. Vol. 18th rev. ed. New York: Ardent Media; 2004.
11. Anderson-Hunt M, Dennerstein LD, Hatton L, et al. Hormones and female sexuality: developing a method for research. In: Zeidenstein S, Moore K, eds. *Learning about sexuality: a practical beginning*. New York: The Population Council & The International Women's Health Coalition; 1996:260–77.
12. Brache V, Massai R, Mishell DR, et al. Ovarian function during use of Nestorone subdermal implants. *Contraception* 2000;61:199–204.
13. Sivin I. Clinical effects of Norplant subdermal implants for contraception. In: Mishell Jr DR, ed. *Long-acting steroid contraception*. New York: Raven Press; 1983:89–116.
14. Westhoff C, Truman C, Kalmuss D, et al. Depressive symptoms and Norplant contraceptive implants. *Contraception* 1998;57:241–5.
15. Ware JE, Kosinski M, Gandek BG, et al. The factor structure of the SF-36 Health Survey in 10 countries: results from the International Quality of Life Assessment (IQOLA) project. *J Clin Epidemiol* 1998;51:1159–65.
16. Wiegel M, Meston C, Rosen R. The female sexual function index (FSFI): cross-validation and development of clinical cut off scores. *J Sex Marital Ther* 2005;31:1–20.
17. Nappi RE, Albani F, Vaccaro P, et al. Use of the Italian translation of the Female Sexual Function Index (FSFI) in routine gynecological practice. *Gynecol Endocrinol* 2008;24:214–19.
18. Conover WJ. *Practical nonparametric statistics*. Wiley series in probability and mathematical statistics. New York: Wiley; 1980.
19. Brache V, Faundes A, Alvarez F, Cochon L. Non-menstrual adverse events during use of implantable contraceptives for women: data from clinical trials. *Contraception* 2002;65:63–74.
20. Graziottin A. Libido: the biologic scenario. *Maturitas* 2000;34: S9–16.
21. Nelson AL. Counseling issues and management of side effects for women using depot medroxyprogesterone acetate contraception. *J Reprod Med* 1996;41:391–400.
22. Gezgin K, Balci O, Karatayli R, Colakoglu MC. Contraceptive efficacy and side effects of Implanon. *Eur J Contracept Reprod Health Care* 2007;12:362–5.
23. Ott MA, Shew ML, Ofler S, et al. The influence of hormonal contraception on mood and sexual interest among adolescents. *Arch Sex Behav* 2008;37:605–13.
24. Fortenberry JD, Hensel DJ. The association of sexual interest and sexual behaviors among adolescent women: a daily diary perspective. *Horm Behav* 2011;59:739–44.

25. Affandi B. An integrated analysis of vaginal bleeding patterns in clinical trials of Implanon. *Contraception* 1998;58:99S-107S.
26. Matsumoto Y, Yamabe S, Ideta K, Kawabata M. Impact of use of combined oral contraceptive pill on the quality of life of Japanese women. *J Obstet Gynaecol Res* 2007;33:529-35.
27. Fan M, Sujuan G. Menstrual bleeding patterns in Chinese women using the Norplant subdermal implant. *Hum Reprod* 1996; 11:14-19.
28. Grubb GS, Moore D, Anderson NG. Pre-introductory clinical trials of Norplant implants: a comparison of seventeen countries' experience. *Contraception* 1995;52:287-96.
29. Peralta O, Diaz S, Croxatto H. Subdermal contraceptive implants. *J Steroid Biochem Mol Biol* 1995;53:223-6.
30. Li RHW, Lo SST, Teh DKG, et al. Impact of common contraceptive methods on quality of life and sexual function in Hong Kong Chinese women. *Contraception* 2004;70:474-82.
31. Williams SL, Parisi SM, Hess R, Schwarz EB. Associations between recent contraceptive use and quality of life among women. *Contraception* 2012;85:282-7.
32. Davie JE, Walling MR, Mansour DJ, et al. Impact of patient counseling on acceptance of the levonorgestrel implant contraceptive in the United Kingdom. *Clin Ther* 1996;18:150-9.

Capitolo 4. Effetti metabolici delle terapie ormonali con 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.

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.

Il Drospirenone (DRSP) (6 β ,7 β ,15 β ,16 β -dimethylene-3-oxo-17 α pregn-4-ene-21,17 carbolactone) è un progestinico di sintesi di quarta generazione che, a differenza di tutti gli altri progestinici, deriva dal 17- α -spironolattone e non dal 19-nortestosterone o dal 17- α -idrossiprogesterone.

Studi di farmacocinetica hanno dimostrato che il DRSP ha un assorbimento rapido e completo, con un picco massimo di concentrazione plasmatica un'ora dopo l'assunzione orale. Dopo circa dieci giorni di terapia si raggiunge lo *steady-state*. La biodisponibilità assoluta è del 76-85% e circa il 95-97% del principio attivo si lega alle proteine plasmatiche, in particolare all'albumina.

Il DRSP è ampiamente metabolizzato a livello epatico. I principali metaboliti nel plasma, inattivi da un punto di vista farmacologico, sono la

forma acida del DRSP, prodotta dall'apertura dell'anello lattonico, e il 4,5-diidro-drospironone-3-solfato, e sono generati senza il coinvolgimento del sistema P-450. L'emivita di eliminazione dei metaboliti con le urine o con le feci è di circa quaranta ore.

Il DRSP presenta un profilo farmacologico molto simile al progesterone naturale, e combina la propria potente attività simil-progestinica con un effetto anti-mineralcorticoide, e antiandrogenico. L'attività simil-progestinica è 3 volte superiore a quella del progesterone naturale e paragonabile a quella del ciproterone acetato e del noretisterone acetato. L'attività antiandrogenica è, in vivo, da 5 a 10 volte maggiore di quella del progesterone naturale, in quanto il DRSP manifesta una stabilità metabolica superiore, e 3 volte inferiore a quella del ciproaterone acetato. Il DRSP non mostra, in vivo o in vitro, attività antiglucoctioide o estrogenica. Una caratteristica specifica del DRSP è la sua elevata affinità per i recettori dei mineralcorticoidi (MR) ippocampali e renali nel ratto. Il legame che s'instaura è responsabile di un effetto antagonista con un'inibizione del trasporto transepiteliale del sodio aldosterone-indotto a livello del colon distale di ratto. In ratti ovariectomizzati e trattati con dieta a basso contenuto di sodio, il DRSP mostra un effetto antimineralcorticoide a lungo termine più potente dello spironolattone nell'incrementare l'escrezione di sodio in scambio con il potassio.

L'attività di 3 mg di DRSP è equivalente a quella di 25 mg di spironolattone.

Fuhrmann et al hanno inoltre dimostrato che il DRSP presenta un'alta affinità di legame per i MR anche nella specie umana.

Oelkers et al hanno dimostrato che il trattamento con 2 mg di DRSP dall'ottavo al tredicesimo giorno del ciclo mestruale in giovani donne sottoposte ad un regime dietetico povero di sodio aumenta significativamente l'escrezione urinaria di sodio rispetto al placebo. Il gruppo trattato con DRSP ha inoltre presentato a 6 mesi una significativa riduzione del peso corporeo ed un significativo aumento dell'attività plasmatica reninica e dei livelli di aldosterone urinario. Questi effetti sono da attribuire all'attività antimineralcorticoide insita nella molecola stessa.

Numerosi studi hanno inoltre valutato la composizione corporea in donne trattate con DRSP. *Fruzzetti F. et al.* hanno osservato, in donne affette da sindrome premestruale, una riduzione della ritenzione idrica già dopo tre mesi di trattamento con un contraccettivo orale contenente 3 mg di DRSP e 30 µg di etinilestradiolo. In tali pazienti, infatti, l'esame bioimpedenziometrico ha dimostrato una significativa riduzione dell'acqua corporea totale e dell'acqua extracellulare nel gruppo trattato rispetto al gruppo non trattato. Nessuna variazione significativa è stata riscontrata

nei livelli di acqua intracellulare, a dimostrazione dell'assenza di effetti del farmaco sul sistema omeostatico cellulare.

Risultati contrastanti sono invece stati riportati da *Bonassi Machado R et al.* che hanno valutato 3 gruppi di donne trattate rispettivamente con 30 µg di etinilestradiolo associato a 3 mg di DRSP, 15µg di etinilestradiolo associato a 60 µg di gestodene e placebo. Dopo 6 e 12 mesi di trattamento non sono state registrate significative variazioni nel contenuto di acqua corporea, di massa grassa e massa magra nell'ambito di uno stesso gruppo, né significative differenze tra i gruppi valutati. Possibili interferenze nella determinazione di tali risultati possono essere state determinate dal lungo intervallo di tempo tra due osservazioni successive, periodo durante il quale fattori esterni quali variazioni del regime dietetico o dell'attività fisica possono aver influito sui dati ottenuti.

L'attività antimineralcorticoide del DRSP è stata inoltre correlata a possibili effetti sulla pressione arteriosa (PA). Diversi studi, infatti, hanno dimostrato una riduzione significativa dei livelli della pressione nelle pazienti trattate con DRSP. In particolare, *Oelkers et al.* hanno valutato tale parametro in due gruppi di donne, il primo trattato con 3 mg di DRSP associato a diverse dosi di etinilestradiolo (15, 20 e 30 µg), il secondo trattato con 150 µg di levonogestrel associato a 30 µg di etinilestradiolo, per sei mesi. Dopo sei mesi di trattamento, nelle pazienti trattate con

DRSP, si è osservata una riduzione significativa del peso corporeo ed un significativo decremento dei livelli di pressione diastolica .

Yildizahn R. et al. hanno confrontato i livelli pressori in due gruppi di pazienti trattate con un contraccettivo orale contenente etinilestradiolo associato rispettivamente a DRSP o gestodene. A sei e a dodici mesi, la differenza nei livelli pressori tra i due gruppi non è risultata significativa. Tuttavia, nel gruppo trattato con l'associazione etinilestradiolo/DRSP, si sono osservati dopo un anno livelli di pressione arteriosa significativamente inferiori rispetto a quelli basali.

In merito all'utilizzo del DRSP nella terapia ormonale sostitutiva (TOS), l'efficacia e la sicurezza del trattamento combinato 17 β estradiolo (E_2)/DRSP sulla sintomatologia climaterica sono state ampiamente studiate. I dati in letteratura riportano infatti una significativa riduzione dell'incidenza e della severità della sintomatologia vasomotoria già a partire dalle prime 2-5 settimane di terapia, con tassi di amenorrea dell'85-90% già durante il primo anno di trattamento in schema combinato-continuo. L'efficacia del DRSP nel prevenire l'iperplasia endometriale indotta dal trattamento con estrogeni è stata valutata in uno studio randomizzato a dosi crescenti di DRSP. La terapia con 2 mg di DRSP e 1 mg di 17 β estradiolo è stata associata ad un rischio di sviluppare iperplasia endometriale dello 0.7% rispetto al 4.6% riportato nelle pazienti

in terapia con soli estrogeni; la terapia con 0.5, 1 e 3 mg di DRSP, non è stata invece associata allo sviluppo d'iperplasia.

Il DRSP manifesta i suoi effetti benefici sulla pressione arteriosa anche quando utilizzato in TOS. White et al hanno infatti valutato l'effetto di 3 mg di DRSP associato a 1 mg di 17β estradiolo in uno studio randomizzato, placebo-controllato, in doppio-cieco in pazienti in postmenopausa con ipertensione al primo stadio (p.s. 140-159 mmHg, p.d. 90-99 mmHg). La PA si è ridotta significativamente dopo dodici settimane di terapia. Un effetto analogo è stato dimostrato anche con terapie a più basso dosaggio (2 mg), mentre terapie con 1 mg di DRSP non sembrano avere effetti sui livelli di PA.

Archer et al hanno inoltre dimostrato una riduzione significativa dei livelli di colesterolo totale, LDL e trigliceridi, in pazienti trattate con 3 mg di DRSP in associato a 1 mg di 17β E₂. Un'azione più blanda è stata dimostrata per le HDL e la lipoproteina a. Questa terapia è stata anche associata a una riduzione del peso corporeo dal 13° ciclo di trattamento o comunque al mantenimento dello stesso.

Studi recenti 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 è considerato un organo endocrino metabolicamente attivo che, in risposta a stimoli extra-cellulari specifici o a cambiamenti delle condizioni metaboliche, secerne 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.

Recentemente il nostro gruppo ha effettuato uno studio per valutare l'impatto di una terapia sostitutiva e di una terapia contraccettiva contenenti DRSP o altri progestinici sui livelli sierici di adiponectina (AdipoQ) e leptina (LEP) rispettivamente in donne in postmenopausa e in perimenopausa.

Abbiamo reclutato 45 donne in postmenopausa e 45 in perimenopausa, randomizzate rispettivamente nei seguenti gruppi di trattamento: 2 mg drospirenone + 1 mg 17 β -estradiolo (DRSP/E₂, n= 15), 0.5 mg di noretisterone acetato + 1 mg 17 β -estradiolo (NETA/E₂, n=15), nessun trattamento (controlli, n= 15); 0.020 mg etinilestradiolo + 3 mg drospirenone (DRSP/ EE, n=15), 0.020 mg etinilestradiolo + 0.15 mg desogestrel (DSG/EE, n=15), nessun trattamento (controlli, n= 15).

In tutte le pazienti abbiamo valutato i livelli di adiponectina e leptina al basale e dopo 6 cicli di trattamento.

A 6 mesi non abbiamo riscontrato variazioni statisticamente significative nei livelli di leptina rispetto al basale in nessun gruppo. I livelli di adiponectina sono risultati significativamente ridotti rispetto al basale nel gruppo trattato con NETA/E₂ e significativamente incrementati rispetto al basale nel gruppo trattato con DRSP/EE. Negli altri gruppi non abbiamo osservato variazioni significative dei livelli di adiponectina a sei mesi.

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 17 β 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, sia per un effetto antiipertensivo, sia per l'incremento dei livelli di adiponectina, adipochina con note proprietà antiinfiammatorie, antiaterogene ed insulinosensibilizzanti.

EFFECTS OF DROSPIRENONE ON PLASMA LEPTIN AND ADIPONECTIN LEVELS IN POSTMENOPAUSAL WOMEN TREATED WITH HORMONAL REPLACEMENT THERAPY AND IN PERIMENOPAUSAL WOMEN REQUESTING CONTRACEPTION

Di Carlo Costantino (JT), Virginia Gargano, Annamaria Fabozzi, Nicoletta De Rosa Rottina Santoro, Giulia Massaro and Carmine Nappi
University of Naples

Background: Hormonal components of oral contraceptives (COCs) and hormonal replacement therapy (HRT), estrogens and progestogens, are known to exert various actions on different metabolic pathways, including lipidic metabolism and, therefore, they may influence cardiovascular risk. Drospirenone (DRSP) is a novel progestin similar to natural progesterone, combining potent progestogenic and antiandrogenic activities with antimineralocorticoid actions, that could influence adipo-vascular axis activity, regulating adiponectin and leptin expression. **Objective:** This study was conducted to evaluate the impact of HRT and COCs containing different progestogens on adiponectin and leptin serum levels, in postmenopausal women using HRT and in perimenopausal women requesting contraceptive therapy. **Setting:** Menopause Clinic of Department of Gynecology and Obstetrics, and Pathophysiology of Human Reproduction, University of Naples "Federico II". **Materials and Methods:** In this longitudinal randomized study we evaluated at basal and after 6 months of hormonal therapy adiponectin and leptin serum levels in 45 postmenopausal and in 45 perimenopausal healthy women, respectively randomized in 3 groups, as follows: 2 mg drospirenone + 1 mg 17 β -oestradiol (DRSP/E2, n=15) or 0.5 mg norethisterone acetate + 1 mg 17 β -oestradiol (NETA/E2, n=15), or no treatment (controls, n=15); 0.020 mg ethinylestradiol + 3 mg desogestrel (DRSP/EE, n=15), 0.020 mg ethinylestradiol + 0.15 mg desogestrel (DSG/EE, n=15), or no treatment (controls, n=15). **Results:** No significant difference in leptin levels was detected after 6 months in any group. Adiponectin levels were significantly reduced in NETA/E2 group and increased in DRSP/EE group, while remained unmodified in all the other groups. **Conclusion:** HRT with NETA, but not with DRSP, decreases adiponectin. COCs containing DRSP increases adiponectin level. These results may be due to the antimineralocorticoid properties of drospirenone and may lead to a better cardiovascular profile by increasing serum levels of adiponectin, an anti-inflammatory adipokine with anti-atherogenic and insulin-sensitizing activities.

Bibliografia

1. Nappi C., Gargano V. Ciclo Mestruale: fisiologia ed alterazioni. In Volume Ostetricia e Ginecologia. 2012. Ed Minerva Medica.
2. Eriksen EF, Colvard DS, Berg NJ, Graham ML, Mann KG, Spelsberg TC, Riggs BL. Evidence of estrogen receptors in normal human osteoblast-like cells. 1988 ; Science 241:84–86
3. Komm BS, Terpening CM, Benz DJ, Graeme KA, O'Malley BW, Haussler MR. Estrogen binding receptor mRNA, and biologic response in osteoblast-like osteosarcoma cells. 1988; Science 241:81–84
4. Oursler MJ, Osdoby P, Pyfferoen J, Riggs BL, Spelsberg TC. Avian osteoclasts as estrogen target cells. 1991; Proc Natl Acad Sci USA 88:6613–66
5. Oursler MJ, Pederson L, Fitzpatrick L, Riggs BL. Human giant cell tumors of the bone (osteoclastomas) are estrogen target cells. 1994 ; Proc Natl Acad Sci USA 91:5227–5231
6. Braidman I, Baris C, Wood L, Selby P, Adams J, Freemont A, Hoyland J. Preliminary evidence for impaired estrogen receptor- α protein expression in osteoblasts and osteocytes from men with idiopathic osteoporosis. 2000; Bone26:423–427
7. Tomkinson A, Gevers EF, Wit JM, Reeve J, Noble BS. The role of estrogen in the control of rat osteocyte apoptosis. 1998; J Bone Miner Res 13:1243–1250
8. Kuiper GG, Enmark E, Peltö-Huikko M, Nilsson S, Gustafsson JA. Cloning of a novel estrogen receptor expressed in rat prostate and ovary. 1996; Proc Natl Acad Sci USA 93:5925–5930
9. Parfitt AM. Osteonal and hemi-osteonal remodeling: the spatial and temporal framework for signal traffic in adult human bone. 1994; J Cell Biochem 55:273–286
10. Roodman GD. Advances in bone biology: the osteoclast. 1996; Endocr Rev 17:308–332
11. Boskey AL. Biomineralization: conflicts, challenges, and opportunities. 1998; J Cell Biochem Suppl 30–31:83–91
12. Genant HK, Cann CE, Ettinger B, Gordan GS. Quantitative computed tomography of vertebral spongiosa: a sensitive method for detecting early bone loss after oophorectomy. 1982; Ann Intern Med 97:699–705
13. Recker R, Lappe J, Davies K, Heaney R. Characterization of perimenopausal bone loss: a prospective study. 2000; J Bone Miner Res 15:1965–1973

14. Guthrie JR, Ebeling PR, Hopper JL, Barrett-Connor E, Dennerstein L, Dudley EC, Burger HG, Wark JD. A prospective study of bone loss in menopausal Australian-born women. 1998; *Osteoporos Int* 8:282–290
15. Grey A, Mitnick MA, Masiukiewicz U, Sun BH, Rudikoff S, Jilka RL, Manolagas SC, Insogna K. A role of interleukin-6 in parathyroid hormone-induced bone resorption in vivo. 1999; *Endocrinology* 140:4683–4690
16. Sunyer T, Lewis J, Collin-Osdoby P, Osdoby P. Estrogen's bone-protective effects may involve differential IL-1 receptor regulation in human osteoclast-like cells. 1999 ; *J Clin Invest* 103:1409–1418
17. Srivastava S, Weitzmann MN, Cenci S, Ross FP, Adler S, Pacifici R. Estrogen decreases TNF gene expression by blocking JNK activity and the resulting production of c-Jun and JunD. 1999 ; *J Clin Invest* 104:503–513
18. Srivastava S, Neale WM, Kimble RB, Rizzo M, Zahner M, Milbrandt J, Patrick RF, Pacifici R. 1998 Estrogen blocks M-CSF gene expression and osteoclast formation by regulating phosphorylation of egr-1 and its interaction with Sp-1. *J Clin Invest* 102:1850–1859
19. Pacifici R. Estrogen, cytokines, and pathogenesis of postmenopausal osteoporosis. 1996; *J Bone Miner Res* 11:1043–1051
20. Garnero P, Sornay-Rendu E, Chapuy M, Delmas PD. Increased bone turnover in late postmenopausal women is a major determinant of osteoporosis. 1996; *J Bone Miner Res* 11:337–349
21. Parfitt AM, Mundy GR, Roodman GD, Hughes DE, Boyce BF. A new model for the regulation of bone resorption, with particular reference to the effects of bisphosphonates. 1996; *J Bone Miner Res* 11:150–159
22. Eriksen EF, Langdahl B, Vesterby A, Rungby J, Kassem M. Hormone replacement therapy prevents osteoclastic hyperactivity: a histomorphometric study in early postmenopausal women. 1999; *J Bone Miner Res* 14:1217–1221
23. Manolagas SC, Weinstein RS, Bellido T, Bodenner DL. Opposite effects of estrogen on the life span of osteoblasts/osteocytes vs. osteoclasts in vivo and in vitro: an explanation of the imbalance between formation and resorption in estrogen deficiency. 1999 ; *J Bone Miner Res* 14:S169
24. Martins S.L, Curtis K. M., Glasier A. F. Combined hormonal contraception and bone health: a systematic review *Contraception* 2006: 73; 445– 469
25. Lopez LM, Grimes DA, Schulz KF, Curtis KM Steroidal contraceptives: effect on bone fractures in women. *Cochrane Database Syst Rev* 2009: 15(2)

26. Paoletti AM, Orru M, Floris S, Mannias M, Vacca AMB, Ajossa S, et al. Evidence that treatment with monophasic oral contraceptive formulations containing ethinylestradiol plus gestodene reduces bone resorption in young women. *Contraception* 2000;61; 259–63.
27. Nappi C, Di Spiezio Sardo A, Acunzo G, et al. 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;355–9.
28. 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.
29. 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;10–5.
30. Endrikat J, Mih E, Dusterberg B, Land K, Gerlinger C, Schmidt W, et al. A 3-year double-blind, randomized, controlled study on the influence of two oral contraceptives containing either 20 µg or 30 µg ethinylestradiol in combination with levonorgestrel on bone mineral density. *Contraception* 2004;69;179–87.
31. Polatti F, Perotti F, Filippa N, Gallina D, Nappi RE. Bone mass and long-term monophasic oral contraceptive treatment in young women. *Contraception* 1995;51;221–4.
32. Register TC, Jayo MJ, Jerome CP. Oral contraceptive treatment inhibits the normal acquisition of bone mineral in skeletally immature young adult female monkeys. *Osteoporos Int* 1997;7;348–53.
33. Cromer BA Bone mineral density in adolescent and young adult women on injectable or oral contraception. *Curr Opin Obstet Gynecol* 2003;15;353–357.
34. Lloyd T, Taylor DS, Lin MH, Matthews AE, Eggl DF and Legro RS. Oral contraceptive use by teenage women does not affect peak bone mass: a longitudinal study. *Fertil Steril* 2000;74;734–738.
35. Lattakova M, Borovsky M, Payer J, Killinger Z. Oral contraception usage in relation to bone mineral density and bone turnover in adolescent girls. *Eur J Contracept Reprod Health Care.* 2009;14;207-14.
36. Agostino H, Di Meglio GJ Low-dose oral contraceptives in adolescents: how low can you go? *Pediatr Adolesc Gynecol.* 2010;23;195-201.

37. Cromer B.A., Blair J.M., Mahan J.D. A prospective comparison of bone density in adolescent girls receiving depot medroxyprogesterone acetate (Depo-Provera), levonorgestrel (Norplant), or oral contraceptives, *J Pediatr*. 1996;129; 671–676.
38. Lara-Torre E, Edwards CP, Perlman S, Hertweck SP. Bone mineral density in adolescent females using depot medroxyprogesterone acetate. *J Pediatr Adolesc Gynecol*. 2004; 17;17-21.
39. Beksinska ME, Kleinschmidt I, Smit JA, Farley TM. Bone mineral density in adolescents using norethisterone enanthate, depot-medroxyprogesterone acetate or combined oral contraceptives for contraception. *Contraception*. 2007;75;438-43.
40. Cromer B.A., Stager M., Bonny A. Depot medroxyprogesterone acetate, oral contraceptives and bone mineral density in a cohort of adolescent girls, *J Adolesc Health* 2004; 35;434–441
41. Rome E., Ziegler J., Secic M. Bone biochemical markers in adolescent girls using either depot medroxyprogesterone acetate or an oral contraceptive, *J Pediatr Adolesc Gynecol* 2004;17; 373–377.
42. Cromer B.A., Bonny A.E., Stager M. Bone mineral density in adolescent females using injectable or oral contraceptives: a 24-month prospective study, *Fertil Steril* 2008; 90; 2060–2067
43. Beksinska ME, Kleinschmidt I, Smit JA, Farley TM, Rees HV. Bone mineral density in young women aged 19-24 after 4-5 years of exclusive and mixed use of hormonal contraception. *Contraception* 2009;80;128-32
44. Scholes D, Ichikawa L, LaCroix AZ, Spangler L, Beasley JM, Reed S, Ott SM. Oral contraceptive use and bone density in adolescent and young adult women. *Contraception* 2010;81;35-40.
45. Gambacciani M, Ciaponi M, Cappagli B, Benussi C, Genazzani AR. Longitudinal evaluation of perimenopausal femoral bone loss: effects of a low-dose oral contraceptive preparation on bone mineral density and metabolism. *Osteoporos Int* 2000;11;544–8.
46. Gambacciani M, Cappagli B, Ciaponi M, Benussi C, Genazzani AR. Hormone replacement therapy in perimenopause: effect of a low dose oral contraceptive preparation on bone quantitative ultrasound characteristics. *Menopause* 1999;6;43–8.
47. Gambacciani M, Spinetti A, Taponeco F, Cappagli B, Piaggese L, Fioretti P. Longitudinal evaluation of perimenopausal vertebral bone loss: effects of a low-dose oral contraceptive preparation on bone mineral density and metabolism. *Obstet Gynecol* 1994;83;392– 6.

48. Gambacciani M, Spinetti A, Cappagli B, et al. Hormone replacement therapy in perimenopausal women with a low dose oral contraceptive preparation: effects on bone mineral density and metabolism. *Maturitas* 1994;19;125– 31.
49. Albertazzi P, Bottazzi M, Steel SA. Bone mineral density and depot medroxyprogesteroneacetate. *Contraception* 2006;73;577–83
50. Clark MK, Sowers MR, Nichols S, Levy B. Bone mineral density changes over two years in first-time users of depot medroxyprogesterone acetate. *Fertil Steril* 2004;82;1580–6.
51. Curtis KM, Martins SL. Progestogen-only contraception and bone density: a systematic review. *Contraception* 2006;73;470–87.
52. Cundy T, Cornish J, Roberts H, Elder H, Reid IR. Spinal bone density in women using depot medroxyprogesterone contraception. *Obstet Gynecol* 1998; 92;569–573
53. Cundy T, Evans M, Roberts H, Wattie D, Ames R, Reid IR. Bone density in women receiving depot medroxyprogesterone acetate for contraception. *BMJ*. 1991;303;13-6.
54. Kaunitz AM, Miller PD, Rice VM, Ross D, McClung MR. Bone mineral density in women aged 25–35 years receiving depot medroxyprogesterone acetate: recovery following discontinuation. *Contraception* 2006;74;90–9
55. Scholes D, LaCroix AZ, Ott SM, Ichikawa LE, Barlow WE. Bone mineral density in women using depot medroxyprogesterone acetate for contraception. *Obstet Gynecol*. 1999;93;233–8.
56. Harel Z, Johnson CC, Gold MA, Cromer B, Peterson E, Burkman R, Stager M, Brown R, Bruner A, Coupey S, Hertweck P, Bone H, Wolter K, Nelson A, Marshall S, Bachrach LK. Recovery of bone mineral density in adolescents following the use of depot medroxyprogesterone acetate contraceptive injections. *Contraception* 2010;81;281-91.
57. Cundy T, Cornish J, Evans MC, Roberts H, Reid IR. Recovery of bone density in women who stop using medroxyprogesterone acetate. *BMJ* 1994;308;247–8.
58. 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;209-14.
59. Massai R, Mäkäräinen L, Kuukankorpi A, Klipping C, Duijkers I, Dieben T. The combined contraceptive vaginal ring and bone mineral density in healthy pre-menopausal women. *Hum Reprod*. 2005;20;2764-8.

60. Harel Z, Riggs S, Vaz R, Flanagan P, Harel D, Machan JTJ *Pediatr Adolesc Gynecol*. Bone accretion in adolescents using the combined estrogen and progestin transdermal contraceptive method Ortho Evra: a pilot study. 2010;23(1); 23-31.
61. Alsina JC. After 50 years of ethinylestradiol, another oestrogen in combined oral contraceptives. *Eur J Contracept Reprod Health Care* 2010; 15:1–3.
62. Sitruk-Ware R. Pharmacological profile of progestins. *Maturitas* 2008; 61:151-7.
63. Sitruk-Ware R, Nath A. The use of newer progestins for contraception. *Contraception* 2010; 82:410–17.
64. Guida M, Bifulco G, Di Spiezio Sardo A, et al. Review of the safety, efficacy and patient acceptability of the combined dienogest/estradiol valerate contraceptive pill. *Int J Womens Health* 2010; 2:279-90.
65. Robin SP. Biochemical markers of bone metabolism. *CPD Bulletin Clin Biochem* 1999; 1:116–121.
66. Delmas PD. Biochemical markers of bone turnover for the clinical assessment of metabolic bone disease. *Endocrinol Metab Clin North Am* 1990;19:1–18.
67. The Endocrine Society's Clinical Guidelines. Evaluation & Treatment of Hirsutism in Premenopausal Women: an Endocrine Society Clinical Practice Guideline. *J Clin Endocr Metab* 2008;93: 1105-20.
68. Murphy AA, Cropp CS, Smith BS, et al. Effect of low-dose oral contraceptive on gonadotropins, androgens, and sex hormone binding globulin in non-hirsute women. *Fertil Steril* 1990;53:35–9.
69. van der Vange N, Blankenstein MA, Kloosterboer HJ, et al. Effects of seven low-dose combined oral contraceptives on sex hormone binding globulin, corticosteroid binding globulin, total and free testosterone. *Contraception* 1990;41:345–52.
70. 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.

71. Azziz R, Gay F. The treatment of hyperandrogenism with oral contraceptives. *Semin Reprod Endocrinol* 1989;7:246–54.
72. 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.
73. Azziz R. The evaluation and management of hirsutism. *Obstet Gynecol* 2003;101:995–1007.
74. Palombo-Kinne E, Schellschmidt I, Schumacher U, Graßer T. Efficacy of a combined oral contraceptive containing 0.030 mg ethinylestradiol/2mg dienogest for the treatment of papulopustular acne in comparison with placebo and 0.035 mg ethinylestradiol/2 mg cyproterone acetate. *Contraception* 2009;79:282–99.
75. 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;69:2–15.
76. Caruso S, Agnello C, Romano M, et al. Preliminary study on the effect of four-phasic estradiol valerate and dienogest (E2V/DNG) oral contraceptive on the quality of sexual life. *J Sex Med* 2011;8: 2841–50.
77. de Lignières B. Oral micronized progesterone. *Clin Ther* 1999; 21:41-60
78. Wiegratz I, Kuhl H. Progestogen therapies: differences in clinical effects? *Trends Endocrinol Metab* 2004; 15:277-85
79. 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; 273:199-208
80. Fournier A, Berrino F, Riboli E, Avenel V, Clavel-Chapelon F. Breast cancer risk in relation to different types of hormone replacement therapy in the E3N-EPIC cohort. *Int J Cancer* 2005; 114:448-54

81. Di Carlo C, Sammartino A, Di Spiezio Sardo A, Tommaselli GA, Guida M, Mandato VD, D'Elia A, Nappi C. Bleeding patterns during continuous estradiol with different sequential progestogens therapy. *Menopause* 2005; 12:520-5
82. Blumenthal PD, Gemzell-Danielsson K, Marintcheva-Petrova M. Tolerability and clinical safety of Implanon. *Eur J Contracept Reprod Health Care* 2008;13:29–36.
83. Brache V, Massai R, Mishell DR, et al. Ovarian function during use of Nestorone subdermal implants. *Contraception* 2000;61:199–204.
84. Sivin I. Clinical effects of Norplant subdermal implants for contraception. In: Mishell Jr DR, ed. *Long-acting steroid contraception*. New York: Raven Press; 1983:89–116.
85. Westhoff C, Truman C, Kalmuss D, et al. Depressive symptoms and Norplant contraceptive implants. *Contraception* 1998;57:241–5.
86. Ware JE, Kosinski M, Gandek BG, et al. The factor structure of the SF-36 Health Survey in 10 countries: results from the International Quality of Life Assessment (IQOLA) project. *J Clin Epidemiol* 1998;51:1159–65.
87. Wiegel M, Meston C, Rosen R. The female sexual function index (FSFI): cross-validation and development of clinical cut off scores. *J Sex Marital Ther* 2005;31:1–20.
88. Nappi RE, Albani F, Vaccaro P, et al. Use of the Italian translation of the Female Sexual Function Index (FSFI) in routine gynecological practice. *Gynecol Endocrinol* 2008;24:214–19.
89. Davie JE, Walling MR, Mansour DJ, et al. Impact of patient counseling on acceptance of the levonorgestrel implant contraceptive in the United Kingdom. *Clin Ther* 1996;18:150–9.
90. Oelkers W, Berger V, Bolik A, et al. Drospirenone, a new progestogen with antiminerocorticoid activity: effects on ovulation, electrolyte excretion, and

the renin-aldosterone system in normal women. *J Clin Endocrinol Metab.* 1991 Oct; 73(4): 837-42.

91. Oelkers WK. Effects of estrogens and progestogens on the rennin-aldosterone system and blood pressure. *Steroids* 1996; 61: 166-171
92. 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
93. Oelkers W, Foidart JM, Dombrovicz N, et al. Effect of a new oral contraceptive containing an antimineralocorticoid progestogen, drospirenone, on the rennin-aldosterone system, body weight, blood pressure, glucose tolerance, and lipidic metabolism. *J Clin Endocrinol Metab* 1995; 80: 1816-21.
94. White WB. Drospirenone with 17beta-estradiol in the postmenopausal woman with hypertension. *Climacteric* 2007; 10 (Suppl. 1): 25–31.
95. 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.