



UNIVERSITÀ DI GENOVA

**SCUOLA DI SCIENZE MEDICHE E FARMACEUTICHE
CORSO DI LAUREA MAGISTRALE IN MEDICINA E CHIRURGIA**

Tesi sperimentale di laurea

Efficacia e tollerabilità di due terapie sostitutive per amenorrea
primaria conseguente a trattamento antitumorale in età pediatrica:
studio clinico randomizzato

Relatrice:

Prof.ssa Natascia Di Iorgi

Correlatrice:

Dott.ssa Daniela Fava

Candidata:

Benedetta Novello

Anno Accademico: 2022/2023

SOMMARIO

ABSTRACT	5
INTRODUZIONE	6
1. FISIOLOGIA DELLA PUBERTÀ E DEGLI ORMONI SESSUALI	7
2. L'IPOGONADISMO	7
3. TERAPIA ORMONALE SOSTITUTIVA	10
3.1 FORMULAZIONE ORALE	11
3.2 FORMULAZIONE TRANSDERMICA	12
4. EFFETTI DELL'HRT SUI VARI APPARATI: CONFRONTO FRA TERAPIA ORALE E TRANSDERMICA	14
4.1 LIVELLI ORMONALI SIERICI E AVVIO PUBERALE	17
4.2 FEMMINILIZZAZIONE	18
4.3 DENSITÀ MINERALE OSSEA	19
4.4 CRESCITA	20
4.5 RISCHIO CARDIOVASCOLARE	21
4.6 COAGULAZIONE E RISCHIO DI TROMBOSI VENOSA PROFONDA (VTE)	24
4.7 EFFETTI SUL METABOLISMO LIPIDICO E GLUCIDICO	28
4.8 RISCHIO NEOPLASTICO	29
STUDIO	31
1. RAZIONALE	31
2. DEFINIZIONI E DIAGNOSI	31
3. OBIETTIVI	34
4. MATERIALI E METODI	35
4.1 DISEGNO DELLO STUDIO	35
4.2 CRITERI DI ELEGGIBILITÀ	35
4.3 VALUTAZIONE DELLA RISPOSTA	36
4.4 PROGRAMMA TERAPEUTICO	38
4.5 MONITORAGGIO E SOSPENSIONE TERAPIA	39
4.6 ANALISI STATISTICA	43
5. RISULTATI	46

5.1	<i>POPOLAZIONE IN STUDIO</i>	<u>46</u>
5.2	<i>OBIETTIVO PRIMARIO: GUADAGNO STATURALE NEI PRIMI 24 MESI DI TERAPIA</i>	
	<i>ERT</i>	<u>50</u>
5.3	<i>OBIETTIVI SECONDARI</i>	<u>55</u>
6.	<i>DISCUSSIONE</i>	<u>66</u>
	<i>PUNTI DI FORZA</i>	<u>71</u>
	<i>LIMITAZIONI</i>	<u>71</u>
7.	<i>CONCLUSIONI</i>	<u>72</u>
	BIBLIOGRAFIA	74

ABSTRACT

La terapia sostitutiva estrogenica (ERT) in adolescenti con ipogonadismo è mutuata da studi condotti in donne adulte. L'obiettivo primario dello studio è confrontare l'impatto sull'altezza di due formulazioni ERT (orale-OS vs transdermica-TD) in adolescenti ipogonadiche sopravvissute a tumore pediatrico; secondariamente, valutare differenze d'effetto su estrogenizzazione clinico/ecografica e parametri metabolici.

Metodi: 38 pazienti con pregresso tumore (SNC n=24; non-SNC n=14) e amenorrea primaria sono state trattate con OS (n=12) o TD (n=26) a dosi lentamente progressive dall'età di 13,4 (IQR12.7-14,4) anni; n=13 sono state randomizzate a OS (n=8) o a TD (n=5) mentre n=25 sono state trattate con analoghi schemi fuori randomizzazione - controlli-(n=4 OS, n=21 TD). Un difetto di ormone della crescita (GHD) era presente in 20 soggetti. Le pazienti sono state valutate ogni 6 mesi per 4 anni (T0-T48) per statura, profilo gluco-lipidico, IGF1, ecografia pelvica e età scheletrica-ES (RX carpo/annuale).

Risultati: Non rilevando differenze tra gruppo randomizzato/controllo, le pazienti sono state combinate. Un guadagno >7,5 cm a T24 era associato a TD(p=0.03); il guadagno cumulativo era a T48 di 12,2 cm (8,2-15,4) vs 6,6 (3,5-8,8) nelle TD vs OS(p=0,0018). L'ES è progredita più gradualmente in corso di TD rispetto a OS (plateau a T18); un andamento analogo era osservato per lo sviluppo uterino e mammario. Soggetti con GHD in ERT-OS crescevano meno di soggetti in ERT-TD (p=0,006). In corso di TD si sono osservati da T6 livelli inferiori rispetto a OS di colesterolo totale (T36, p=0,04), HDL e TG (T12-T48 p's tra 0,0002-0,07) e superiori di IGF1-SDS (T 24 p=0,002), soprattutto in pazienti con GHD.

Conclusioni: In adolescenti con ipogonadismo secondario a trattamento oncologico la ERT-TD favorisce una graduale stimolazione scheletrica e un guadagno staturale doppio rispetto alla ERT-OS; garantisce, inoltre, un profilo metabolico migliore, in particolare in soggetti con GHD.

INTRODUZIONE

Negli ultimi anni le probabilità di guarigione dei tumori pediatrici sono andate migliorando grazie all'utilizzo sempre più sofisticato di trattamenti antitumorali (chirurgia, radioterapia, o chemioterapia) somministrati in maniera combinata o isolata. È noto, peraltro, che tali trattamenti possono determinare effetti collaterali sia a breve che a lungo termine che possono influenzare in maniera importante la qualità di vita dei soggetti trattati per tumore. Le endocrinopatie rappresentano sicuramente una parte rilevante di tutte le patologie osservate nel corso del follow-up di questi pazienti, comprendendo in particolar modo alterazioni dell'asse ipotalamo-ipofisi ma anche della funzione tiroidea, surrenale, gonadica e del normale processo di crescita e sviluppo. Nelle adolescenti e nelle giovani donne con una storia di neoplasia e di terapia antitumorale è quindi frequente il riscontro di amenorrea, la quale può conseguire ad azione della radioterapia sulle gonadi con un meccanismo di danno diretto, ad irradiazione cranica con conseguente danno centrale, a danno indiretto da chemioterapico oppure ad infiltrazione neoplastica. Si rende quindi necessario, nelle pazienti di questo tipo, un inquadramento diagnostico e un intervento terapeutico di tipo sostitutivo.

La formula ottimale di terapia sostitutiva ormonale nelle giovani donne affette da ipogonadismo centrale o ovarico è tuttavia dibattuta. Anche se la formula orale è quella maggiormente prescritta, non vi sono allo stato attuale delle conoscenze raccomandazioni o linee guida orientative al riguardo di quali farmaci, vie di somministrazione e schemi terapeutici utilizzare.

Un'indagine effettuata tra i partecipanti al 39° meeting della *Società Europea di Endocrinologia Pediatrica* (ESPE) nel 2002¹ ha mostrato una disomogeneità di comportamenti terapeutici in rapporto all'età considerata ideale per l'inizio del trattamento (40,4 % a 11 anni, 47,8 % a 13 anni, il 7,5% a 15 anni) e alla scelta terapeutica effettuata nella pratica clinica con il 31,9% a favore del 17 β estradiolo orale, il 10% per via transdermica, il 12,2 % degli estrogeni coniugati (Premarin), il 4,8 % dell'estrogeno valerato e il 39,9% dell'etinil estradiolo orale.

Mancano quindi studi prospettici relativi alla terapia sostitutiva in giovani donne, in particolare in soggetti affetti da ipogonadismo secondario a trattamento radio-chemioterapico oncologico. La scelta terapeutica per questa tipologia di pazienti allo stato attuale si basa su dati estrapolati da studi prevalentemente effettuati in donne adulte o in

menopausa, che hanno caratteristiche fisiologiche diverse e per le quali si mira all'ottenimento di obiettivi diversi.

1. FISIOLOGIA DELLA PUBERTÀ E DEGLI ORMONI SESSUALI

L'avvio puberale è determinato dall'attivazione dell'asse ipotalamo – ipofisi – gonadi. L'ipotalamo inizia a secernere in modo pulsatile l'ormone rilasciante gonadotropine (GnRH), il quale stimola la produzione a livello dell'ipofisi anteriore di ormone luteinizzante (LH) e ormone follicolostimolante (FSH). Le gonadotropine, che vengono rilasciate ogni 1-4 ore, agiscono sulle ovaie determinando il rilascio di ormoni sessuali, l'estradiolo (un estrogeno) e il progesterone. Questi ultimi circolano nel flusso ematico per la maggior parte legati a proteine plasmatiche andando da una parte a stimolare gli organi bersaglio del sistema riproduttivo e dall'altra determinando un segnale di feedback negativo su ipotalamo ed ipofisi.

Nel 95% degli individui di sesso femminile questa fase di avvio di pubertà si verifica fra gli 8,5 e i 13 anni d'età², influenzata da fattori sia genetici che ambientali, e il primo segnale è lo sviluppo del bottone mammario (stadio B2 secondo Tanner). Il menarca sopravviene normalmente entro due o tre anni dall'inizio di questo processo ormonale, dopo il picco di crescita staturale, che si ha solitamente in concomitanza con gli stadi B3 e B4 di Tanner³. Un ritardo nella comparsa della pubertà oltre l'età prevista (> 2-2,5 valori di deviazione standard sopra la media della popolazione di riferimento) definisce un quadro di pubertà ritardata, definita come l'assenza di segni di sviluppo del seno entro i 13 anni di età o l'assenza di mestruazioni entro i 15 anni di età o entro 3 anni dall'inizio della pubertà.

2. L'IPOGONADISMO

L'ipogonadismo è definito tale in presenza di un'alterazione fisiopatologica a qualsiasi livello dell'asse ipotalamo-ipofisi-gonadi (HPG). Si parla di ipogonadismo ipergonadotropo (HyperH) nel caso in cui la patologia interessi primariamente le gonadi (ipogonadismo primario), e di ipogonadismo ipogonadotropo (HypoH) qualora vi sia un'alterazione a carico dell'ipotalamo o dell'ipofisi (ipogonadismo secondario). In entrambi i casi quello che si può manifestare può essere un quadro clinico di amenorrea primaria, con assenza di menarca entro i 15 anni di età, o secondaria, con arresto mestruale

per tre mesi in pazienti con cicli mestruali regolari o per più di sei mesi in pazienti con flussi irregolari. Entrambi i casi necessitano di un corretto inquadramento diagnostico e di una terapia ormonale sostitutiva che garantisca, nel primo caso, un adeguato sviluppo dei caratteri sessuali secondari e permetta il mantenimento della fertilità, nonché il benessere psicosociale dell'individuo.

Nell'ipogonadismo primario, anche detto primary ovarian insufficiency (POI), l'incapacità delle ovaie di sostenere una produzione ormonale adeguata comporta un'interruzione del feedback negativo sulla produzione ipotalamica e ipofisaria di GnRH e gonadotropine, le quali si troveranno quindi in quantità aumentate nel circolo sistemico. Le cause più frequenti di POI sono le anomalie cromosomiche, prima fra tutte la sindrome di Turner, e le condizioni iatrogene come chemioterapia, radioterapia e chirurgia pelvica; seguono poi condizioni meno comuni come patologie autoimmuni ovariche, infezioni, e mutazioni puntiformi coinvolte nello sviluppo delle gonadi (causanti disgenesia ovarica) o nel metabolismo ormonale (come mutazioni di FSHR, mutazioni di CYP17A1 o altri enzimi steroidogenici)

La fisiopatologia dell'ipogonadismo secondario invece è caratterizzata dall'assenza o dall'inattività di GnRH e/o FSH ed LH e questo comporta un mancato stimolo sulle gonadi, le quali non produrranno così ormoni sessuali. Può essere determinato da condizioni congenite o acquisite; tra le cause congenite, l'ipogonadismo ipogonadotropo congenito (CHH) è la principale forma: interessa il 10-20% delle adolescenti con ritardo puberale ed è legata alla carenza di GnRH, la quale può essere dovuta a difetti di migrazione o maturazione dei neuroni GnRH secernenti. Alcune tra le altre sindromi genetiche associate ad ipogonadismo secondario sono la sindrome di Kallmann, la sindrome CHARGE, la Prader-Willi e la Waardenburg syndrome e in tutte queste si ha uno sviluppo puberale incompleto, con assenza di spurt puberale e mancata maturazione genitale, spesso associate anche a deficit di altri ormoni ipofisari.

Tra le forme acquisite di ipogonadismo secondario rientrano invece quelle causate da tumori del SNC e tumori ipofisari, patologie infiltrative, infezioni, traumi, irradiazione o chirurgia, patologie ischemiche e apoplezia ipofisaria, farmaci (come GnRH antagonisti/agonisti, glucocorticoidi, narcotici, chemioterapici), le quali possono essere anche associate a ipopituitarismo, cioè a deficit ipofisari multipli. In assenza di lesioni organiche centrali si può infine parlare di deficit funzionale dell'asse HPG, condizione riscontrabile

nel 20% delle giovani con ritardo puberale o sviluppo puberale incompleto e che può conseguire a patologie croniche, malnutrizione, stress emotivo o psicologico, esercizio fisico intenso. In questo caso il trattamento deve essere volto alla risoluzione della causa scatenante⁴.

Tabella 1: diagnosi differenziale degli ipogonadismi⁵

Diagnosis	Associated Gene	Major Phenotype
Hypergonadotropic hypogonadism Ovarian agenesis/dysgenesis Premature ovarian failure	<i>FSHR</i> <i>MCMB9, MCMB8, SYCE1, HFM1, STAG3, BMP15, FMR1, AIRE</i>	
Turner syndrome Swyer syndrome Galactosemia Pelvic trauma Infection Surgery Radiation Sequelae Chemotherapy	<i>GALT</i>	Short stature, web neck, cardiac defects 46XY with streak gonads and female genitalia
Hypogonadotropic hypogonadism Panhypopituitarism Septo-optic dysplasia Surgery sequelae Radiation sequelae Chemotherapy -alkalating agents Central nervous system tumors Isolated hypogonadotropic hypogonadism	<i>HEX1, SOX2</i>	Visual impairment
Kallmann syndrome Mutations in luteinizing hormone and follicle-stimulating hormone β subunits Gonadotropin releasing hormone receptor gene mutations Transcriptor factor gene mutations Prader-Willi syndrome Bardet Biedl	Many <i>KAL1, FGF8, FGFR1, CHD7, SOX10</i>	Tall stature, anosmia
CHARGE syndrome	<i>CHD7</i>	Developmental delay, abnormal satiety Developmental delay, visual impairment, polydactyly, obesity, renal impairment Coloboma, heart defect, choanal atresia, short stature, ear abnormalities
Gordon-Holmes syndrome Hereditary hemochromatosis Tubulinopathies	<i>OTUD4, PNPLA6, RNF216, STUB1</i> <i>HFE</i> <i>TUBB3</i>	Cerebellar ataxia, dementia Cirrhosis, diabetes, cardiomyopathy Facial weakness, developmental delay, polyneuropathy, tracheomalacia
X-linked adrenal hypoplasia Obesity syndromes	<i>NROB1</i> <i>PCSK1, LEP, LEPR</i>	Adrenal failure Hypocortisolism, morbid obesity
Functional hypogonadism Systemic/chronic illness Inflammatory bowel disease Celiac disease Hypothyroidism Anorexia nervosa Excessive exercise		

3. TERAPIA ORMONALE SOSTITUTIVA

I soggetti con ipogonadismo ipo- o ipergonadotropo necessitano di una terapia ormonale sostitutiva (HRT) per avviare la pubertà e mantenere livelli fisiologici di ormoni sessuali in circolo. Poiché gli effetti a lungo termine dell'ipogonadismo possono variare e includere non solo esiti fisici legati alla carenza di ormoni sessuali, ma anche problemi psicologici e implicazioni sulla fertilità, l'avvio, il mantenimento e il consolidamento della pubertà è di estrema importanza.

Nelle pazienti con amenorrea primaria l'obiettivo primario è l'induzione puberale che porta con sé lo sviluppo dei caratteri sessuali secondari, la maturazione degli organi riproduttivi e il menarca. L'induzione di pubertà, come descritto da Divasta e Gordon^{6,7}, solitamente consta di tre fasi.

La prima fase è l'induzione dello sviluppo ghiandolare mammario, che si attua tramite una terapia a basso dosaggio di estrogeni per mimare i livelli fisiologici di ormone durante la fase più precoce della pubertà. Esistono diversi regimi di induzione proposti in letteratura, che differiscono per dosaggi, vie di somministrazione e durata del protocollo. Le formulazioni più usate sono quelle orali e transdermiche, e da questi autori in particolare vengono consigliati gli estrogeni coniugati per via orale (0,30 mg al giorno, con la possibilità di iniziare a dosaggi dimezzati per i primi 3-9 mesi) o di estradiolo micronizzato per via transdermica (0,006-0,025 mg per due volte alla settimana). In genere, questa fase dura 6-18 mesi ed è individualizzata in base all'età della paziente, allo stadio puberale antecedente all'inizio della terapia, all'altezza e alla risposta alla terapia. Il cerotto estrogenico transdermico può essere eventualmente tagliato per ridurre al minimo la dose di estrogeni nei primi 3-9 mesi di terapia e successivamente, a seconda della risposta clinica, applicato per intero.

La fase successiva è l'induzione delle mestruazioni. Durante questa fase, le dosi di estrogeni vengono ulteriormente aumentate. I sopracitati autori suggeriscono l'uso di estrogeni coniugati per via orale (per esempio, Premarin 0,625 mg al giorno) o di un cerotto di potenza equivalente (0,025-0,05 mg, da sostituire due volte a settimana).

Dopo 12-24 mesi di terapia a base di soli estrogeni, si aggiunge la terapia progestinica ciclica. I progestinici vengono aggiunti, in genere, quando si manifesta il primo *spotting* ematico vaginale e/o quando lo sviluppo del seno è completo, in una dose di 10 mg al giorno per 7-10 (fino a 14 secondo alcuni autori³) giorni al mese, allo scopo di indurre le mestruazioni, ma anche per minimizzare i sanguinamenti al di fuori della mestruazione e

per prevenire l'iperplasia endometriale e la sua possibile evoluzione displastica e neoplastica⁴. Le opzioni di trattamento includono principalmente il progesterone naturale micronizzato (100-200 mg una volta al giorno) e i derivati sintetici come il medrossiprogesterone acetato (MPA) per via orale (5-10 mg al giorno), il noretisterone acetato (1 mg al giorno) e il didrogesterone (10 mg al giorno). In generale, i progestinici non androgenici sembrano essere una scelta più adatta, poiché comportano minori rischi metabolici e cardiovascolari⁸, e il più consigliato è sicuramente il progesterone micronizzato^{9,10}. Nella pratica clinica, i medici devono scegliere tra un regime di somministrazione combinato-sequenziale, in cui gli estrogeni vengono somministrati per 21-28 giorni al mese e il progestinico per 7-14 giorni al mese, e uno combinato-continuo, in cui le i preparati estrogenici vengono assunti ininterrottamente³. I contraccettivi orali combinati contenenti un estrogeno e un progestinico possono essere utilizzati come terapia ormonale sostitutiva solo nelle donne ipogonadiche in età post-puberale, tenendo conto del loro profilo cardiovascolare e metabolico sfavorevole, nonché dell'aumento del rischio di ipertensione e tromboembolismo venoso.

Infine, la terza fase viene descritta come un mantenimento a lungo termine di un normale stato estrogenico. Le pazienti possono scegliere di utilizzare estrogeni per via orale o transdermica (ad esempio, Premarin orale 0,625-1,25 mg al giorno, o etinil estradiolo 20-35 microgrammi al giorno o cerotto transdermico 0,075-0,1 mg, tutti da sostituire due volte a settimana) associati a progestinici per 7-10 giorni al mese. In alternativa, si possono usare contraccettivi orali o cerotti transdermici a base di combinazioni preformate di estrogeni e progestinici.

Nelle pazienti con amenorrea secondaria la terapia sostitutiva si compone invece solamente di quest'ultima fase descritta, avendo queste già ottenuto una completa maturazione degli organi riproduttivi e sviluppato adeguatamente i caratteri sessuali secondari. Queste necessitano quindi solamente di un mantenimento dei livelli ormonali fisiologici ai fini della fertilità ma anche per riprodurre tutti quegli effetti che gli estrogeni intrinsecamente inducono a livello sistemico nei diversi apparati.

3.1 Formulazione orale

E' la scelta terapeutica maggiormente attuata in particolare con estrogeni sintetici o etinil estradiolo, efficaci se adeguatamente assunti, ma con molteplici effetti collaterali.

L'estradiolo E2 è l'estrogeno secreto endogenamente e si lega al recettore umano per gli estrogeni, mentre l'etinil estradiolo è un analogo sintetico dell'E2: non viene metabolizzato in E2 e per tal motivo non è rilevabile con gli attuali metodi commerciali di dosaggio dell'E2.

Gli estrogeni equini coniugati (CEE) come il Premarin (Pfizer) sono stati i più utilizzati in passato; tuttavia dati più recenti suggeriscono un aumento del rischio di fenomeni tromboembolici e ictus collegati all'uso di questi preparati, motivo per cui secondo alcuni autori dovrebbero essere evitati⁴.

Tutti questi preparati sono metabolizzati nel fegato, principalmente dal citocromo microsomiale P-450, configurando quindi un importante effetto di primo passaggio epatico che condiziona fortemente la farmacocinetica di questi preparati. Da una parte, infatti, il metabolismo epatico ne riduce la biodisponibilità, già in parte compromessa dall'assorbimento a livello intestinale, fino al 2-10% rispetto alla dose somministrata; dall'altra inficia la capacità del fegato stesso di produrre importanti sostanze quali fattori anticoagulanti e ormoni come l'*insulin-like growth factor* (IGF1), comportando effetti collaterali che coinvolgono diversi sistemi e apparati.

3.2 Formulazione Transdermica

I maggiori vantaggi della scelta transdermica sono la protezione epatica, la miglior biodisponibilità e la possibilità di somministrare dosi minime di 17β estradiolo mediante il taglio dei sistemi a matrice.

Il dosaggio più basso disponibile per i cerotti estrogenici transdermici fornisce 14 mcg/d di E2, ma vengono maggiormente utilizzati quelli da 25 mcg/d; per somministrare dosi più basse utilizzando i cerotti da 25 mcg/d è quindi possibile tagliarli, solamente però se questi possiedono un design a matrice, mentre per i cerotti con tecnologia a reservoir questo non è possibile⁵. In uno studio retrospettivo svedese pubblicato sul *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* nel 2001¹¹ viene dimostrato che l'applicazione notturna di una dose di cerotto frazionata (un quarto di cerotto da 25 mcg, che equivale approssimativamente ad una dose di 6,2 mcg) è in grado di imitare l'andamento fisiologico dei valori ematici di estradiolo, con un picco al mattino presto seguito da una diminuzione poche ore dopo la rimozione del cerotto. Secondo questi autori, che nel 2014 hanno poi pubblicato un altro studio clinico retrospettivo condotto su 54 pazienti con un totale di 88 valutazioni, è dunque consigliato, allo scopo di indurre la pubertà, iniziare la terapia

estrogenica sostitutiva con l'applicazione notturna di patches ad una dose di 0,05-0,07 mcg/kg, equivalente a circa 2-6 mcg per cerotto; nelle ragazze un po' più grandi invece, nelle quali l'obiettivo principale è lo sviluppo mammario, la dose consigliata è di 0,08-0,12 mcg/kg, corrispondente a 3-7 mcg per patch¹².

Inoltre, in numerosi studi condotti su pazienti affette da sindrome di Turner si è visto come l'E2 transdermico determini concentrazioni più basse di LH ed FSH in circolo rispetto alle preparazioni orali¹³⁻¹⁵, grazie alla sua capacità di generare una maggior concentrazione di estrogeni in circolo. La via di somministrazione transdermica è stata infatti sviluppata anche per superare l'effetto di primo passaggio epatico che si verifica con gli estrogeni orali. Questi vengono metabolizzati proprio a livello del fegato che, al fine di mantenere un livello sierico di estrogeni adeguato all'ottenimento di un effetto terapeutico, è in tal modo esposto a concentrazioni ormonali sovra-fisiologiche. Con la somministrazione transdermica, invece, concentrazioni uguali di estrogeno vengono somministrate a tutti i tessuti corporei, evitando così al fegato l'esposizione a queste dosi elevate. Ne consegue dunque una miglior biodisponibilità, con una maggior concentrazione sierica di estrogeni a parità di dose somministrata e col raggiungimento di uno stato stazionario para-fisiologico, assimilabile a quello che si verifica durante la fase follicolare del ciclo mestruale, evitando i picchi e le cadute di concentrazione che si hanno con la via di somministrazione orale. Ciò consente per di più di monitorare accuratamente i livelli di 17β -E2 su siero in corso di terapia, con la possibilità di aggiustare la posologia in itinere¹⁶. La biodisponibilità del 17β estradiolo transdermico è tuttavia individuale e dipende dal tipo di patologia sottostante, dal flusso del farmaco attraverso la cute, dalla sede di applicazione, dall'entità del pannicolo sottocutaneo e dalle dimensioni del taglio della matrice. L'emivita del 17β estradiolo transdermico è maggiore rispetto alla forma fisiologica (22 minuti) e il tessuto adiposo al di sotto del "patch" agirebbe come deposito, determinando un rilascio più graduale di ormone in circolo.

Infine, neppure questa via di somministrazione sembra essere esente da effetti collaterali; fra i maggiormente riportati vi sono: reazione cutanea (64%), fastidio alla rimozione (32%), nausea (12%), tensione mammaria (18%)^{17,18}

4. EFFETTI DELL'HRT SUI VARI APPARATI: CONFRONTO FRA TERAPIA ORALE E TRANSDERMICA

Autori studio/paper di riferimento/anno di pubblicazione	Dural et al. ¹⁹ J Pediatr Adolesc Gynecol 2022	Goldštajn et al. ²⁰ Archiv Gynecol Obstetr 2022	Klein et al. ⁵ J Pediatr Adolesc Gynecol 2019	Voutsadaki et al. ⁴ Acta Biomed 2022	Kenigsberg et al. ¹⁶ J Pediatr Adolesc Gynecol 2013
Tipo di studio	Revisione retrospettiva e confronto fra Gr1 (E2 OS) e Gr2 (E2 TD)	Revisione sistematica di letteratura su confronto fra HRT OS e TD	Revisione di letteratura in merito all'HRT	Revisione di letteratura in merito all'HRT	Revisione di letteratura sul confronto fra HRT OS e TD per l'induzione puberale
Numero e tipo di pazienti	43 pazienti ipogonadici (Gr1 n=22; Gr2 n=21) di cui 28 con iPOI, 5 con storia di HSCT allogenico, 2 con TS, 1 con galattosemia, 7 con CHypoH	donne in post-menopausa	giovani e adolescenti ipogonadiche	giovani e adolescenti ipogonadiche	giovani e adolescenti ipogonadiche
Età (media e range)	Gr1: 19 (15-22) Gr2: 20 (15-24) P value = 0,055				
Periodo esaminato	24 mesi	Pubblicazioni dal gennaio 1990 al marzo 2021			
Femminilizzazione			Migliori possibilità di normalizzazione delle dimensioni uterine all'aumentare del dosaggio e della durata del trattamento ²¹	Quasi tutti i regimi di HRT portano ad acquisizione di stadio B2 sec. Tanner entro i 6 mesi e stadio 4 nei 2 anni ca. ^{9,22} ; acquisizione di volume uterino normale sembra essere influenzata da via di somministrazione, dosaggio, età all'inizio e durata del trattamento.	50% delle pazienti con TS non riescono ad ottenere una completa maturazione uterina con terapia OS ²³ ; aumento dimensioni uterine nelle pazienti con TS con terapia TD rispetto a OS e tendenza allo sviluppo mammario ²⁴
Effetti sulla BMD	Aumento BMD Z-score (L1-L4) medio a due anni: OS: +0.41 (95% CI, 0.25-0.58) TD: +0.7 (95% CI, 0.47-0.93) p=0.037	Effetto osteoprotettivo e di aumento della BMD sia per O che per TD-HRT; studio WHI ha dimostrato un incremento della BMD e una riduzione delle fratture dell'anca nei pazienti con HRT rispetto ai controlli ²⁵ ; effetto	Effetto più favorevole della terapia TD se confrontato con pillole contraccettive e in donne con POI ²⁶⁻²⁹	TD-E2 sembra comportare più rapida maturazione spinale rispetto a O-CEE ²⁴ ; EE sembrerebbe essere meno efficace su mineralizzazione ossea ^{30,31}	-

		maggiore se inizio precoce e dosi più alte			
Effetto sulla crescita	Terapia TD ha dimostrato preservazione dei livelli di IGF1 e di SHBG rispetto a terapia OS ^{14,32-35}			non compromessa da HRT, bensì bassi dosaggi usati per l'induzione di pubertà la promuovono e preservano il potenziale di crescita ^{5,36} ; TD-17βE2, non avendo effetto di primo passaggio epatico, non determina riduzione dei livelli di IGF-1 ³⁷ , forse aumentando la crescita longitudinale ³⁸ ; al contrario O-EE è associato a livelli inferiori di IGF-1 ³⁸	Riduzione dei livelli di IGF-1 con terapia OS, non osservata con terapia TD, la quale consente acquisizione di statura adulta normale ^{39,40} In ragazze con TS TES per induzione puberale andrebbe fatta con TD e iniziata precocemente (12-12.9 aa) ⁴¹ ; studio osservazionale su oltre 1500 ragazze con TS ¹¹⁵ rileva AH con TES-TD >2,1 cm rispetto a OS (guadagno rispetto all'altezza prevista: 8,4 ± 4,5 cm EE-OS; 9,6 ± 4,0 cm E2-OS; 11,2 ± 3,6 cm E2-TD; 8,4 ± 3,6 TEPS).
Rischio cardiovascolare		Beneficio dell'HRT dimostrato per donne di età < 60 anni, nelle quali si è vista riduzione del 44% del rischio di SCA. Nelle donne di età > 60 anni al contrario HRT ha dimostrato un aumentato rischio di infarto ^{42,43} . Non sono state dimostrate differenze in questi termini fra le forme di somministrazione O e TD.	Diminuzione PA, con eccezione: etinil-E2 determina aumento PA, a meno che non venga somministrato o assieme a progestinici antimineralcorticoidi ⁴⁴	HRT sembra determinare risoluzione della disfunzione endoteliale in 6 mesi di trattamento ⁴⁵ , diminuzione della PA, miglioramento della funzione renale, diminuita attivazione del SRAA in giovani donne con POI ⁴⁶ ; riscontro di miglior impatto di estrogeni TD, rispetto a terapia O, su markers di rischio CV quali <i>fasting glucose</i> e livelli di colesterolo totale e trigliceridi ⁴⁷ ; rischio stroke non sembra essere aumentato con uso di progestinici quali progesterone, nortestosterone e derivati del pregnano, mentre lo stesso non è vero per derivati del nonpregnano ⁴⁸⁻⁵⁰	Aumentato rischio stroke con 0,05 mg di estrogeni ma induzione di pubertà con terapia TD richiede dosi inferiori
Rischio VTE		Rischio inferiore con terapia TD, con RR di 0.9 (95% CI 0.5-1.6) rispetto ad O, con RR di 3.5	Aumentato con terapia OS se confrontato con terapia	Rischio aumentato per tp O rispetto a TD, soprattutto in soggetti con ulteriori fattori di rischio (es. obesità)	Aumentato di 4 volte con terapia OS rispetto ai non utilizzatori; effetto procoagulante

		(95% CI 1.8-6.8) ⁵¹ ; RR-TD di 0.9 (95% CI 0.5-1.6) mentre RR-O di 3.5 (95% CI 1.8-6.8) ⁵² ; rischio aumentato per alti dosaggi di O-HRT, non aumentato per alti dosaggi TD ⁵³ ; associazione di E2 O con MPA è correlata al maggior rischio (OR 2.10, CI 1.92-2.31), mentre con diidrosterone al minor rischio (OR 1.18, 0.98-1.42); estradiolo comporta minor rischio rispetto a O-CEE (OR 0.93 95% CI, 0.87 to 1.01) ⁵⁴ ; O-HRT aumenta di 25 volte rispetto ai non utilizzatori il rischio in pz con mutazioni protrombotiche, mentre TD-HRT lo aumenta di 4 volte ^{52,55}	TD, soprattutto in donne con altri fattori di rischio (es. obesità) ⁵⁶		legato a aumento livelli sierici di frammenti di protrombina, fattore VIII e CRP ⁵⁷⁻⁵⁹ Ridotto rischio di VTE con terapia TD e ridotta sintesi di enzimi epatici e proteine
Effetti su metabolismo glucidico e lipidico	Diminuzione LDL con HRT, anche se alcuni studi hanno evidenziato una riduzione non significativa con tp TD; aumento HDL e TG con O-HRT; non effetto significativo su HDL con TD-HRT ma significativa riduzione di TG. Riduzione significativa del rischio di diabete, probabilmente maggiore con O-HRT rispetto a TD-HRT; riduzione di Hb glicata con entrambe le vie ⁶⁰ ; riduzione dell'insulino resistenza in donne non diabetiche, con entrambe le vie, più evidente con O-HRT; impatto negativo di MPA e levonorgestrel su tolleranza a glucosio e insulino resistenza ⁶¹	Effetto favorevole con terapia OS in donne con menopausa premenopausa e riduzione del colesterolo LDL ed aumento di quello HDL ⁶²⁻⁶⁴	Vie di somministrazione O e TD appaiono simili in merito ad effetti su metabolismo lipidico, glucidico, tolleranza insulinica e turnover proteico, pur essendo il fegato esposto a più elevati livelli di estrogeni con terapia O	Aumento di HDL, diminuzione LDL, aumento trigliceridi; aumento insulino-resistenza in donne con sindrome metabolica ³⁹ con terapia OS; No effetti su metabolismo lipidico né insulino-resistenza, no aumento di markers infiammatori ^{16,65} ;	

Rischio neoplastico su endometrio e mammella		Non dimostrato aumentato rischio di lesioni maligne e pre-maligne endometriali; fattore di rischio principale per il tumore all'endometrio è l'uso di sola terapia estrogenica sostitutiva in pazienti con utero. Aumento rischio tumore mammella con HRT (RR 1.66 95% CI 1.58-1.75 p<0.0001); rischio maggiore con O-HRT combinata rispetto a sola HRT estrogenica (RR 2.00 vs 1.30, p<0,0001) ⁶⁶ ; rischio maggiore con HRT contenente progestinici sintetici rispetto a progesterone micronizzato ⁶⁷ ; aumento rischio con HRT > 5 aa (OR 1.44, 1.29-1.59); estrogeni per via vaginale non associati a aumento rischio ⁶⁸		In soggetti con TS, rischio di tumore mammella a lungo termine dopo trattamento prolungato con estrogeni sia O che TD rimane molto inferiore rispetto a gruppo di controllo ⁶⁹	
--	--	---	--	---	--

VTE: tromboembolismo venoso; BMD: bone mineral density; HRT: terapia ormonale sostitutiva; TD: transdermica; OS: orale; SHBG: sex hormone binding globulin; IGF1: insulin-like growth factor 1; TS: Turner Syndrome; iPOI: insufficienza ovarica prematura idiopatica; HSCT: trapianto di cellule staminali ematopoietiche; CHypoH: ipogonadismo ipogonadotropo congenito; MPA: medrossiprogesterone acetato; TES: terapia estrogenica sostitutiva; TEPS: terapia estroprogestinica sostitutiva; AH: adult height

4.1 Livelli ormonali sierici e avvio puberale

Nello studio sopracitato¹¹, condotto su 15 soggetti di età compresa tra 12.3 e 18.1 anni sono stati valutati i livelli plasmatici estrogenici di soggetti ipogonadici (affetti da sindrome di Turner, ipogonadismo ipogonadotropo secondario a lesione cerebrale, insufficienza ovarica) trattati con dosi differenti di 17 β estradiolo transdermico sulla base del peso corporeo e della fase puberale che si voleva indurre. Lo studio ha mostrato che con un dosaggio di 0.08-0.12 mcg/kg viene raggiunto un livello estrogenico di 10-40 pmol/l, tipico della prima fase puberale e associato a sviluppo di B2 e ad un incremento della velocità di crescita, mentre una fase medio puberale è raggiunta con valori di 75-130 pmol/l. Tale studio è inoltre stato condotto applicando dosi progressivamente crescenti di estrogeni e limitando l'apposizione del cerotto alle sole ore notturne, metodo che è parso

dunque vantaggioso. Si è iniziato quindi con l'applicazione di un ottavo di cerotto (pari a 3.1 mcg/24 ore) nei soggetti sotto 40 kg, di un sesto (pari a 4.2 mcg/24 ore) tra i 40-55 kg, un quarto (pari a 6.2 mcg/24 ore) sopra i 55 kg; dopo i primi 9 mesi di induzione la dose è stata progressivamente incrementata per 6 mesi in modo da raggiungere la fase media puberale in 15 mesi.

L'effetto di dosi progressive di estradiolo transdermico è stato studiato anche in altre 9 pazienti prepuberi affette da sindrome di Turner con età scheletrica di 10.5 anni⁷⁰. La somministrazione iniziale di 5 mcg/die è stata raddoppiata dopo 6-9 mesi; dopo un analogo intervallo temporale è stata somministrata la dose piena di 25 mcg/die, proseguita a lungo termine. L'avvio puberale è avvenuto dopo una media di 3 mesi e il menarca si è verificato dopo 2 anni con l'associazione di progestinico nel secondo anno di terapia (18-24 mesi). Importante risultato era il mantenimento di una velocità di crescita regolare (3.2-5 cm/anno) durante il primo anno di terapia senza la modificazione della previsione staturale iniziale.

4.2 Femminilizzazione

Il ruolo degli estrogeni nello sviluppo degli organi riproduttivi e dei caratteri sessuali secondari è centrale a partire dalla pubertà, quando a seguito dell'attivazione dell'asse ipotalamico-ipofisario-gonadico iniziano a legarsi ai loro numerosi recettori specifici presenti in tutto il corpo. A livello uterino determinano infatti un aumento dimensionale e del rapporto fundocervicale, nonché la proliferazione ciclica, in fase follicolare del ciclo mestruale, della componente ghiandolare dell'endometrio e la sua riepitelizzazione al termine della mestruazione. Secondo alcuni autori⁴ l'acquisizione di un volume uterino normale in particolare sembrerebbe essere influenzata da diversi fattori legati alla terapia, tra cui la via di somministrazione, il dosaggio, l'età a cui è stato iniziato il trattamento e la durata dello stesso. Per tale motivo è fondamentale la supplementazione estrogenica in condizioni di deficit di questo ormone, ai fini di aumentare le possibilità di normalizzazione delle dimensioni uterine per garantire la fertilità; vi sono evidenze che dimostrano un vantaggio nell'aumentare il dosaggio e la durata del trattamento ai fini del conseguimento di questo obiettivo²¹.

Gli estrogeni promuovono inoltre lo sviluppo ghiandolare mammario, sia direttamente stimolando la proliferazione e differenziazione dell'epitelio duttale e la crescita del tessuto

connettivo, che indirettamente determinando un innalzamento dei livelli di prolattina e progesterone¹⁶.

In una revisione di letteratura pubblicata nel 2022, Voutsadaki et al.⁴ annotano come diversi lavori dimostrino che quasi tutti i regimi di HRT portano all'acquisizione di uno sviluppo mammario allo stadio B2 di Tanner entro i sei mesi, e ad uno stadio B4 nell'arco di circa due anni^{9,22}, riproducendo quello che è il normale sviluppo puberale.

Oltre a ciò, sembra che sussistano delle differenze fra estrogeni per via transdermica e orale nella capacità di stimolare la crescita uterina¹⁶. Uno studio riguardante pazienti con sindrome di Turner ha riportato come il 50% di queste non riescano ad ottenere una completa maturazione uterina con la terapia orale²³, mentre da un altro studio di controllo randomizzato che compara le vie di somministrazione di estrogeni, sempre in pazienti con TS, emerge un aumento maggiore delle dimensioni uterine nelle pazienti in terapia transdermica rispetto a quella orale e una maggior tendenza allo sviluppo mammario delle prime, assieme ad una più rilevante riduzione dei livelli di sierici di LH ed FSH rispetto a quella ottenuta con la terapia orale.^{13,24,71}

4.3 Densità minerale ossea

Gli estrogeni sono essenziali per la salute delle ossa, in particolare per la loro maturazione, per la fusione epifisaria, la crescita nel periodo puberale e il raggiungimento di una massa minerale ossea normale⁷². Hanno anche un effetto inibitorio sul riassorbimento osseo, per cui un loro calo in circolo può essere associato ad un eccessivo riassorbimento osseo legato ad un'aumentata attività osteoclastica e, di conseguenza, ad una perdita di densità ossea, nonché ad una ritardata fusione epifisaria. Una dimostrazione patologica di questo processo si può riscontrare nei casi di deficit congenito di aromatasi, che comporta l'incapacità di convertire gli androgeni in estrogeni. Nei pazienti maschi presentanti questo deficit enzimatico la diagnosi viene posta proprio per la presenza di alta statura dovuta a chiusura epifisaria incompleta.

L'effetto benefico della terapia ormonale sostitutiva sull'osso è stato dimostrato in un'ampia popolazione post-menopausale (212 soggetti osteopenici, BMD compreso tra -1 e -2.5 SDS) trattata con terapia estroprogestinica transdermica combinata (45 mcg di 17 β estradiolo e 30-40 mcg di levonorgestrel). Dopo due anni di trattamento l'incremento di BMD a livello lombare e dell'anca era rispettivamente dell'8% e del 6% senza differenza per i due gruppi trattati con dosi differenti di progestinico.⁷³ Numerosi altri autori hanno

evidenziato come la terapia ormonale sostitutiva porti ad un aumento della mineralizzazione ossea, con una conseguente importante riduzione del rischio di frattura nella post-menopausa, come dimostrato dal trial randomizzato Women's Health Initiative²⁵. E' proprio per questo motivo che ad oggi l'HRT viene considerata una terapia di prima linea per il mantenimento della BMD in donne con meno di 60 anni in post-menopausa nella prevenzione delle fratture. Si è visto inoltre che l'effetto della terapia è maggiore tanto più precoce è il suo inizio e tanto maggiori sono le dosi utilizzate²⁰.

Nei pazienti con ipogonadismo invece i benefici della terapia estroprogestinica sull'osso sono stati evidenziati in uno studio in particolare, condotto su 43 pazienti donne di età compresa fra i 15 e i 24 anni, con ipogonadismo secondario a diverse patologie (insufficienza ovarica prematura idiopatica o iPOI, trapianto allogenico di cellule staminali emopoietiche, Turner syndrome, galattosemia e ipogonadismo ipogonadotropo congenito o CHH). Queste pazienti sono state suddivise in maniera retrospettiva in due gruppi in base al tipo di HRT a cui sono state sottoposte (gruppo 1: orale; gruppo 2: transdermica) per una durata di 24 mesi. Si è poi confrontato l'aumento dopo due anni di terapia del valore medio di BMD Z-score di ciascun gruppo, valutato a livello vertebrale fra L1-L4. I risultati di questo studio hanno dimostrato un significativo effetto positivo dell'HRT con dose fisiologica di E₂ sull'acquisizione di massa ossea a livello lombare, con una possibile superiorità della terapia transdermica rispetto a quella orale¹⁹.

Un incremento di mineralizzazione ossea (0.81 Z score \pm 0,30) è stato dimostrato anche in 12 soggetti affetti da sindrome di Turner di età compresa tra i 15.41 e 21.85 anni, il cui menarca è stato indotto farmacologicamente dopo i 12 anni⁷⁴.

In merito a quale via di somministrazione sia da preferire per ottenere tale beneficio non vi è una chiara concordanza dei dati, per quanto sembri che la terapia con estradiolo E₂ transdermico comporti una più rapida maturazione ossea spinale rispetto alla terapia orale con CEE²⁴; inoltre vi sono evidenze che portano a pensare che l'etinil estradiolo risulti meno efficace a tale scopo^{30,31} rispetto ad altri tipi di estrogeni.

4.4 Crescita

Lo studio di pochi soggetti affetti da sindrome di Turner ha mostrato una possibile riduzione della velocità di crescita dopo l'inizio della terapia sostitutiva. A tal proposito è stato condotto uno studio su 14 soggetti affetti da sindrome di Turner trattati con ormone della crescita dall'età di 9.51 anni e con dosi "fisiologiche" di estrogeni (6). Sette pazienti

sono state trattate all'età di 12-12.9 anni, 7 all'età di 14-14.9 anni con una dose iniziale considerata "fisiologica" di 0.2 mg di estradiolo Depot i.m. al mese progressivamente incrementata. Obiettivo dello studio era verificare l'impatto della terapia estrogenica a dose "fisiologica" sull'altezza definitiva/ pressoché definitiva rispetto ad un gruppo di controllo trattato con ormone della crescita ed estrogeni equini coniugati a dosi standard (0.3 mg per sei mesi; 0.6 mg successivamente). Il guadagno staturale è risultato significativamente superiore nel gruppo trattato precocemente con estrogeni i.m. rispetto al gruppo trattato precocemente con estrogeni coniugati (5.9 cm, $P < 0.05$). La crescita ha mostrato un andamento a "spurt" con un picco di velocità registrato nel primo anno e mezzo (in particolare nei primi sei mesi). Non si assisteva invece ad una differenza statisticamente significativa tra i due gruppi trattati tardivamente con le due diverse formulazioni estrogeniche.

Numerosi lavori scientifici dimostrano infatti come la crescita non venga compromessa dalla terapia estrogenica, e come bensì bassi dosaggi usati per l'induzione di pubertà la promuovano preservando il potenziale di crescita^{5,36}. In aggiunta, la terapia con 17β -E2 somministrato per via transdermica non determina una riduzione dei livelli di IGF-1 come invece avviene con la terapia orale^{12,16,37,39}, proprio perché non avendo effetto di primo passaggio epatico non va ad inficiare la funzione epatica di sintesi ormonale e proteica. In questo modo la terapia transdermica favorisce ancor di più la crescita longitudinale in corso di pubertà, mentre, al contrario, secondo una metanalisi di Zaiem et al. pubblicata nel 2017³⁸, il trattamento orale nello specifico con etinil estradiolo sembrerebbe essere associato a livelli inferiori di IGF-1.

4.5 Rischio cardiovascolare

L'azione protettiva degli estrogeni sul sistema vascolare è duplice, in quanto da una parte favoriscono il mantenimento dell'elasticità dei vasi e quindi la riduzione del post-carico cardiaco, dall'altra contribuiscono al miglioramento del profilo lipidico. A livello epatico, infatti, gli estrogeni influiscono sulla produzione e sull'espressione delle apolipoproteine, alterando quindi in modo significativo le concentrazioni ematiche di lipidi, con una diminuzione del colesterolo totale e delle lipoproteine a bassa densità (LDL) e un aumento di lipoproteine ad alta densità (HDL) e delle concentrazioni di trigliceridi. A livello delle cellule endoteliali vasali, poi, stimolano l'espressione di ossido nitrico sintetasi favorendo

la produzione di ossido nitrico, il quale è uno dei principali agenti vasodilatatori a livello vascolare. L'effetto di vasodilatazione, aggiunto allo stimolo di accelerazione del turnover delle cellule endoteliali e inibizione della proliferazione delle cellule muscolari lisce della parete vasale, contribuisce alla prevenzione degli eventi ischemici e in generale alla protezione cardiovascolare⁷⁵.

Alla luce di queste evidenze, vi sono tuttavia dati contrastanti in merito all'effettivo ruolo protettivo a livello cardiovascolare della terapia ormonale sostitutiva. La formulazione orale è stata infatti correlata all'espressione di fattori di rischio cardio-vascolare misurabili⁵²: nonostante questa migliori il bilancio lipidico (HDL/LDL) rispetto alla forma transdermica, secondo alcuni autori indurrebbe la produzione di proteine di fase acuta potenzialmente dannose per l'endotelio, attraverso le alte concentrazioni di ormone che genera a livello epatico e che sono state calcolate essere quattro/cinque volte maggiori rispetto a quelle plasmatiche. Sono stati osservati incrementi dei livelli di PCR, amiloide sierica, frammenti protrombinici 1+2 (procoagulanti) e di enzimi coinvolti nell'alterazione della placca ateromasica.

Di contro, un altro clinical trial in doppio cieco randomizzato ha dimostrato un effetto di protezione dell'endotelio da parte della terapia contraccettiva orale rispetto alla formulazione transdermica. Tale studio è stato effettuato su 152 donne isterectomizzate dopo la menopausa allo scopo di studiare marcatori della funzione endoteliale, e ha mostrato una riduzione delle molecole solubili di adesione vascolare (oE2 $P < 0.01$; oE2 + gestodene $P < 0.001$) e di sE-selectine (oE2 + gestodene $P < 0.05$) nei soggetti trattati con estrogeno o estroprogestinico per os rispetto al placebo e alla formulazione transdermica, e di fattore di von Willerbrand (tE2 $P < 0.05$) nei soggetti trattati con patches⁷⁶.

In aggiunta, un altro lavoro in cui è stato studiato l'andamento dei parametri vasoattivi in corso di terapia estrogenica, ha messo in luce come la formulazione orale sia associata ad un meccanismo di vasodilatazione endotelio-dipendente non attivato nella forma transdermica⁷⁷. Il disegno cross-over dello studio ha previsto il trattamento di 20 donne in menopausa recente (1.8 ± 0.1 anni) di età media 50 ± 0.6 anni, ciascuna con etinil estradiolo orale (2 mg micronizzato) e etinil estradiolo emidrato percutaneo (1.5 mg in gel) rispettivamente per un mese con un "wash out" di un mese tra i due trattamenti. I valori di catecolamine (adrenalina e noradrenalina) si sono ridotti significativamente in entrambi i trattamenti; la formulazione orale è risultata associata all'incremento di monossido d'azoto (NOx, $p < 0,01$) e alla riduzione di LDL, entrambi effetti biologici positivi sul rischio

cardiovascolare non confermati nella formulazione percutanea. Lo studio ha inoltre mostrato una correlazione negativa tra LDL e NOx ($P < 0.05$, $r = 0.3$).

Tali lavori, tuttavia, si sono focalizzati sullo studio dell'endotelio, primariamente coinvolto nei meccanismi di trombosi arteriosa nella donna adulta. Tale condizione di rischio non è verosimilmente presente nell'età adolescenziale, epoca in cui l'endotelio è ancora preservato. In tale fascia d'età è la trombosi venosa a rappresentare l'evento vascolare più frequentemente associato ad una terapia estrogenica orale⁷⁸⁻⁸⁰.

Ulteriori studi dimostrano d'altro canto come la formulazione estrogenica transdermica sia associata alla riduzione di altri fattori di rischio cardiovascolare in donne in post-menopausa, in particolare alla riduzione dello spessore carotideo, che è apparsa essere correlata alla riduzione delle E-selectine indotta dagli estrogeni. Un trial condotto su donne di età media di 57 anni (35 soggetti confrontati con 32 controlli placebo di pari età) ha mostrato come, dopo un anno di trattamento estrogenico per via transdermica in associazione con MPA (medrossiprogesterone acetato) orale, si abbia la riduzione dello spessore della tonaca media carotidea ($P < 0.01$) e dei valori di ICAM -1 (molecole di adesione intercellulare), VCAM-1 (molecole di adesione vascolare), E-selectine e di MCP-1 (proteina chemotattica monocitaria), che risulta significativa nel gruppo trattato rispetto al placebo⁸¹.

Sempre in merito al rischio cardiovascolare nelle donne in post-menopausa, in una revisione sistematica del 2022²⁰, Goldštajn et al. sottolineano come siano stati condotti numerosi studi sulle conseguenze dell'HRT e come quasi tutti abbiano concordato nel dimostrare un effettivo beneficio di questa. Mancano tuttavia evidenze circa la possibile superiorità di una via di somministrazione rispetto alle altre, per quanto sembra che vi sia una tendenza fra le società di cardiologia a prescrivere la forma transdermica sulla base del miglior profilo di sicurezza. Secondo un'analisi dei dati ricavati dal braccio in sola terapia estrogenica dello studio WHI^{42,43}, inoltre, sembrerebbe esservi un beneficio dell'HRT dimostrato però solamente per donne di età inferiore ai 60 anni, nelle quali si è vista riduzione del 44% del rischio di SCA, mentre nelle donne di età superiore, al contrario, si è osservato un aumento del rischio di infarto associato a questa terapia.

Per quanto riguarda il rischio cardiovascolare nelle giovani, un lavoro di Kalantaridou et al.⁴⁵ dimostra come le pazienti con POI presentino una significativa disfunzione endoteliale vascolare, la quale appare diminuita dopo sei mesi di trattamento con terapia ormonale sostitutiva. Un altro studio ha inoltre osservato come l'HRT sia in grado di provocare una

diminuzione della PA e un miglioramento della funzione renale con diminuita attivazione del SRAA in giovani donne con POI⁴⁶.

Anche nel contesto della giovane età, sembra che la terapia estrogenica somministrata per via transdermica comporti una miglior protezione a livello cardiovascolare. Nella revisione sistematica e metanalisi di Zaiem et al. si riscontra proprio un miglior impatto degli estrogeni transdermici rispetto a terapia orale su markers di rischio cardiovascolare quali il livello di colesterolo totale e trigliceridi e il *fasting glucose*.

4.6 Coagulazione e rischio di trombosi venosa profonda (VTE)

Gli estrogeni influenzano la coagulazione in senso pro-trombotico incrementando i fattori procoagulanti VII, IX, X, XII e XIII⁸²⁻⁸⁴ e riducendo i fattori anticoagulanti C ed S. Oltre che con i dosaggi specifici di tali proteine, l'effetto procoagulante di tale trattamento può essere evidenziato dal test di resistenza alla proteina C attivata (APCr) e da poco eseguiti test di generazione della trombina (19,20). Tra questi possono trovarsi aumentati i frammenti protrombinici 1+2. Ne consegue che soggetti con fattori procoagulanti ai limiti superiori della norma (> 90 centile per fibrinogeno, fattori II, VIII, IX, XI), che presentano di per sé un rischio di due/tre volte superiore rispetto alla popolazione generale, hanno un rischio incrementato in caso di utilizzo di contraccettivi. Anche la fibrinolisi è attivata durante la terapia estrogenica con un incremento di plasminogeno, di attività dell'attivatore del plasminogeno tissutale (tPA), di complessi di plasmina- α_2 , antiplasmina, D-dimero e TAFI (inibitore della fibrinolisi trombina attivata)⁷⁸⁻⁸⁰. Tale meccanismo potrebbe essere amplificato (Pabinger et al, 1994), ma non eccedente, in risposta allo stato protrombotico.

Gli stati di eterozigosi per il fattore V di Leiden (3-5% della popolazione caucasica) e di portatore per la mutazione di protrombina G20210A (2-3% della popolazione caucasica) sono associati per questi motivi ad un rischio di evento trombotico del 30-50% e 15% rispettivamente se in associazione a terapia contraccettiva⁸⁵⁻⁹². In particolare il fattore V di Leiden è rilevato nel 20% dei soggetti con trombosi venosa (TV) e nel 50% di quelli con trombofilia; la presenza di questo fattore è legata ad una mutazione di un sito di clivaggio per l'inattivazione del fattore V per opera dell'APC ed è associata ad rischio trombotico di circa 5-8 volte superiore nello stato di eterozigosi e di 50-100 volte in omozigosi.

Anche la familiarità per trombofilia, che si configura come un deficit di inibitori naturali della coagulazione quali proteina S, C e Antitrombina, anticipa il rischio di evento trombotico severo con un'incidenza 10 volte superiore rispetto alla popolazione generale⁹³⁻⁹⁶. Si tratta tuttavia di difetti presenti in meno dell'1% della popolazione (deficit di antitrombina 1: 5000). Nei soggetti con trombofilia si è rilevato un rischio di incorrere in evento trombotico nei primi sei mesi di terapia di 19 volte superiore rispetto ai controlli senza trombofilia⁷⁸⁻⁸⁰. Tale evidenza è utile per l'orientamento diagnostico in quanto un evento precoce durante terapia sostitutiva potrebbe indicare la presenza di un difetto coagulativo congenito.

Un altro fattore di rischio congenito per trombosi venosa è la positività agli anticorpi antifosfolipidi; nell'ambito di una popolazione con precedente evento trombotico la positività degli anticorpi *lupus anticoagulant* (LAC) è stata rilevata nel 3.1% dei casi con un OR di 3.6 rispetto ai controlli. In caso di rilievo degli anticorpi anti $\beta 2$ glicoproteina I, l'OR saliva a 10⁹⁷.

Secondo recenti studi anche i gruppi sanguigni non 0 sarebbero associati ad un rischio 2-4 volte maggiore di TV rispetto al gruppo ematico 0: tale effetto è attribuito ai maggiori livelli di fattore di Von Willerbrand e conseguentemente di fattore VIII presente nei gruppi non 0^{82,98}.

L'iperomocisteinemia (>18 $\mu\text{mol/L}$) raddoppia il rischio trombotico e, secondo uno studio prospettico, un incremento di 5 $\mu\text{mol/L}$ sarebbe correlato ad un rischio trombotico di 27 volte superiore. Livelli aumentati di omocisteina sono presenti nel 5-10 % della popolazione generale^{99,100} e sono solitamente secondari a deficit di vitamine B6, B12 e di folati, mentre raramente sono congeniti: tra questi vi è una variante genica della metilendidrofolato reduttasi (MTHFR C677T), implicata nel metabolismo dell'omocisteina¹⁰¹. Lo stato di omozigosi per questa mutazione è diffuso nella popolazione generale (10%) e si associa ad elevazione modesta dell'aminoacido; inoltre soggetti omozigoti per la variante 677T presentano un rischio di TV 16-20% maggiore rispetto ad un'altra variante della MTHFR, la 677CC¹⁰².

Anche l'obesità infine costituisce un importante agente di rischio per eventi trombotici: a partire da un BMI > 25 kg/m² questo rischio raddoppia e, in associazione all'uso di contraccettivi, decuplica¹⁰³.

Da quando si è iniziato ad impiegare gli estrogeni a scopi contraccettivi, si è assistito ad un progressivo decremento degli eventi trombotici, secondario ad una progressiva riduzione della dose ormonale impiegata (150 µg-50-30 µg). Nella donna adulta l'incidenza di evento è tuttavia 2-4 volte superiore nelle donne in terapia rispetto alle donne non in contraccezione⁸⁰. Il rischio assoluto di evento trombotico in corso di contraccezione è inferiore a 1/10.000 donne/anno in età fertile ed è massimo durante il primo anno di utilizzo con un rischio assoluto di 12/10.000 donne/anno.⁸⁵ L'effetto è immediato, reversibile senza "effetto durata".

Per quanto riguarda la componente progestinica dei farmaci anticoncezionali, nel corso degli anni sono stati utilizzati diversi progestinici che hanno condotto alla definizione di contraccettivi di prima (anni '60), seconda (anni '70) e terza generazione (anni '80 in Europa, anni '90 in USA)¹⁰⁴. Solo due progestinici non rientrano in tale classificazione: il ciproterone acetato, antiandrogeno, e il drospirenone, ad effetto antiandrogeno ed anti-aldosterone. I progestinici non hanno azione diretta sulla coagulazione sebbene l'effetto procoagulante sembra essere amplificato nella più recente generazione per un minor compenso protrombotico estrogenico.

Per quanto riguarda l'uso di estroprogestinici nel contesto di una terapia ormonale sostitutiva, analogamente alla terapia contraccettiva, il rischio trombotico è maggiore in presenza di obesità, età più avanzata, fattore V di Leiden ed alti dosaggi di fattore IX⁷⁸⁻⁸⁰. Il rischio di trombosi è inoltre elevato a breve termine dall'inizio della terapia attuata, mentre in caso di precedente evento trombotico il rischio di ricorrenza è dell'8.5%/anno¹⁰⁵.

Dal punto di vista della via di somministrazione poi, la formula orale è sempre stata sicuramente quella più utilizzata dalle giovani donne per diffusione, accettabilità, efficacia contraccettiva, e inizialmente è stata associata ad un minor rischio di eventi tromboembolici rispetto alla formulazione transdermica.

A tal proposito è stato pubblicato nel 2006 uno studio caso-controllo (n = 68 casi - 266 controlli) in una popolazione di 15-44 anni (40% tra 15-29 anni, 38% tra 30-39 anni e 22% tra 40-44 anni) trattata con patches (0.75 mg EE e 6 mg norelgestromin, equivalente al rilascio di 20 mcg di EE e 150 mcg di norelgestromil in 24 ore) oppure 35 mcg di EE e norgestimato orale (51). L'Odds Ratio tra i due gruppi è risultato 0.9 con un'incidenza di eventi pari a 52.8 : 100.000 anni di terapia transdermica e di 41,8 : 100.000 anni di terapia orale. Il rischio di evento tromboembolico è risultato dunque simile nei due gruppi posti a confronto.

In una revisione sistematica del 2022²⁰, tuttavia, dall'analisi dei dati provenienti da dieci studi condotti tra il 1996 e il 2019, di cui sette erano studi caso-controllo e tre erano studi di coorte, emergono evidenze in contrasto con quanto affermato in passato. Otto di questi autori hanno infatti osservato come la terapia transdermica costituisca una scelta più sicura, specialmente in donne con fattori di rischio quali fattore V di Leiden e protrombina G20210A, nelle quali Straczek et al. hanno individuato un incremento dell'OR per VTE maggiore per la via orale rispetto a quella transdermica⁵⁵. Nella pubblicazione di Scarabin et al.⁵¹, il rischio relativo (RR) con terapia transdermica è risultato di 0.9 (95% CI 0.5-1.6) e di 3.5 (95% CI 1.8-6.8) con terapia orale, mentre in una metanalisi del 2008⁵² è stato riportato un OR per VTE di 1.2 (95% CI 0.9-1.7) e 2.5 (95% CI 1.9-3.4) rispettivamente per terapia transdermica e orale, confermando la superiorità della terapia con patches, in accordo con altre metanalisi successive quali quella di Mohammed et al. del 2015⁴⁸ e quella di Rovinski et al. del 2018¹⁰⁶; secondo un altro studio inoltre, il rischio per VTE aumenta per alti dosaggi di O-HRT, mentre ciò non avviene per alti dosaggi TD⁵³. Sembra inoltre che l'associazione di E2 orale con MPA sia correlata al maggior rischio (OR 2.10, CI 1.92-2.31), mentre con diidrosterone al minor rischio (OR 1.18, 0.98-1.42) e fra i tipi di estrogeni che l'estradiolo comporti un minor rischio rispetto ai CEE orali (OR 0.93 95% CI, 0.87-1.01)⁵⁴.

Infine, Noteworthy et al. mostrano come la terapia ormonale sostitutiva orale comporti un aumento del rischio di VTE in pz con mutazioni protrombotiche di 25 volte rispetto ai non utilizzatori, mentre come la forma transdermica lo aumenti di sole 4 volte^{52,55}.

Come evidenziato in questa *systematic review* dunque, e in accordo con numerose altre revisioni di letteratura pubblicate negli anni successivi^{4,5,12,16}, appare una netta superiorità in termini di sicurezza sotto il profilo tromboembolico per la terapia con patches rispetto alla terapia orale; la spiegazione di ciò sta probabilmente e soprattutto nella diversa cinetica che questi due tipi di vie di somministrazione hanno, che comporta un rilevante

effetto di primo passaggio epatico, con conseguente stimolo procoagulante, per la terapia per os, effetto che non si verifica invece con la formulazione transdermica.

4.7 Effetti sul metabolismo lipidico e glucidico

Diversi lavori in letteratura osservano come la terapia ormonale sostitutiva porti in generale ad una diminuzione dei valori ematici di LDL, a prescindere dalla via di somministrazione utilizzata²⁰, anche se alcuni studi hanno evidenziato una riduzione non significativa di queste in pazienti in terapia transdermica. Nei pazienti in terapia orale si è riscontrato un effetto positivo di aumento delle HDL, accompagnato però anche da un aumento dei trigliceridi, mentre per la terapia transdermica non è risultato significativo l'innalzamento dei livelli di HDL ma significativa è stata la riduzione di trigliceridi in circolo nei pazienti in studio⁹⁸⁻¹⁰¹. Secondo una revisione di letteratura del 2022 invece⁴ le due vie di somministrazione appaiono simili in merito ad effetti su metabolismo lipidico, glucidico, tolleranza insulinica e turnover proteico, pur essendo il fegato esposto a più elevati livelli di estrogeni con terapia orale, mentre altre fonti riscontrano come la terapia transdermica, grazie al suo mancato metabolismo epatico, non influenzi il metabolismo lipidico né l'insulino-resistenza^{16,65}; non esistono quindi dati concordanti a tal proposito.

Per quanto riguarda il rischio di diabete, in uno studio di comparazione fra le due terapie sugli effetti dell'HRT⁶⁰ si è osservata poi una rilevante riduzione di questo rischio, maggiore con terapia per os rispetto a quella transdermica, indicando una possibile maggiore tollerabilità della prima sotto questo punto di vista. Tale lavoro non ha tenuto però conto dell'impatto della componente progestinica, che le pazienti in osservazione assumevano in associazione agli estrogeni, sul metabolismo carboidratico. Questo potrebbe costituire un importante bias, alla luce anche del fatto che, secondo uno studio di popolazione condotto in Svezia, esisterebbe un impatto negativo di MPA e levonorgestrel sulla tolleranza al glucosio e l'insulino resistenza⁶¹. Non vi sono dunque ad oggi chiare indicazioni di superiorità di un trattamento rispetto agli altri per quanto riguarda l'effetto sul metabolismo degli zuccheri, per quanto si sia riscontrata una riduzione dell'emoglobina glicata⁶⁰ nonché dell'insulino resistenza in donne non diabetiche, con entrambe le vie.

Sempre dalla letteratura, si evidenzia un incremento della massa grassa¹⁰⁷, una riduzione della massa magra¹⁰⁸ e una diminuzione dell'ossidazione lipidica nelle donne trattate per via orale rispetto a quelle trattate per via transdermica. L'interazione degli estrogeni orali infatti con l'asse GH-IGF1 e la funzione epatica determinerebbero un incremento di peso

valutato di un kg in sei mesi dall'inizio della terapia sostitutiva.^{99,100} Ciò non avverrebbe invece con la terapia transdermica che, risparmiando il fegato dalla sovraesposizione agli estrogeni, non andrebbe ad influenzare l'asse GH-IGF1 portando ad un miglioramento della composizione massa corporea, osservato in ragazze con Turner Syndrome in uno studio clinico osservazionale su 88 pazienti¹².

Nello studio di sorveglianza post-marketing estrapolato dal KIMS¹⁰⁷, database relativo alle pazienti in terapia con ormone della crescita (GH), sono state confrontate 313 donne con normale funzione ovarica (età media 37,8 anni) e 315 donne in terapia sostitutiva estrogenica (età media 36.7 anni), di cui il 14% (n=44) in terapia transdermica, l'86% (n=271) in terapia orale e il 30% con etinil estradiolo. Dopo un anno di studio si è dimostrato un incremento significativo (P=0.022) del rapporto circonferenza vita/fianchi nelle donne in terapia orale (0.85) rispetto alle donne in terapia transdermica e a quelle di controllo con normale funzione gonadica (0.83). Tale risultato mostra indirettamente che la terapia sostitutiva estrogenica orale riduce l'azione del GH sulla massa grassa. I valori di IGF1 sono risultati di -1.51 SDS, -0.70 SDS, +0.59 SDS e -0.05 rispettivamente nei gruppi trattati con etinil estradiolo, estrogeno valerato, 17β estradiolo transdermico e nel gruppo con normale funzione gonadica. Le donne trattate con etinil estradiolo orale presentavano un valore di IGF1 ridotto che richiedeva un raddoppio della terapia sostitutiva con GH i cui effetti a lungo termine devono essere ancora studiati. Tale correzione terapeutica non era risultata necessaria nei soggetti trattati con estrogeno valerato, estrogeni coniugati e formulazione transdermica. In particolare la concentrazione di IGF-1 nelle donne trattate con "patches" raggiungeva il range terapeutico consigliabile con la dose minore di GH. Per tale motivo questo studio non è a favore all'uso di etinil estradiolo nelle donne con deficit di GH.

4.8 Rischio neoplastico

Per quanto riguarda il rischio di sviluppare una lesione maligna, la letteratura riporta un'incidenza maggiore tra le utilizzatrici di HRT rispetto a quelle che non ne hanno mai fatto uso²⁰; in uno studio di coorte del 2003 è stato evidenziato un RR di 1.66 (95% CI 1.58-1.75, p<0.0001) per le utilizzatrici di HRT rispetto al gruppo di controllo e questo rischio si è dimostrato essere maggiore con O-HRT combinata rispetto alla sola terapia estrogenica (RR 2.00 vs 1.30, p<0,0001)⁶⁶.

In un altro studio osservazionale pubblicato nel 2007 si è rilevata l'incidenza di ospedalizzazione per neoplasia su 73.505 donne residenti in Lombardia a cui era stata prescritta almeno una volta la TOS¹⁰⁵ in un arco di tempo che andava dal 1998 e il 2000; di queste donne, seguite in follow-up fino al 2005, 3687 hanno sviluppato una neoplasia. E' stato poi applicato un modello di rischio proporzionale per stimare l'associazione tra la persistenza cumulativa della TOS e il rischio di cancro alla mammella: rispetto alle donne che hanno assunto TOS per < 6 mesi, quelle esposte per > 2 anni hanno mostrato hazard ratio (HR) di 1,34 (1,13-1,58) per il cancro al seno. Gli HR per il cancro al seno associati all'uso a lungo termine di TOS transdermica e orale erano, rispettivamente, 1,27 (1,07-1,51) e 2,14 (1,43-3,21), dimostrando quindi che l'uso prolungato è effettivamente correlato ad aumentato rischio di tumore al seno, che però potrebbe essere inferiore per la terapia transdermica rispetto all'orale. Sono ad ogni modo necessarie ulteriori indagini per chiarire se sussistano delle differenze fra le vie di somministrazione in questo ambito¹¹⁰, sebbene ad oggi altre vie di somministrazione, come le preparazioni topiche vaginali di estrogeni, sembrano comportare un rischio minore, riducendo ulteriormente l'esposizione sistemica^{68,111}. L'entità del rischio di sviluppare carcinoma mammario è risultata variabile tra gli studi e non è stato dimostrato un cut-off sicuro per la durata della terapia ormonale sostitutiva.

Infine, qualsiasi studio futuro dovrà considerare il ruolo dei progestinici: alcuni lavori suggeriscono infatti un rischio maggiore con HRT contenente progestinici sintetici rispetto a progesterone micronizzato⁶⁷.

Un'altra neoplasia la cui insorgenza sembra essere favorita dalla somministrazione di ormoni sessuali, è il cancro dell'endometrio, il quale in oltre il 90% dei casi si verifica in donne di età superiore ai 50 anni, con un'età mediana alla diagnosi di 63 anni¹¹². Allo stato attuale in realtà non è dimostrato un aumentato rischio di lesioni maligne e pre-maligne endometriali legato alla terapia ormonale sostitutiva, sebbene sia stato confermato che il fattore di rischio principale per il tumore all'endometrio sia l'uso di sola terapia estrogenica sostitutiva in pazienti con utero²⁰.

Per quanto riguarda infine il confronto fra le possibili vie di assunzione, sembra che con la terapia transdermica questo rischio sia comparabile, se non inferiore, rispetto alla terapia per os^{113,114}.

STUDIO

1. RAZIONALE

Le due formulazioni più frequentemente utilizzate (orale o transdermica) hanno entrambe una sicura efficacia clinica, ma a causa delle differenti vie metaboliche utilizzate è possibile che siano caratterizzate da differenti effetti secondari. In particolare si ipotizza che la formulazione transdermica, permetta un migliore guadagno staturale e un minore incremento ponderale (nelle pazienti trattate per amenorrea primaria), mentre si attende un maggiore effetto benefico sulla mineralizzazione ossea (nelle pazienti trattate per amenorrea secondaria).

2. DEFINIZIONI E DIAGNOSI

In questo studio verranno arruolate donne con un quadro di amenorrea primaria o secondaria di origine centrale o periferica (ipogonadismo ipogonadotropo /iperogonadotropo) secondo le definizioni di seguito riportate.

Amenorrea primaria

- Assenza di menarca all'età di 16 anni in presenza di un avvenuto sviluppo mammario (B3-5)
- Assenza di menarca all'età di 14 anni associata ad assenza dello sviluppo mammario (B1)
- Assenza di menarca dopo un lasso di tempo superiore a 4 anni dall'inizio dello sviluppo mammario.

Tale definizioni presentano tuttavia alcuni limiti quando applicate a popolazioni affette da patologie complesse e a rischio di ipogonadismo. L'ausilio di esami di laboratorio e di esami strumentali (ecografia) permette allo stato attuale di anticipare la diagnosi.

In questo studio si considerano appartenenti a tale categoria:

- soggetti con B1 di età superiore a 12 anni affetti da una patologia di base sicuramente associata a ipogonadismo ipo o iperogonadotropo (Tab 1: Fattori di

Rischio) e che non hanno presentato alcun avvio dello sviluppo dei caratteri sessuali secondari (Tanner B1). Tale evenienza dovrà essere documentata a livello biochimico e associato a quadro ecografico di tipo prepubere.

- soggetti di età superiore a 12 anni che hanno presentato arresto dello sviluppo puberale (mancata evoluzione dello stadio puberale secondo Tanner per 12 mesi – o per 3 valutazioni cliniche eseguite a 0, 6 e 12 mesi).

Sono da escludere da questo gruppo (eleggibili per amenorrea secondaria) le pazienti con arresto dello sviluppo puberale o ipogonadismo ipergonadotropo ma velocità di crescita < 2 cm/anno e/o età scheletrica ≥ 14 aa (uno solo dei criteri basta per esclusione)

Tab. 1: Fattori di Rischio per ipogonadismo

ipogonadismo ipergonadotropo	ipogonadismo ipogonadotropo
RT addome o pelvi o spinale o Y invertita (≥ 20 Gy prepubere, ≥ 10 Gy pubere)	CRT ≥ 30 Gy
TBI ≥ 10 Gy	post-chirurgico
Dosi radianti minori se associate ad alchilanti	
Busulfano 600 mg/m ² oppure 16-20 mg/kg	
Ciclofosfamide 200 mg/kg	
Polichemioterapia +/- associata ad alchilanti diversi dai sopracitati: <u>ifosfamide</u> , mostarda azotata, melphalan, lomustina, carmustina), metalli pesanti (cis-carboplatino), procarbazine, chorambucil, thiotepa, dacarbazine, temozolamide a regimi mieloablativi	
Rimozione chirurgica bilaterale ovarica	

Amenorrea secondaria

Scomparsa del flusso mestruale dopo l'avvenuto menarca per un periodo di tempo di almeno 6 mesi.

Diagnosi di ipogonadismo ipogonadotropo

Biochimica: (vedi tab 2)

- valori di FSH ed LH di tipo impubere con rapporto LH/FSH <1
- valori di 17 β estradiolo < 20 pg/ml
- risposta ad LHRH test di tipo impubere (mantenimento di valori di FSH ed LH di tipo impubere con rapporto LH/FSH <1)
- risposta FSH/LH in assenza di clinica suggestiva di sviluppo puberale

In questi casi l'ecografia pelvica è caratterizzata da:

- utero tubulare
- lunghezza 25-35 mm
- spessore <10 mm
- rapporto corpo/cervice ca 1
- volume ovarico (prodotto dei 3 diametri/2) < 2,5 ml

Diagnosi di ipogonadismo ipergonadotropo

Biochimica: (vedi tab 2)

- valori di FSH ed LH elevati, in particolare FSH

In questi casi l'ecografia pelvica è caratterizzata da

- quadro ecografico sovrapponibile a quello descritto per l'ipogonadismo ipogonadotropo
- quadro ecografico variabile a seconda della fase di sviluppo raggiunta

Tab. 2: Range di normalità e kit in uso

Valori di normalità		Valori di normalità del kit in uso		
FSH	basale	1,4 - 9,6 IU/L	Prepubere	0,5 - 3,7 U/L
	fase ovulatoria	2,3 - 21 IU/L	Fase follicolare	3,4 - 10 U/L
	menopausa	34 - 96 IU/L	Metà ciclo	5,7 - 20 U/L
			Fase luteinica	1,9 - 10 U/L
			Menopausa	41 - 124 U/L

LH	basale	0,8 - 26 IU/L	Prepubere	< 1- 4 U/L
	fase ovulatoria	27 - 57 IU/L	Fase follicolare	1,6 - 9,3 U/L
	menopausa	40 - 104 IU/L	Metà ciclo	13,8 - 71,8 U/L
			Fase luteinica	1 - 12,8 U/L
			Menopausa	15 - 64 U/L
17β-estradiolo			Prepubere	0 - 35 pg/ml
			Fase follicolare	35 - 136 pg/ml
			Metà ciclo	142 - 401 pg/ml
			Fase luteinica	30 - 169 pg/ml
			Menopausa	0 - 24 pg/ml

3. OBIETTIVI

Confrontare gli effetti di due modalità di terapia sostitutiva estro-progestinica in adolescenti affette da ipogonadismo (ipogonadotropo o ipergonadotropo) precedentemente trattate con chemio e/o radioterapia antiproliferativa.

Obiettivi primari

Poiché le pazienti eleggibili per lo studio possono essere arruolate durante differenti fasi del loro sviluppo puberale, si devono distinguere obiettivi primari differenti a seconda del momento in cui la terapia sostitutiva verrà avviata. In particolare si vuole dimostrare nel gruppo trattato con terapia transdermica rispetto a quello in terapia orale:

- In bambine in amenorrea primaria: un migliore accrescimento staturale-ponderale.
- In ragazze in amenorrea secondaria: un incremento della mineralizzazione ossea.

Obiettivi secondari

Verranno inoltre valutati eventuali differenti effetti nei due gruppi di trattamento su:

- Metabolismo epatico
- Metabolismo osseo
- Asse GH-IGF1-IGFBP-3
- Metabolismo lipidico
- Metabolismo glucidico
- Fattori di rischio cardio-vascolari
- Parametri uterotropi
- Composizione corporea (BMI, rapporto circonferenza vita/fianchi).

4. MATERIALI E METODI

4.1 Disegno dello studio

MOMA 001 è uno studio prospettico randomizzato a due braccia stratificato per tipo amenorrea, malattia di base e/o trattamento (tumori SNC, altri tumori, trattamento con TBI o busulfano) bilanciato, non proporzionale.

La randomizzazione verrà effettuata centralmente a gruppi di 4

Condizione:

- Amenorrea primaria
- Amenorrea secondaria

Malattia di base:

- Tumori SNC, non TBI o busulfano non radioterapia cranio-spinale
- Tumori SNC, non TBI o busulfano si radioterapia cranio-spinale
- Altri tumori, non TBI o busulfano non radioterapia cranio-spinale
- Altri tumori, non TBI o busulfano si radioterapia cranio-spinale
- Trattamento con TBI o busulfano non radioterapia cranio-spinale
- Trattamento con TBI o busulfano si radioterapia cranio-spinale

Randomizzazione:

- Terapia estrogenica orale
- Terapia estrogenica transdermica

4.2 Criteri di eleggibilità

Criteri di inclusione

- Donne di età > 12 anni e < 25 anni trattate in età pediatrica con chirurgia, chemio o radioterapia antiproliferativa che successivamente hanno sviluppato un quadro di ipogonadismo iper o ipogonadotropo.

Le donne con difetto di GH associato saranno considerate ancora eleggibili purchè trattate alla dose di 0.028-0.030 mg/kg/ die s.c. prima del raggiungimento dell'altezza definitiva (velocità di crescita < 1-2 cm/anno nell'ultimo anno dopo l'esaurimento dello spurt puberale), oppure giovani adulte trattate alle dose 0.5-1.5 mg/die s.c. e con valore di IGF-I tra 0 e 2 SDS.

Anche pazienti con deficit ormonali multipli sono eleggibili purchè "Compliant" per le specifiche terapie sostitutive.

- Vergini da terapia estro progestinica sostitutiva
- Soggetti con almeno 1 mese di "wash out" da precedente terapia eseguita per almeno 24 mesi, trattati per amenorrea primaria (da considerare eleggibili nel gruppo per amenorrea secondaria).
- Soggetti con almeno 1 mese di "wash out" da precedente terapia eseguita meno di 24 mesi, trattati per amenorrea secondaria (da considerare eleggibili nel gruppo per amenorrea secondaria)
- Accettazione dello studio e firma del consenso informato

Criteria di esclusione

- Pazienti ancora in trattamento chemio o radioterapico o fuori terapia da meno di 6 mesi
- Pazienti con patologie cromosomiche costituzionali associate (ad es. Down, Turner, Fanconi)
- Pazienti in terapia sostitutiva da < 24 mesi (se amenorrea primaria)
- Pazienti che richiedono di utilizzare trattamento estroprogestinico a scopo contraccettivo dopo un periodo di trattamento <24 mesi
- Pazienti affetti da GVHD cutanea cronica estesa di tipo sclerodermico

4.3 Valutazione della risposta

In bambine con amenorrea primaria (AP)

A causa della prevedibile bassa numerosità del campione in studio, si è deciso di utilizzare una misura combinata che tenga in considerazione la velocità di crescita staturale/annua e l'incremento ponderale/annuo.

La valutazione verrà eseguita a +24 e + 48 mesi dall'avvio del trattamento sostitutivo. e utilizzerà misure differenti nei primi 24 mesi rispetto ai successivi 24 dall'inizio della terapia sostitutiva. In particolare:

- Nei primi 24 mesi (0 – 24): Utilizzando dati relativi alle curve della velocità di crescita adottate a livello internazionale (Tanner) si è creata una tabella (Tab. 3) nella quale vengono definite come successo (+ o ++) o insuccesso (-) le possibili combinazioni dei due parametri auxologici considerati, entrambi definiti come riportato nella successiva tabella da valutare alla fine dei 2 anni di trattamento.

Tab.3: Definizioni di successo o insuccesso in base ai parametri considerati nel T 0-24 per AP

		Crescita in altezza (cm/anno) nei primi due anni di trattamento		
		< 6.5	≥ 6.5-7.49	≥ 7.5
Crescita in peso (Kg/anno)	≥ 7	-	-	++
	6.5-6.99	-	+	++
	≤ 6.5	-	++	++

- Nei secondi 24 mesi (25-48): si valuterà solo l'incremento staturale/anno ove sarà considerato successo quello (Tab. 4):

Tab.4: Definizioni di successo o insuccesso in base ai parametri considerati nel T 24-48 per AP

Crescita in cm altezza/anno	
<2	> 2
-	+

La valutazione globale della risposta al trattamento verrà effettuata al mese 48 ove, in caso di discordanza nel risultato tra i primi 24 mesi e quelli successivi, verrà considerata come “dominante” la risposta nei primi 24 mesi.

In ragazze con amenorrea secondaria (AS)

Poiché in questo caso, al momento del trattamento l'accrescimento staturale sarà presumibilmente già concluso, si è deciso di considerare per la valutazione del risultato la mineralizzazione ossea a livello lombare misurata mediante DEXA ove verrà considerato successo (due livelli) qualsiasi incremento della stessa (Tab. 5).

Tab.5: Definizioni di successo o insuccesso in base ai parametri considerati per AS

DEXA lombare incremento/24 mesi (gr/cm ²)		
<=0	0.01-0.05	≥0.05
-	+	++

La valutazione globale della risposta al trattamento verrà effettuata al 48 mese ove, in caso di discordanza nel risultato tra i primi 24 mesi e quelli successivi, verrà considerata come “dominante” la risposta nei primi 24 mesi.

4.4 Programma terapeutico

Le modalità della terapia sostitutiva, che variano a seconda della fase puberale e tipo di trattamento, vengono applicate come illustrato nelle Tab. 6 e 7.

Tab.6: Schema di trattamento delle amenorree primarie per via di somministrazione orale (OS) e transdermica (TD)

Amenorrea primaria			
Terapia OS		Terapia TD	
Mesi 0-12	Etinilestradiolo (AMSA) 10 mcg/die alla sera	Mesi 0-6	Dermostril Septem 25: 6,25 µg (1/4 di cerotto) ogni 7 giorni
Mesi 13-24	Etinilestradiolo (AMSA) 20 mcg/die alla sera	Mesi 7-12	Dermostril Septem 25: 12,5 µg (1/2 di cerotto) ogni 7 giorni
Mesi	Etinilestradiolo (AMSA) 30	Mesi	Dermostril Septem 25: 25 µg (1

25-48	mcg/die alla sera dal giorno 5 per 21 giorni Provera 5 mg/die per os dall'11° al 21° giorno del ciclo che potrà essere aumentato a 10 mg	13-24	cerotto) ogni 7 giorni
		Mesi 25-24	Dermestril Septem 25: 25 µg (1 cerotto) ogni 7 giorni giorni ciclico (dal 1° al 21° giorno) Provera 5 mg/die per os dall'11° al 21° giorno del ciclo che potrà essere aumentato a 10 mg

Tab.7: Schema di trattamento delle amenorree secondarie per via di somministrazione orale (OS) e transdermica (TD)

Amenorrea secondaria	
Terapia OS	Terapia TD
Etinilestradiolo (AMSA) 30 mcg/die alla sera dal 1° al 21° giorno. Provera 5 mg/die per os dall'11° al 21° giorno del ciclo che potrà essere aumentato a 10 mg	Dermestril Septem 50: 50 µg (1 cerotto da 25 per 3 mesi poi 1 cerotto da 50 µg) ogni 7 giorni dal 1° al 21° giorno. Provera 5 mg/die per os dall'11° al 21° giorno del ciclo che potrà essere aumentato a 10 mg

4.5 Monitoraggio e sospensione terapia

Le pazienti verranno monitorate mediamente ogni 6 mesi per tutta la durata dello studio eseguendo valutazioni comunque richieste nell'ambito di una buona pratica clinica. Alcuni esami a scopo di ricerca non prevedono comunque un carico al paziente (eccetto che per un lieve aumento della quantità di sangue prelevata in occasione del controllo clinico).

Il monitoraggio delle pazienti si compone dunque di: 1) anamnesi volta ad indagare lo stato di benessere e la presenza di eventuali disturbi aggiuntivi, la terapia in atto e la

compliance a questa; 2) esame obiettivo fisico valutante il peso, la statura misurata in cm ed SDS, il BMI calcolato in kg/mq e in SDS, la velocità di crescita in cm/anno ed SDS, il target genetico in cm ed SDS, la circonferenza vita e fianchi in cm e il rapporto fra queste due, lo stadio B secondo Tanner, i valori di pressione sistolica e diastolica, la frequenza cardiaca; 3) esami ematochimici comprendenti il profilo epatico, il metabolismo lipidico e glucidico, l'assetto coagulativo, gli elettroliti, il metabolismo osseo, il dosaggio ormonale; 4) ecografia pelvica valutante il rapporto corpo/collo, i diametri di utero e ovaie, lo spessore endometriale, il numero di follicoli e il diametro medio follicolare; 5) densitometria ossea (DXA) per quantificare la mineralizzazione ossea tramite lo z-score a livello lombare e femorale; 6) radiografia del carpo (eseguita una volta l'anno) nelle pazienti con amenorrea primaria, per valutare la progressione dell'età scheletrica.

N.B. In caso di evento trombo-embolico vedere allegato di comportamento.

La terapia estro progestinica sarà sospesa nei soggetti con ipogonadismo ipergonadotropo dopo 4 anni e rivalutati a distanza di 6 -12 mesi.

Amenorrea primaria

	Tempo (mesi)							
	0	6	12	24	30	36	42	48
Clinica:								
peso								
altezza								
BMI	*	*	*	*	*	*	*	*
circonferenza								
vita/fianchi								
pressione								
arteriosa								
frequenza								
cardiaca								
stadio puberale								
Biochimica								
Funzione epatica								
GOT	*	*	*	*	*	*	*	*
GPT GGT	*	*	*	*	*	*	*	*
fosfatasi alcalina								
profilo lipidico								
colesterolo totale,								
HDL	*	*	*	*	*	*	*	*
LDL								
trigliceridi								

rischio cardio-vascolare APC resistance Prot C Prot S D dimero Fibrinogeno PT aPTT lupus anticoagulant anti- fosfolipidi Fattore VIII VWF:Ag Frammenti di proteolisi VWF test generazione trombina: F1+2 – TAT	*	*	*	*	*	*	*	*
metabolismo osseo fosfatasi alcalina ossea Ctx (stoccare 2ml e conservare a - 20°C) calcio fosforo	*	*	*	*	*	*	*	*
metabolismo glucidico insulina glicemia OGTT (Homa) ogni 12 mesi	*	*	*	*	*	*	*	*
asse ipofisario LH FSH 17 beta estradiolo FT4, TSH IGF1, IGFBP-3 predittori di menopausa precoce inibina B ormone antimulleriano	*	*	*	*	*	*	*	*
Ecografia pelvica rapporto corpo/collo misura endometrio tre diametri di ovaie e utero (volume) numero di follicoli massimo diametro medio follicolare Valutazione media dei 2 follicoli maggiori per ovaio	*	*	*	*	*	*	*	*
Rx carpo (età scheletrica) una volta l'anno	*	*	*	*	*	*	*	*

Amenorrea secondaria

	Tempo (mesi)							
	0	6	12	24	30	36	48	60

Clinica: peso altezza BMI circonferenza vita/fianchi pressione arteriosa frequenza cardiaca stadio puberale	*	*	*	*	*	*	*	*
Biochimica								
Funzione epatica GOT GPT GGT fosfatasi alcalina	*	*	*	*	*	*	*	*
profilo lipidico colesterolo totale, HDL LDL trigliceridi	*	*	*	*	*	*	*	*
rischio cardio-vascolare APC resistance Prot C Prot S D dimero Fibrinogeno PT aPTT lupus anticoagulant anti-fosfolipidi Fattore VIII VWF:Ag Frammenti di proteolisi VWF test generazione trombina: F 1+2 – TAT – altri?	*	*	*	*	*	*	*	*
metabolismo osseo fosfatasi alcalina ossea Ctx (stoccare 2ml e conservare a -20°C) calcio fosforo	*	*	*	*	*	*	*	*
metabolismo glucidico insulina glicemia OGTT (Homa) ogni 12 mesi	*	*	*	*	*	*	*	*
asse ipofisario LH	*	*	*	*	*	*	*	*
FSH 17 beta estradiolo FT4, TSH IGF1, IGFBP-3 (stoccare, quantità) predittori di menopausa precoce inibina B ormone antimulleriano								

Ecografia pelvica rapporto corpo/collo misura endometrio tre diametri di ovaie e utero (volume) numero di follicoli massimo diametro medio follicolare Valutazione media dei 2 follicoli maggiori per ovaio	*		*		*	*	*	*
DEXA BMD Z score lombare	*		*	*		*	*	*

4.6 Analisi statistica

Randomizzazione

La randomizzazione verrà effettuata centralmente e sarà effettuata separatamente per tipo di amenorrea (primaria o secondaria), stratificata per patologia di base o trattamenti subiti, e bilanciata a gruppi di 4.

Analisi dei risultati

Verrà effettuata inizialmente una descrizione dei pazienti al momento basale (T0) e verranno effettuate le usuali statistiche descrittive: i dati quantitativi (es. peso, altezza, BMI SDS) verranno sintetizzati in termini di medie e deviazioni standard (DS); in caso di distribuzioni asimmetriche verranno riportate le mediane e i valori minimo e massimo. I dati qualitativi (tipo di tumore, ecc.) verranno riportati in termini di frequenze assolute e percentuali.

Il confronto del risultato dell'obiettivo principale (percentuale di soggetti con outcome primario raggiunto al tempo finale, t_{24}) nei 2 gruppi in studio verrà effettuato mediante test chiquadrato o mediante test Esatto di Fisher in caso di frequenze attese < 5 . Gli stessi test statistici verranno utilizzati anche per i confronti delle altre variabili di tipo qualitativo fra i gruppi in studio.

Le percentuali di successo verranno valutate aggregando inizialmente tutti i tipi di risposta positiva (+ o ++); successivamente verrà effettuata anche un'analisi in cui le risposte positive verranno valutate separatamente (- vs. + vs. ++). La valutazione globale della risposta al trattamento verrà effettuata al 48 mese ove, in caso di

discordanza nel risultato tra i primi 24 mesi e quelli successivi, verrà considerata come “dominante” la risposta nei primi 24 mesi.

Le analisi verranno effettuate al tempo finale (t_{24}) e non verranno effettuate analisi ad interim.

Verranno effettuati i confronti dei dati quantitativi fra i 2 gruppi in trattamento e ai vari tempi di osservazione mediante analisi della varianza (ANOVA) per misure ripetute parametrica oppure non parametrica (test di Friedman). Per i confronti a posteriori dopo l'ANOVA verrà utilizzato il test di Scheffé o in caso di analisi non parametrica verrà utilizzato il test di StudentNewman-Keuls / test ANOVA per misure ripetute non parametriche unpaired T-test.

Tutti i test utilizzati saranno a 2 code e verrà considerato significativo un valore di P inferiore a 0,05. Per le analisi statistiche verrà utilizzato il software “Statistica” (versione 6, StatSoft Inc., Tulsa, OK, USA) ed il software “Stata” (versione 7, College Station, TX, USA).

Numerosità campionaria e potenza dello studio

Un calcolo della numerosità necessaria è stato effettuato sulla base dell'obiettivo principale (vedi pag 8). Si è ipotizzato che la percentuale di soggetti con amenorrea primaria nel gruppo con terapia standard (orale) in grado di raggiungere l'outcome si aggiri intorno al 35% (cioè soddisfacente incremento staturale con non eccessivo incremento ponderale), mentre nel gruppo in trattamento con terapia transdermica la percentuale di soggetti in grado di raggiungere l'outcome principale possa arrivare all'75%; ipotizzando un errore di 0,05 e una potenza dell'80% (errore = 0,02), il numero di pazienti necessarie in ogni gruppo risulta pari a 20 soggetti.

% successo		# pazienti per gruppo
gruppo orale	gruppo sperimentale	
30	55	58
30	60	40
30	70	21
35	65	40

35	75	20
35	70	28
40	75	28
40	80	20

Un calcolo della numerosità necessaria è stato effettuato sulla base dell'obiettivo principale anche per quanto riguarda le ragazze con amenorrea secondaria (vedi pag 8). Si è ipotizzato che la percentuale di soggetti nel gruppo con terapia standard (orale) in grado di raggiungere l'outcome (miglioramento della DEXA) si aggiri intorno al 10%, mentre nel gruppo in trattamento con terapia transdermica la percentuale di soggetti in grado di raggiungere l'outcome principale possa arrivare all'60%; ipotizzando un errore se di 0,05 e una potenza dell'80% (errore se = 0.02), il numero di pazienti necessarie in ogni gruppo risulta pari a 10 soggetti.

% successo		# pazienti per gruppo
gruppo orale	gruppo sperimentale	
10	60	10
10	75	5

5. RISULTATI

5.1 Popolazione in studio

In totale al Giugno 2023 complessivamente 21 pazienti su 56 con storia neoplastica cerebrale o non cerebrale hanno aderito allo studio (Casi). A causa dell'impossibilità di raggiungere la potenza numerica di soggetti randomizzati si è incluso in seguito un gruppo di pazienti che non sono stati randomizzati (controlli) trattato con analoghi schemi terapeutici (n = 35). In entrambi i gruppi erano comprese pazienti affette da amenorrea primaria (AP, n = 38) o amenorrea secondaria (AS, n = 18), con ipogonadismo ipergonadotropo (n = 38) o ipogonadotropo (n = 18), con eventualmente associato un difetto di GH (GHD, n = 26) e che avevano assunto terapia estroprogestinica per via orale (n = 21) o transdermica (n = 35).

I deficit ormonali in queste pazienti erano l'esito di un danno ipotalamo-ipofisario secondario alla patologia neoplastica primitiva oppure al trattamento antiblastico a cui erano state sottoposte successivamente, che poteva essere radioterapia craniospinale (CRT, n = 25), irradiazione total body (TBI, n = 5), radioterapia di altro tipo (n = 15) oppure chemioterapia con somministrazione di ciclofosfamide (n = 18), ifosfamide (n = 14), busulfano (n = 15) o altri antineoplastici (n = 17).

Le pazienti sono state valutate ogni 6 mesi per un periodo massimo di 4 anni, configurando un numero complessivo di 457 valutazioni. Tra i Casi, una sola paziente non ha completato il follow-up (drop-out per decesso), mentre le altre 20 pazienti sono state seguite fino a 48 mesi. Di queste, n = 12 erano state randomizzate a trattamento per via orale e n = 6 per via transdermica; in ciascuno dei due sottogruppi una paziente ha scelto in corso di terapia di passare all'altra formulazione, uscendo quindi dalla randomizzazione ed entrando a far parte del gruppo dei Controlli. Per il gruppo dei Casi vi sono quindi 18 visite al T48, mentre nel gruppo dei Controlli le visite al T48 sono 31, incluse le due pazienti che sono uscite dalla randomizzazione in corso di terapia. Fra i Controlli, dunque, n = 6 pazienti non hanno ancora concluso il follow-up arrivando in due casi ai 36, in un caso ai 30 mesi, in uno ai 24, in un altro ancora ai 18 mesi, mentre in un caso solo la paziente ha terminato il follow-up a 42 mesi.

In questa tesi si è scelto di porre un focus sull'analisi della corte di pazienti con amenorrea primaria (AP), di cui n = 13 erano state arruolate (Casi) mentre n = 25 pazienti erano Controlli.

All'interno del gruppo di pazienti randomizzate, n = 2 pazienti presentavano ipogonadismo ipogonadotropo mentre n = 11 pazienti presentavano ipogonadismo ipergonadotropo. Nel gruppo dei controlli invece n = 10 pazienti presentavano ipogonadismo ipogonadotropo mentre n = 15 presentavano ipogonadismo ipergonadotropo. Nel totale delle pazienti, n = 24 soggetti presentavano deficit ormonali aggiuntivi, di cui n = 20 comprendevano deficit di ormone della crescita, mentre 14 pazienti presentavano ipogonadismo isolato. Il GHD era presente all'interno della corte dei Casi in n = 4 soggetti e nella corte di Controlli in n = 16 soggetti.

Nella corte delle pazienti arruolate, le diagnosi primarie di tumori del SNC erano n = 4, mentre n = 9 erano tumori non appartenenti al SNC; nel gruppo dei Controlli invece tumori del SNC erano presenti in n = 20 pazienti, mentre solo 5 pazienti presentavano tumori non SNC.

Per quanto riguarda il tipo di terapia estrogenica sostitutiva assunta, infine, nel braccio dei Casi l'esito della randomizzazione ha portato n = 8 pazienti ad assumere terapia orale (OS) e n = 5 pazienti ad assumere a transdermica (TD); fra i Controlli invece, la formulazione orale è stata scelta per n = 4 pazienti, che però a 12 mesi (T12) risultavano in numero di 5 poiché una delle pazienti trattate per scelta autonoma o medica con terapia transdermica ha scelto di passare a quella orale in merito a facile distacco del cerotto, uscendo così dalla randomizzazione; lo stesso è avvenuto per una delle pazienti arruolate per terapia per os che ha scelto di passare alla formulazione TD, determinando un aumento del numero dei Controlli in terapia transdermica da 21 (T0) a 22 (T36).

Tab.8: Corte in studio: soggetti randomizzati e controlli con AP distribuiti in base a tipologia di ipogonadismo, presenza di GHD e di terapia estroprogestinica somministrata

	Tipo ipogonadismo	GHD	Terapia	
			OS	TD
Casi (n = 13)	Ipergonadotropo	NO	n = 5	n = 4
		SI	n = 2	n = 0
	ipogonadotropo	NO	n = 0	n = 0
		SI	n = 1	n = 1
Controlli (n = 25)	Ipergonadotropo	NO	n = 0	n = 6
		SI	n = 2	n = 7

	ipogonadotropo	NO	n = 0	n = 3
		SI	n = 2	n = 5

Tab.9: caratteristiche basali della corte in studio: pazienti randomizzati vs non randomizzati ($^{\circ}P=0,05$; $*P=<0,05$; $**P=<0,01$)

	Randomizzati (n = 13)	Non randomizzati (n = 25)
	Mediana (IQR 25-75 percentile)	
Età (anni)	12,9 (12,4 - 13,7)	13,7 (12,7-14,8)
Altezza SDS	-1,1 (-2,3 - -0,8)	-1,4 (-2,6 - -0,6)
BMI SDS	0,4 (-0,1-1,6)	0,8 (-0,2-2)
Velocità di crescita pre-ERT (cm/anno)	4,4 (3,9-4,8)	4,4 (2,1-5,3)
	Numero %	
Ipogonadismo*		
Ipogonadotropo	15% (n = 2)	40% (n = 10)
Ipergonadotropo	85% (n = 11)	60% (n = 15)
Tumore SNC**		
Sì	31% (n = 4)	80% (n = 20)
No	69% (n = 9)	20% (n = 5)
GHD^o		
Sì	31% (n = 4)	64% (n = 16)
No	69% (n = 9)	36% (n = 9)
Tanner		
1	23% (n = 3)	44% (n = 11)
≥ 2	77% (n = 10)	56% (n = 14)
Terapia assunta**		
O	61,5% (n = 8)	16% (n = 4)
TD	38,5% (n = 5)	84% (n = 21)

Tab.10: caratteristiche basali della corte in studio in base al trattamento estrogenico orale vs transdermico

	Orale (n = 12)	Transdermica (n = 26)
	Mediana (IQR 25-75 percentile)	
Età (anni)	13,2 (12,4-13,8)	13,5 (12,7-14,6)
Altezza SDS	-1,5 (-2,4 - -1)	-1,3 (-2,4 - -0,3)
BMI SDS	0,4 (-0,6 - 1,8)	0,7 (-0,5-1,8)
Velocità di crescita (cm/anno)	4,2 (3,1-4,5)	4,5 (2,2-5,9)
	Numero %	
Ipogonadismo		
Ipogonadotropo	25% (n = 3)	34,6% (n = 9)
Ipergonadotropo	75% (n = 9)	65,4% (n = 17)
Tumore SNC		
Sì	58,4% (n = 7)	65,4% (n = 17)
No	41,6% (n = 5)	34,6% (n = 9)
GHD		
Sì	58,4% (n = 7)	50% (n = 13)
No	41,6% (n = 5)	50% (n = 13)
Tanner		
1	41,6% (n = 5)	34,6% (n = 9)
≥ 2	58,4% (n = 7)	65,4% (n = 17)
Randomizzazione		
Sì (casi)	66,7% (n = 8)	19,2% (n = 5)
No (controlli)	33,3% (n = 4)	80,8% (n = 21)

Casi e Controlli non si differenziavano significativamente per età cronologica, sebbene il gruppo dei Controlli risultasse avere mediamente un'età superiore a quella dei Casi; inoltre non vi era differenza significativa all'avvio della TES altezza, BMI o velocità di crescita basale. Un maggior numero di Casi era affetto da tumore non SNC (il 31% dei casi vs 20% dei Controlli), e un minor numero di soggetti presentava GHD (il 31% dei Casi vs 64% dei Controlli); in considerazione della diversa distribuzione di tumori centrali tra Casi e Controlli, un maggior numero di Casi presentava ipogonadismo ipergonadotropo (85% vs 60%). Tra i Casi, 8 soggetti erano stati randomizzati a terapia orale (61,5%), 5 a terapia TD (38,5%). A

seguito di un quadro metabolico più compromesso e di un maggior numero di soggetti affetti da GHD, la maggior parte dei controlli ha scelto autonomamente un trattamento transdermico. Anche distinguendo i pazienti in base al tipo di terapia assunta, i due bracci non si differenziavano significativamente per età cronologica o parametri antropometrici. In proporzione, nel gruppo OS vi era una maggior percentuale di pazienti con GHD rispetto al gruppo TD (58,4% vs 50%); era presente inoltre un minor numero di tumori SNC (58,4% vs 65,4%) e un numero di soggetti con ipogonadismo ipogonadotropo ancora inferiore (25% vs 34,6%). Nel gruppo in terapia per os, infine, la maggior parte delle pazienti era stata randomizzata (66,4% di Casi vs 33,3% di Controlli), mentre la terapia transdermica era stata assegnata prevalentemente per scelta (19,2% di Casi vs 80,8% di Controlli).

In sintesi: casi e controlli non si differenziavano per età, parametri antropometrici e stadio di Tanner ad avvio ERT, mentre erano diversi per tipologia di tumore (centrale maggiormente rappresentato nel gruppo dei controlli), tipologia di ipogonadismo (IPER maggiormente rappresentato nel gruppo dei casi), GHD (maggiormente rappresentato nel gruppo dei controlli), tipo di ERT (TD maggiormente rappresentato nel gruppo dei controlli).

Considerando soggetti in ERT-OS vs ERT-TD questi gruppi risultavano invece bilanciati per tutte le variabili considerate (tabelle 9, 10).

Considerando l'analisi statistica eseguita a priori, la potenza numerica di 20 soggetti per braccio è stata raggiunta solamente per la corte in terapia transdermica ($n = 26$), mentre la corte in terapia orale non ha soddisfatto tale criterio ($n = 12$).

5.2 Obiettivo primario: guadagno staturale nei primi 24 mesi di terapia ERT

In considerazione dell'omogeneità auxologica e di età cronologica tra casi e controlli e del bilanciamento per tutte le variabili principali suddividendo la corte in orale e transdermica, le successive analisi sono state effettuate sul gruppo in toto, differenziando per tipo di terapia somministrata, orale o transdermica.

Dall'esame dei dati raccolti in corso di follow-up nelle pazienti con amenorrea primaria non è emersa alcuna differenza significativa in termini di **statura** espressa in SDS tra soggetti trattati con terapia OS vs TD, a tutti i tempi analizzati. Nonostante si evinca un incremento dell'altezza in SDS nel tempo per entrambi i gruppi, con un guadagno di 0,3 SDS per ERT-OS e di 0,5 per ERT-TD, questo non risulta significativo, mentre è presente una tendenza alla

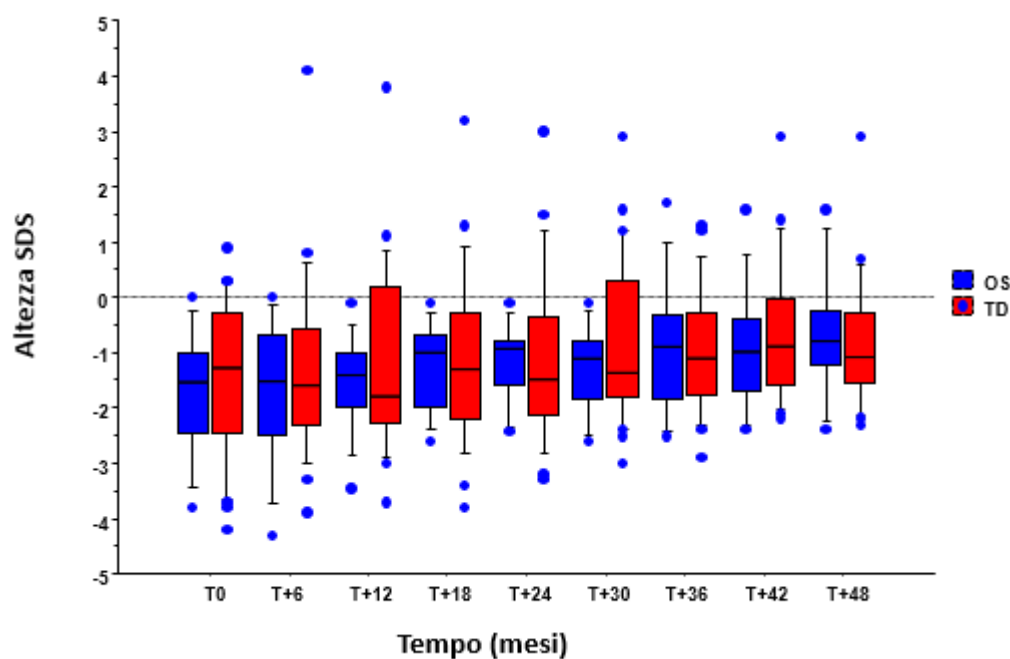
significatività dell'incremento staturale se si considera la corte in toto ($p = 0,09$) (Tab. 11; grafico 1).

Tab. 11: Andamento della statura da T0 a T48 (semestrale) in Femmine con Amenorrea Primaria in TES orale vs TD

		T0	T12	T24	T36	T48	KW
Statura SDS	OS	-1,2 (-2,2--0,3) (n=21)	-1,2 (-2--0,6) (n=22)	-1 (-2,1--0,6) (n=18)	-1 (-2,1--0,4) (n=18)	-0,9 (-1,9--0,1) (n=21)	OS: $p=0,9$ TD: $p=0,4$
	TD	-1,1 (-2,2-0) (n=21)	-1,1 (-2,1-0,2) (n=28)	-1,3 (-1,9-0,2) (n=30)	-0,9 (-1,6-0) (n=30)	-0,6 (-1,5-0) (n=26)	
	MW	$p=0,6$	$p=0,5$	$p=0,8$	$p=0,6$	$p=0,7$	

MW: Significatività di Mann-Whitney (confronto OS vs TD); KW: Significatività di Kruskal-Wallis (confronto temporale all'interno dello stesso gruppo)

Grafico 1: Andamento della statura da T0 a T48 (semestrale) in Femmine con Amenorrea Primaria in TES orale vs TD

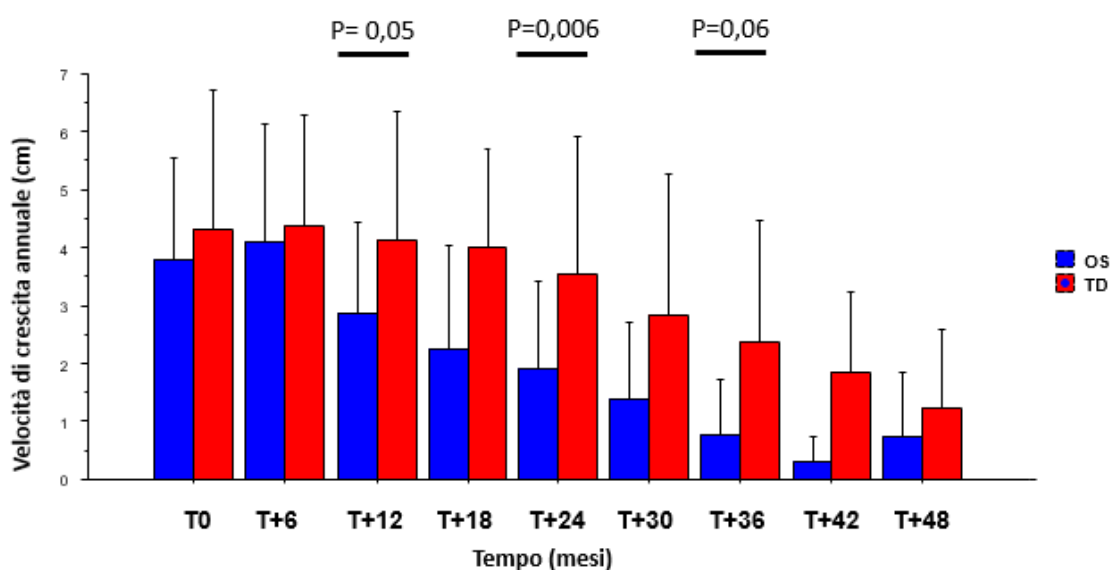


La **velocità di crescita** annuale, valutata da T0 a T48, si riduce significativamente dopo 18 mesi di terapia orale e dopo 30 mesi di terapia transdermica ($p = 0,06$); essa è inoltre significativamente differente nei gruppi OS e TD ai controlli T12 (2 vs 3,7 cm/anno; $p=0,05$), T24 (1,1 vs 2,7 cm/anno; $p=0,006$) e T36 (0,1 vs 1,4 cm/anno; $p=0,06$), risultando maggiore per il gruppo TD (*tab.12; grafico 2*).

Tab. 12: velocità di crescita (VC) annuale da T0 a T48 in femmine con amenorrea primaria in TES orale vs transdermica

		T0	T12	T24	T36	T48
VC cm/anno	OS	4,1 (1,2-4,6) (n=19)	2 (0,7-3,8) (n=20)	1,1 (0-2,4) (n=16)	0,1 (0-1,5) (n=14)	0 (0-0,9) (n=16)
	TD	4,4 (1,8-5,1) (n=31)	3,7 (2,1-5,5) (n=26)	2,7 (1,9-4) (n=27)	1,4 (0,1-3) (n=25)	0,5 (0-1,5) (n=19)
	MW	$p=0,3$	$p=0,05$	$p=0,006$	$p=0,06$	$p=0,2$
VC SDS	OS	-1 (-2,6-1,3)	-0,7 (-2,1-0)	-0,6 (-1,5-0,1)	0 (-1,1-0)	0 (-0,4-0)
	TD	-0,5 (-2-1,4)	0,2 (-0,9-2,6)	0,5 (-1-1,9)	0 (-1,1-1)	0 (-1,2-0)

Grafico 2: velocità di crescita annuale da T0 a T48 in femmine con amenorrea primaria in TES orale vs transdermica (grafico espresso in media ed SDS per una miglior visualizzazione del parametro rispetto a mediana e IQR)



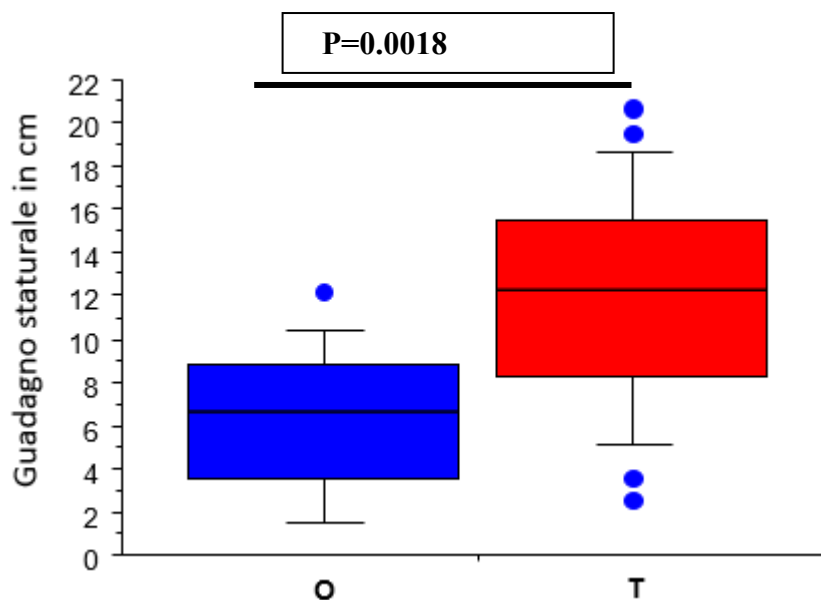
Obiettivo primario dello studio in base alle definizioni di successo o insuccesso in base ai parametri considerati nel T 0-24 era il raggiungimento di $>7,5$ cm/anno nei primi 24 mesi di ERT. Un guadagno $>7,5$ cm a T24 era associato a TD ($p=0.03$, Test Chi quadrato), risultando di 9.1 cm (IQR 6.6-10.3) per ERT-TD e di 5,5 cm (IQR 1.7-7.2) per ERT-OS ($P = 0,006$). Solo 1 soggetto in TD non era valutabile al T24.

La mediana del **guadagno staturale cumulativo**, valutato a 48 mesi, si è confermata significativamente maggiore con la formulazione transdermica rispetto all'orale, risultando di 12,2 cm (IQR 8,2-15,4) per la prima e di 6,6 cm (IQR 3,5-8,8) per la seconda ($P = 0,0018$). Va tuttavia considerata la differenza fra la porzione di casi presenti nella corte TD rispetto a quella OS al tempo + 48 (19,2% vs 66,7%) (Tab. 13; grafico 3).

Tab. 13: Guadagno staturale cumulativo in 48 mesi di TES orale vs transdermica (mediana e IQR)

	OS	TD
	6,6 (3,5-8,8)	12,2 (8,2-15,4)
	(n=12)	(n=20)

Grafico 3: Guadagno staturale cumulativo in 48 mesi di TES orale vs transdermica

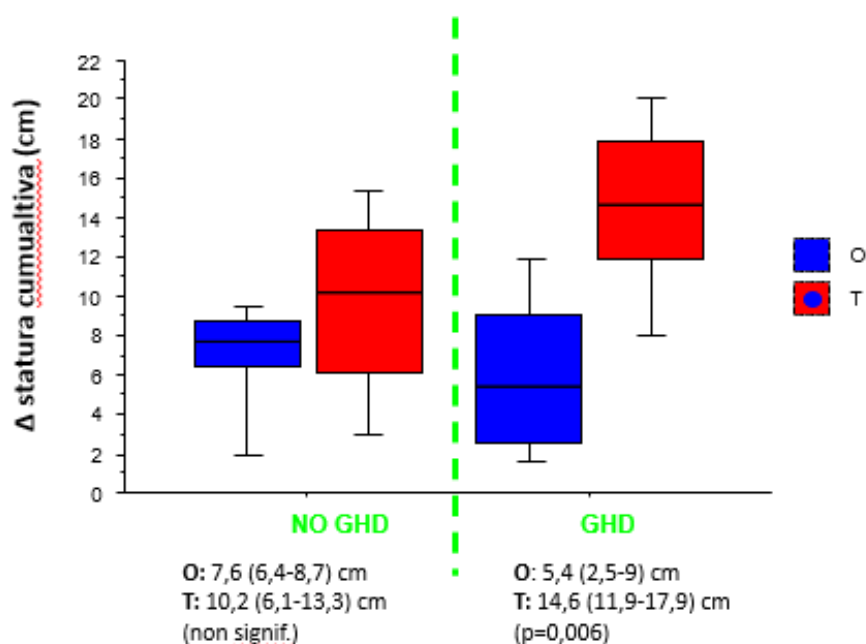


Distinguendo le pazienti sulla base della presenza di difetto di GH associato o meno, in entrambe le corti (GHD e Non) la terapia transdermica ha determinato un guadagno staturale superiore rispetto alla terapia orale, con una mediana di 14,6 (11,9-17,9) cm vs 5,4 (2,5-9) cm per le pazienti con GHD (p-value: 0,006) e di 10,2 (6,1-13,3) cm vs 7,6 (6,4-8,7) cm per le pazienti Non-GHD (p-value: non significativo). Nel caso della terapia orale, questo guadagno è risultato superiore per i soggetti senza difetto associato di GH mentre nei soggetti con deficit di GH la mediana è risultata inferiore. Nei soggetti in terapia transdermica invece questo guadagno è risultato superiore nei casi di GHD associato rispetto ai Non-GHD (*tab.14; grafico 4*).

Tab.14: guadagno staturale in 48 mesi di TES orale vs transdermica in base a presenza o meno di GHD (mediane e IQR 25-75)

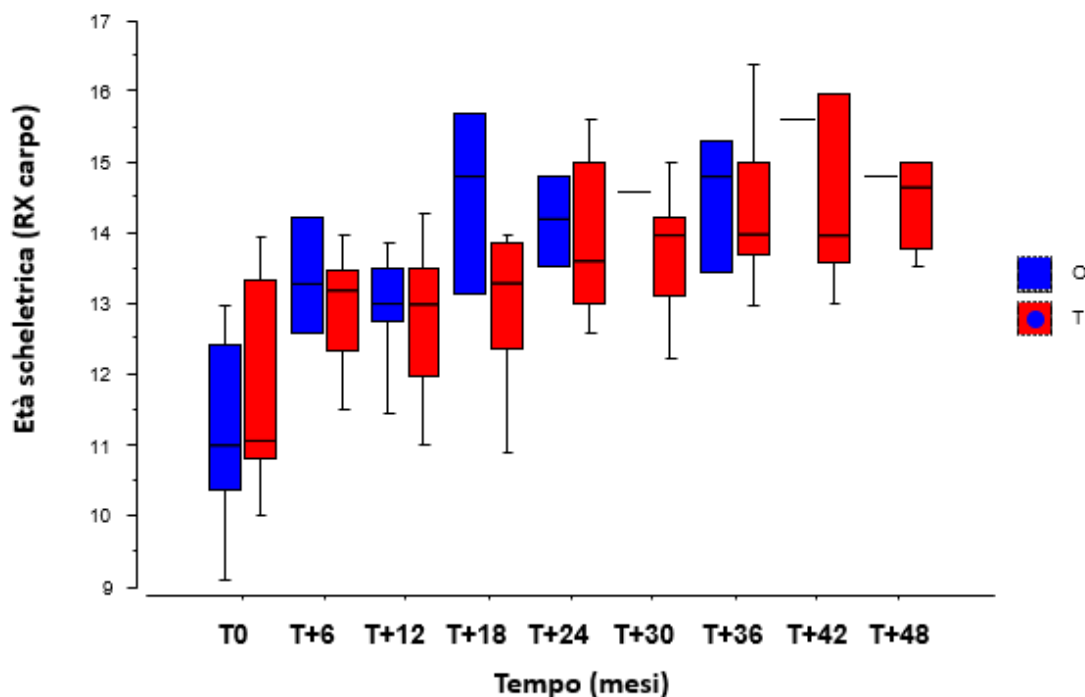
	OS	TD	MW
GHD	5,4 (2,5-9) (n=6)	14,6 (11,9-17,9) (n=10)	<u>p=0,006</u>
Non-GHD	7,6 (6,4-8,7) (n=6)	10,2 (6,1-13,3) (n=9)	p=0,2

Grafico 4: guadagno staturale in 48 mesi di TES orale vs transdermica in base a presenza o meno di GHD



Per quanto riguarda la progressione **dell'età scheletrica** valutata con radiografia del carpo, poi, entrambe le terapie determinano un incremento di questa già a partire da T6 rispetto a T0; la formulazione transdermica risulta tuttavia in seguito determinare una crescita più graduale e costante rispetto quella orale, la quale provoca un picco di avanzamento dell'età scheletrica a T18 per poi assestarsi ad un plateau. Al termine del follow-up, tuttavia, le mediane dei valori di età scheletrica di entrambe le corti (OS e TD) tornano a sovrapporsi (*grafico 5*).

Grafico 5: età scheletrica da T0 a T48 in femmine con amenorrea primaria in TES orale vs transdermica



5.3 Obiettivi secondari

In questa tesi si è scelto di analizzare, fra gli obiettivi secondari posti dallo studio, gli effetti delle due terapie sulla femminilizzazione (crescita uterina e sviluppo mammario inteso come progressione dello stadio B di Tanner), sul BMI, sul metabolismo lipidico (dosaggi di colesterolo totale, LDL e HDL, trigliceridi), sulla produzione epatica di IGF1, sull'assetto coagulativo (proteine C ed S, fattore VII e di Von Willerbrand) e sui livelli di gonadotropine ed estrogeni (dosaggio di LH, FSH, estradiolo).

Femminilizzazione

Analogamente a quanto si è osservato per il guadagno staturale e l'età scheletrica, anche la crescita dimensionale dell'utero e l'evoluzione della mammella segue un andamento più costante e graduale nelle pazienti del braccio in terapia TD rispetto a quello in terapia OS, nel quale si osserva uno scarto maggiore fra T0 e T6 nell'ambito di tutte e tre le dimensioni uterine (longitudinale, anteroposteriore e trasversale) e anche dello sviluppo mammario in stadi di Tanner (valore medio di 2 a T0 e di 3,5 a T6), seguito da un plateau di valori che si protrae fino al termine del follow-up. In tutti i casi, tuttavia, si ha una sovrapposizione dei valori TD e OS a T48 (grafici 6 e 7).

Grafico 6: Crescita dimensionale uterina scomposta in diametri longitudinale, anteroposteriore e trasversale da T0 a T48 (annuale) in TES orale vs transdermica

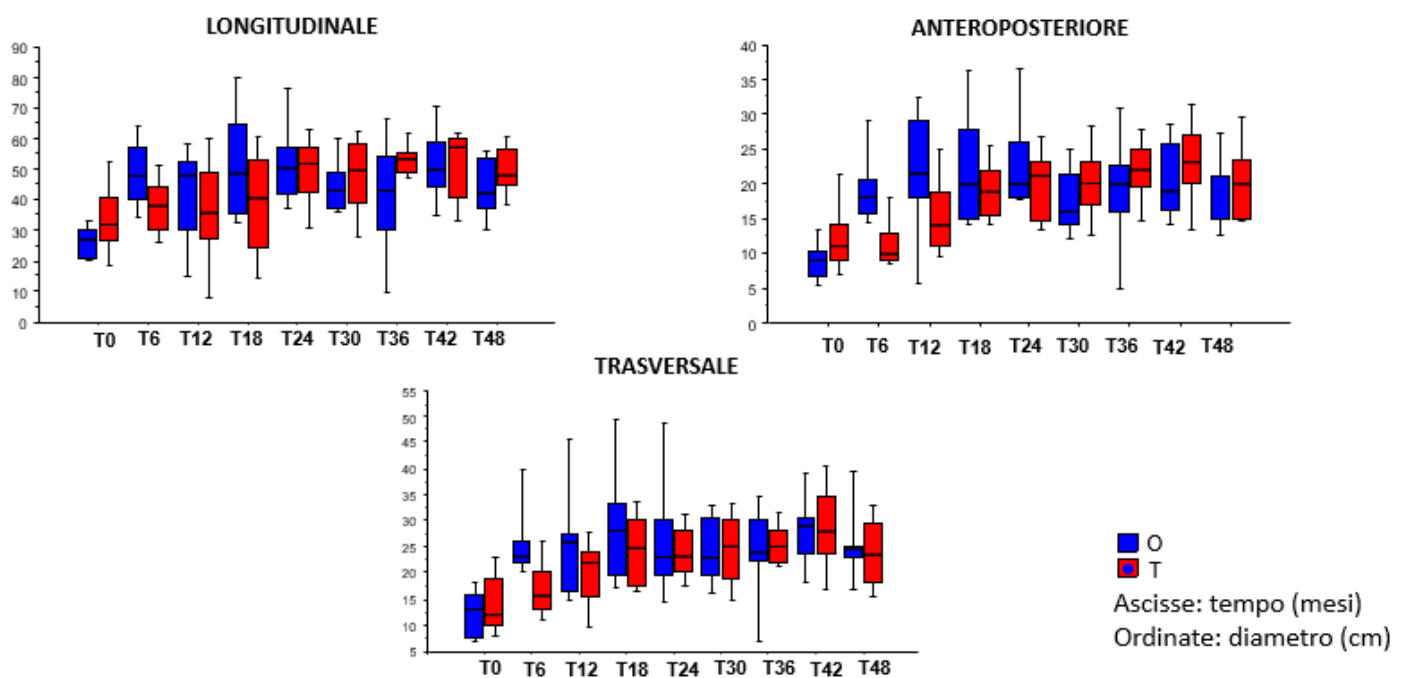
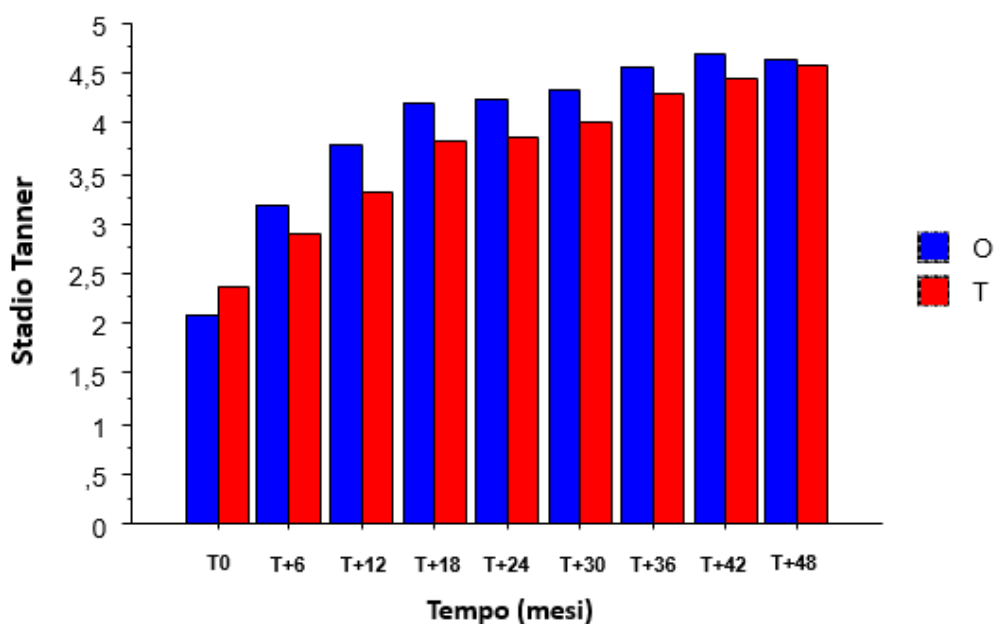


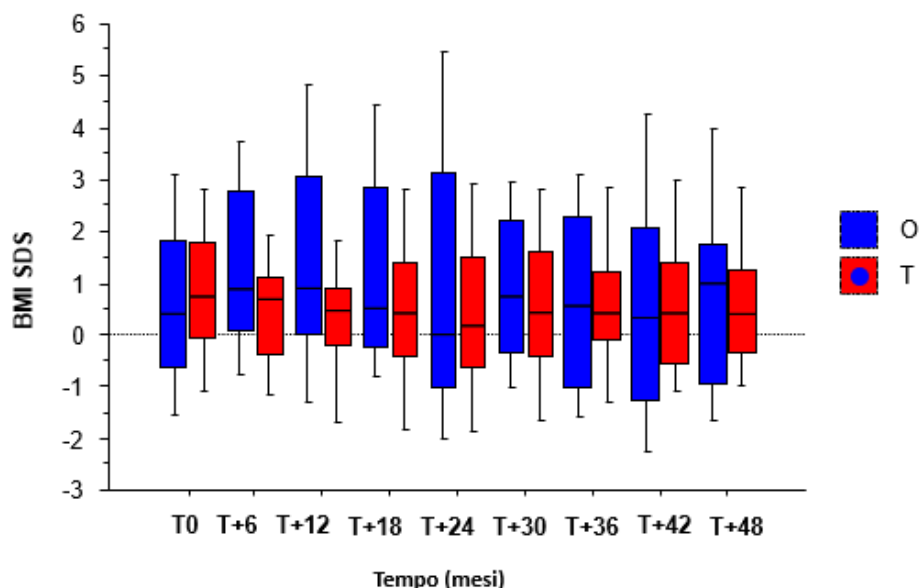
Grafico 7: Sviluppo mammario in stadi secondo Tanner da T0 a T48 (semestrale) in Femmine con Amenorrea Primaria in TES O vs T



BMI

Dall'analisi dell'andamento del BMI valutato in SDS nella coorte di pazienti in toto non sono emerse differenze significative tra terapia OS e TD in nessuna delle valutazioni, né sono state riscontrate variazioni significative del BMI nel tempo. Emergono SDS più alti nel gruppo trattato con ERT orale a significare una maggiore variazione in particolare in termini di più elevati BMI SDS nel gruppo orale.

Grafico 8: andamento BMI da T0 a T48 in femmine con amenorrea primaria in TES orale vs transdermica



Profilo biochimico: metabolismo lipidico e IGF1

Per quanto riguarda i parametri del profilo lipidico, il colesterolo totale risulta ridotto nelle pazienti in terapia TD rispetto ad OS a tutte le misurazioni, con significatività a T36. Lo stesso avviene per il colesterolo LDL, pur non essendovi mai un p-value significativo. Anche il colesterolo HDL risulta lievemente ridotto nelle pazienti del braccio TD rispetto ad OS, con significatività solamente a T24. I valori di trigliceridi invece appaiono significativamente inferiori nella corte TD rispetto ad OS a tutte le misurazioni. Tuttavia, per nessuna delle due terapie si ha evidenza di un effetto di riduzione significativa nel tempo di questi parametri ematici, se non per quanto riguarda i trigliceridi, i quali sembrano diminuire da T0 a T48 nelle pazienti che assumono la formulazione orale (*tab.15; grafico 9*).

In merito ai valori di IGF1 misurati in SDS, si osserva come questi vengano mantenuti più elevati nel corso di tutte le misurazioni per i soggetti in terapia TD rispetto a OS, con una differenza fra le due corti significativa a T24 ($p=0,002$). A differenza di quanto avviene nella corte di pazienti in terapia transdermica, inoltre, nella quale i valori di IGF1 nel tempo si mantengono costanti, con addirittura una lieve e non significativa tendenza all'aumento ($-0,8$ a T0 vs $-0,2$ a T48 IGF1 SDS), la terapia orale sembra portare ad una diminuzione precoce a T6 e costante nel tempo di questo parametro ($-0,4$ a T0 vs $-2,3$ a T48 IGF1 SDS) con tendenza alla significatività statistica ($p=0,07$) (*tab.15; grafico 10*).

Tab.15: Andamento dei valori di profilo lipidico e IGF1 da T0 a T48 in Femmine con Amenorrea Primaria in TES orale vs TD (mediane e IQR 25-75).

		T0	T12	T24	T36	T48	KW
Col. Tot. (mg/dl)	OS	187,5 (170,5-205,5) (n=12)	192 (177-239,5) (n=12)	222 (189-237) (n=10)	207 (189,5-230) (n=8)	188 (166,5-204) (n=11)	OS: no TD: no
	TD	181 (155-207,5) (n=21)	179 (159,5-207) (n=20)	174 (147-214) (n=22)	176 (158,75-198) (n=21)	167 (142,5-197,25) (n=19)	
	MW	$p=0,48$	$p=0,09$	$p=0,19$	<u>$p=0,04$</u>	$p=0,13$	
LDL (mg/dl)	OS	111 (76,5-121,5) (n=11)	109 (99-130) (n=11)	116 (101-145) (n=10)	108 (103,5-117,5) (n=7)	103 (96,5-130) (n=11)	OS: no TD: no

	TD	91 (75,5-131) (n=19)	98,5 (81-132) (n=20)	96 (79-127) (n=21)	107 (79,7-117,5) (n=21)	95 (70,5-124,7) (n=19)	
	MW	<i>p=0,8</i>	<i>p=0,5</i>	<i>p=0,1</i>	<i>p=0,65</i>	<i>p=0,3</i>	
HDL (mg/dl)	OS	60 (46,5-67,5) (n=12)	71 (52,2-73) (n=11)	77,5 (57-83) (n=10)	72 (56,2-79) (n=7)	61 (54,7-69,7) (n=11)	<i>OS: no</i> <i>TD: no</i>
	TD	57 (51,7-66,2) (n=19)	59,5 (51-68) (n=20)	58 (48-64,5) (n=21)	58 (52,2-65,7) (n=21)	55 (47,5-61) (n=19)	
	MW	<i>p=0,9</i>	<i>p=0,4</i>	<u><i>p=0,06</i></u>	<i>p=0,2</i>	<i>p=0,3</i>	
TG (mg/dl)	OS	84 (70,5-101) (n=12)	156,5 (125-212,5) (n=12)	155 (117-183) (n=10)	153,5 (107,5-178,5) (n=8)	114 (89,2-198,5) (n=11)	<i>OS:</i> <u><i>p=0,01</i></u> <i>TD:</i> <i>p=1</i>
	TD	96,5 (50,5-126,5) (n=20)	79 (50,5-116,5) (n=20)	82 (57-92,5) (n=23)	83 (51,5-103,7) (n=21)	63 (52,2-116,2) (n=19)	
	MW	<i>p=0,6</i>	<u><i>p=0,0002</i></u>	<u><i>p=0,003</i></u>	<u><i>p=0,007</i></u>	<u><i>p=0,01</i></u>	
IGF1 SDS	OS	-0,4 (-1,9-0,6) (n=10)	-2,8 (-3,3--1,6) (n=9)	-1,8 (-2,9--1,6) (n=8)	-2,3 (-3,3--1,3) (n=5)	-2,3 (-3,1--0,3) (n=7)	<i>OS:</i> <u><i>p=0,07</i></u> <i>TD:</i> <i>p=0,3</i>
	TD	-0,8 (-3--0,4) (n=9)	-0,7 (-2,7--0,1) (n=12)	-0,7 (-0,9-0,2) (n=11)	-0,8 (-2,5-0,4) (n=11)	-0,2 (-1,1-1,1) (n=8)	
	MW	<i>p=0,3</i>	<i>p=0,1</i>	<u><i>p=0,002</i></u>	<i>p=0,3</i>	<i>p=0,2</i>	

Grafico 9: Andamento delle di colesterolo totale, LDL, HDL e trigliceridi da T0 a T48 in TES orale vs transdermica distinto in base a presenza di difetto di GH associato o meno.

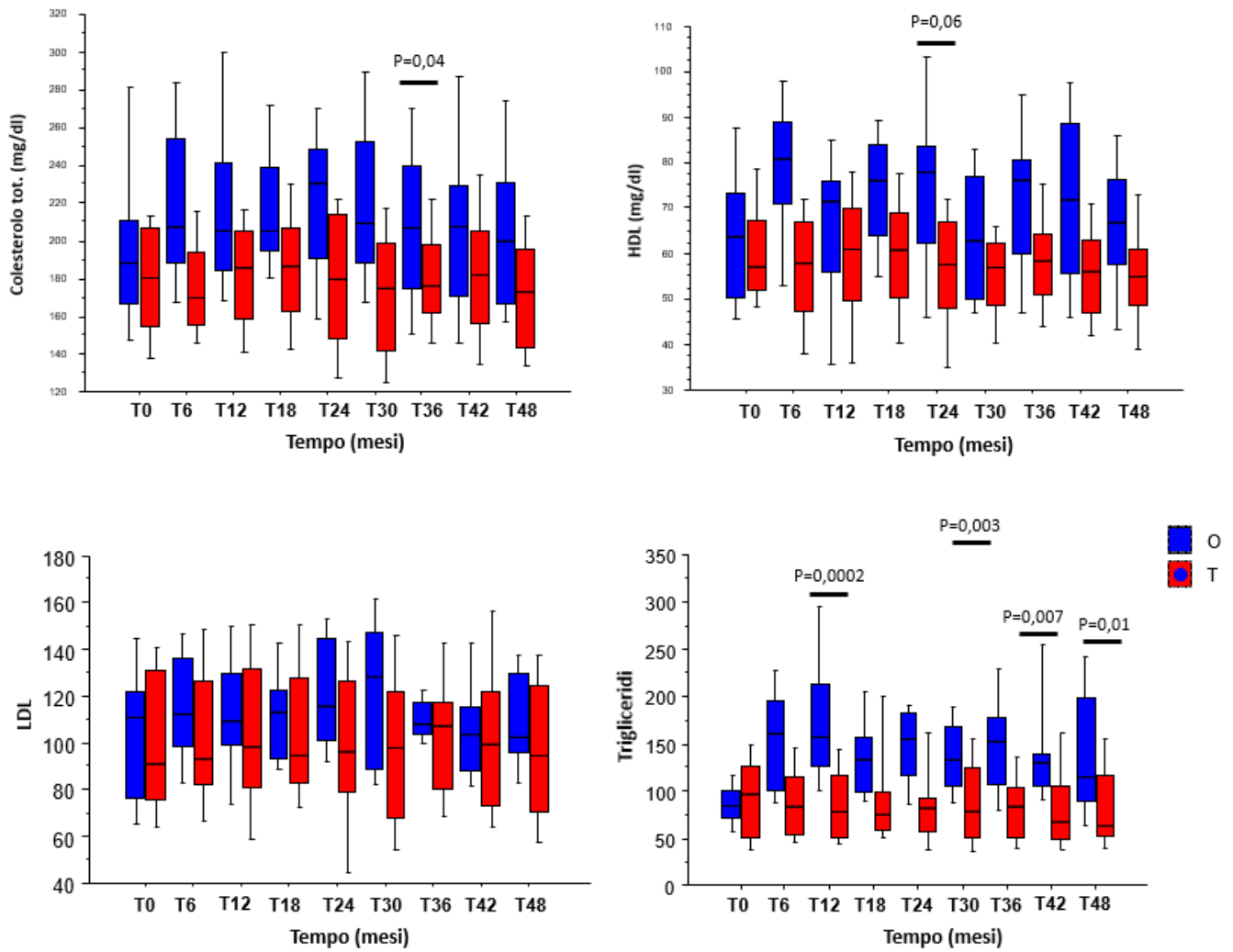
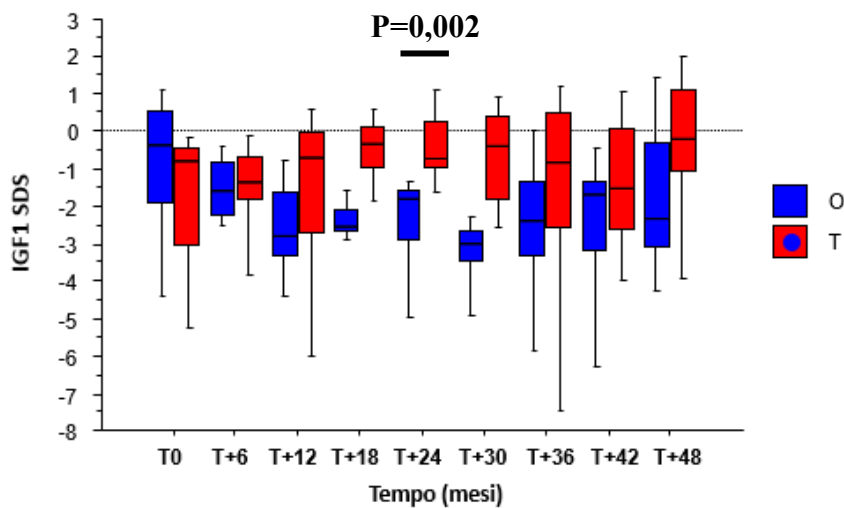


Grafico 10: Andamento delle dei valori di IGF1 da T0 a T48 in TES orale vs transdermica.

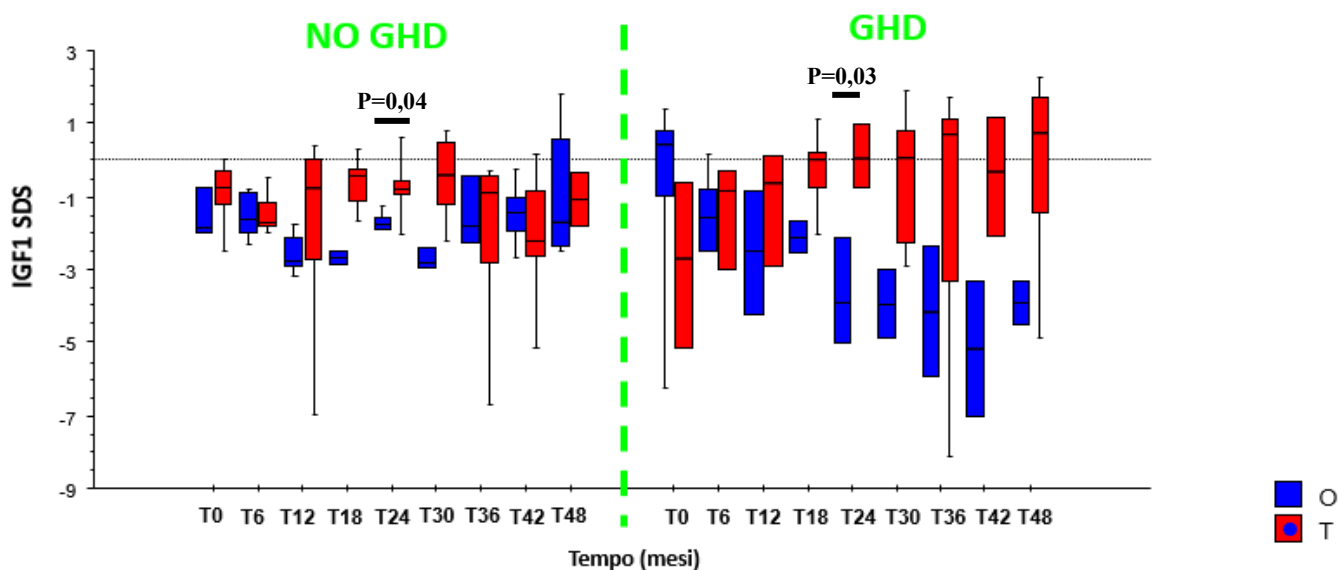


Confrontando poi i valori di IGF1 SDS all'interno del gruppo delle pazienti con difetto di GH e all'interno di quello delle pazienti senza GHD, questi si sono rivelati essere più elevati in entrambe le corti per le pazienti del braccio TD rispetto a quelle del braccio OS, a tutte le misurazioni, con una differenza significativa fra le due terapie a T24 ($p=0,03$ per pazienti GHD; $p=0,04$ per pazienti non-GHD). Questa differenza, sebbene non statisticamente significativa a causa della bassa numerosità, è risultata tanto maggiore nella corte con GHD, nella quale i valori mediani di IGF1 SDS con trattamento TD si sono mantenuti al di sopra di -1 SDS a tutte le misurazioni ($-0,6$ a T12; $0,4$ a T24; $0,7$ a T36; $0,8$ a T48); al contrario, con il trattamento orale questi valori mediani sono risultati essere inferiori a -2 SDS a tutte le misurazioni ($-2,5$ a T12; $-3,9$ a T24; $-4,1$ a T36; $-3,9$ a T48) (tab. 16; grafico 11). I valori ridotti non sono stati corretti nonostante il progressivo aumento delle dosi di GH in questo gruppo di pazienti. Essendo soggetti tumorali, si sottolinea tuttavia che non sono mai state superate le dosi indicate come range di riferimento per la trp con GH ($0.025-0.035$ mg/kg/die).

Tab.16: Andamento delle dei valori di IGF1 da T0 a T48 in TES orale vs transdermica distinto in base a presenza di difetto di GH associato o meno (mediane e IQR 25-75).

		T0		T12		T24		T36		T48		KW
		GHD	Non-GHD	GHD	Non-GHD	GHD	Non-GHD	GHD	Non-GHD	GHD	Non-GHD	
IGF1 SDS	OS	0,4 (-1-0,8) (n=6)	-1,8 (-2-0,7) (n=4)	-2,5 (-4,3-0,8) (n=4)	-2,8 (-2,9-2,1) (n=5)	-3,9 (-5-2,1) (n=3)	-1,8 (-1,9-1,5) (n=5)	-4,1 (-5,9-2,4) (n=2)	-1,8 (-2,2-0,4) (n=3)	-3,9 (-4,5-3,3) (n=2)	-1,7 (-2,3-0,5) (n=5)	GHD: OS: $p=0,6$ TD: $p=0,1$
	TD	-2,7 (-5,1-0,6) (n=4)	-0,8 (-1,2-0,3) (n=5)	-0,6 (-2,9-0,1) (n=4)	-0,8 (-2,7-0,1) (n=8)	0,4 (-0,7-1) (n=4)	-0,8 (-0,9-0,6) (n=7)	0,7 (-3,3-1,1) (n=5)	-0,9 (-2,8-0,4) (n=6)	0,8 (-1,4-1,7) (n=5)	-1,0 (-1,8-0,3) (n=2)	Non GHD: OS: $p=0,04$
	MW	$p=0,2$	$p=0,6$	$p=0,1$	$p=0,6$	$p=0,03$	$p=0,04$	$p=0,2$	$p=0,8$	$p=1$	$p=0,2$	TD: $p=0,5$

Grafico 11: Andamento delle dei valori di IGF1 da T0 a T48 in TES orale vs transdermica distinto in base a presenza di difetto di GH associato o meno (mediane e IQR 25-75).



Gonadotropine ed estrogeni

Da un'analisi condotta solamente sulla porzione di pazienti con ipogonadismo ipergonadotropo, è emersa una maggior riduzione di LH ed FSH con la terapia orale rispetto alla transdermica. In particolare, nella corte OS si ha una riduzione di LH a T12 (mediana di 18,6 UI/l a T0; 2,1 UI/l a T12) che si mantiene fino al termine del follow-up (6,5 UI/l a T48) e un'analoga riduzione di FSH (72,2 UI/l a T0; 7 UI/l a T12; 10,1 a T48); con terapia TD invece questa riduzione è apparsa molto più graduale e di minor entità (LH: 11,3 a T0; 13 a T12; 7,8 a T48; FSH: 52,2 a T0; 34 a T12; 25,5 a T48). Per quanto riguarda l'influenza della terapia sui livelli ematici di estradiolo invece, questi appaiono sovrapponibili tra le due coorti da T0 a T24, mentre a T36 e a T48 risultano significativamente maggiori nelle pazienti in terapia TD rispetto a OS (26,5 vs 8 UI/l a T36, $p=0,08$; 25 vs 10 UI/l a T48, $p=0,03$) (tab.17). Si evidenzia che anche al T48, quando tutti i soggetti in TD hanno raggiunti i valori massimi previsti dal protocollo (50 mcg/settimana per 3 settimane al mese), la mediana risultava < 30 udm diversa da UI/L)

Tab.17: Andamento delle gonadotropine in soggetti con ipergonadotropinemia da T0 a T48 (annuale) in TES orale vs transdermica (mediane e IQR 25-75).

		T0	T12	T24	T36	T48	KW
LH (UI/l)	OS	18,6 (1,1-24,9) (n=12)	2,1 (0,1-19,8) (n=13)	3,8 (1,9-16,4) (n=9)	0,6 (0,1-8,4) (n=9)	6,5 (1,1-17,3) (n=11)	OS: p=0,2 TD:
	TD	11,3 (2,2-33,3) (n=23)	13 (1,1-18,8) (n=27)	7,3 (1-23,4) (n=24)	6,8 (1-25,1) (n=23)	7,8 (0,2-24,3) (n=18)	p=0,9
	MW	<i>p=0,8</i>	<i>p=0,4</i>	<i>p= 0,6</i>	<i>p=0,1</i>	<i>p=0,7</i>	
FSH (UI/l)	OS	72,2 (7-164,1) (n=12)	7 (0,175- 26,3) (n=13)	5 (2,2-35,4) (n=9)	1 (0,2-1) (n=9)	10,1 (2,1-29,2) (n=11)	OS: p=0,1 TD: p=0,5
	TD	53,5 (5,4-104,4) (n=23)	34 (2,8-74,1) (n=21)	27 (1,8-82,2) (n=24)	6,3 (0,8-53,6) (n=22)	25,5 (1,5-56,2) (n=18)	
	MW	<i>p=0,7</i>	<i>p=0,1</i>	<i>p= 0,5</i>	<i>p=0,1</i>	<i>p=0,4</i>	
17-βE2	OS	20 (20-21) (n=12)	20 (20-24) (n=13)	20 (17,5-26) (n=9)	8 (5-23,7) (n=9)	10 (5-20) (n=10)	OS: p=0,3 TD:
	TD	20 (5-20) (n=22)	20 (16-26,2) (n=21)	21,2 (17-31) (n=24)	26,5 (9,2-48,5) (n=21)	25 (14,7-43) (n=21)	<u>p=0,004</u>
	MW	<i>p=0,2</i>	<i>p=0,6</i>	<i>p=0,7</i>	<u><i>p=0,08</i></u>	<u><i>p=0,03</i></u>	

Assetto coagulativo

Per descrivere l'effetto della TES sui processi coagulativi sono state analizzate le variazioni dei livelli ematici delle proteine anticoagulanti C ed S e dei fattori VII e di Von Willerbrand. I risultati ottenuti hanno evidenziato la persistenza significativa di valori superiori di proteina C nel sangue nelle pazienti in terapia OS rispetto a TD a tutti i controlli, e di proteina S invece nelle pazienti in terapia TD ai controlli T12, T36 e T48. Al contrario, i livelli di fattore di Von Willerbrand sono emersi essere maggiori nelle pazienti del braccio TD rispetto a OS (mediana di 151,1 vs 88; $p=0,06$) mentre quelli di fattore VII non sono risultati differire nei due bracci a nessuna misurazione (*tab.18*). Le analisi risultano tuttavia inficiate dalla scarsa numerosità delle pazienti analizzate nel tempo (ad eccezione dei soggetti effettivamente randomizzati); i controlli sono stati infatti sottoposti a valutazione pre-terapia, ma senza essere sottoposti a dosaggi seriati semestrali nel tempo.

Tab.18: Andamento dei parametri della coagulazione da T0 a T48 (annuale) in femmine con amenorrea primaria in TES orale vs transdermica (mediane e IQR 25-75).

		T0	T12	T24	T36	T48	KW
Prot. C %	OS	111 (105,1-119,1) (n=11)	134 (112,5-149) (n=12)	134 (118,2-144,8) (n=12)	145,9 (134-153,6) (n=12)	134,5 (134-146) (n=11)	OS: $p=0,2$ TD: $p=0,9$
	TD	114 (98,8-121,5) (n=17)	111,8 (90,8-120,5) (n=15)	106,5 (97,7-113,3) (n=17)	118 (87-124,5) (n=18)	118,5 (97,2-128) (n=16)	
	<i>MW</i>	$p=0,9$	$\underline{p=0,003}$	$\underline{p=0,003}$	$\underline{p=0,002}$	$\underline{p=0,009}$	
Prot. S %	OS	90 (82,8-117,7) (n=11)	82,5 (66,5-90,5) (n=12)	86 (77,5-100,8) (n=9)	75,5 (65,2-93,2) (n=6)	79,4 (61,5-89) (n=6)	OS: $p=0,3$ TD: $p=0,8$
	TD	88,6 (72-111,3) (n=18)	103 (82,1-108,5) (n=12)	95,5 (76,4-103,4) (n=12)	100 (83-108,3) (n=13)	91,3 (79,5-98,6) (n=12)	
	<i>MW</i>	$p=0,4$	$\underline{p=0,01}$	$p=0,8$	$\underline{p=0,03}$	$\underline{p=0,07}$	

FVIII u.d.m.	OS	120,7 (105,1- 137,8) (n=11)	138,9 (119,5- 182,2) (n=11)	138,3 (92,7-147,5) (n=9)	151,7 (137,3- 159,4) (n=3)	126 (97,8-140) (n=3)	OS: p=0,8 TD: p=0,5
	TD	125,5 (106,4- 147,8) (n=18)	132,3 (111-148) (n=6)	135 (106,7-147) (n=7)	156,7 (96-188) (n=10)	138,7 (103,2- 144,2) (n=9)	
	MW	<i>p=0,6</i>	<i>p=0,6</i>	<i>p=0,9</i>	<i>p=0,7</i>	<i>p=0,6</i>	
FVW u.d.m.	OS	131,2 (88,6-136,2) (n=10)	127 (81,2-171,2) (n=11)	105,2 (85,8-144,4) (n=8)	126,2 (109,5- 181,6) (n=3)	88 (76,2-107) (n=3)	OS: p=0,9 TD: p=0,9
	TD	138,2 (118-184) (n=18)	128,7 (112-189,7) (n=6)	106 (95,9-150,3) (n=7)	135,8 (108-183) (n=8)	151,1 (129,1- 173,5) (n=8)	
	MW	<i>p=0,5</i>	<i>p=0,6</i>	<i>p=0,9</i>	<i>p=1</i>	<u><i>p=0,06</i></u>	

6. DISCUSSIONE

La sopravvivenza da tumore pediatrico sta aumentando grazie alle nuove strategie terapeutiche, tuttavia, in proporzione, sta aumentando la corte ex oncologica affetta da patologia cronica. Nello specifico il 40% degli effetti collaterali a lungo termine è rappresentato da endocrinopatie, incluso l'ipogonadismo. Tale condizione in età pediatrica è di cruciale importanza in quanto la bambina necessita di induzione puberale per femminilizzazione dei caratteri sessuali e maturazione sistemica di tutti i tessuti. Sebbene sia ormai esperienza clinica diffusa da parte degli endocrinologi pediatri il rilievo di una maggiore fisiologia simulata dalla formulazione estrogenica transdermica, non esistono al momento studi clinici randomizzati confrontanti gli effetti di diverse formulazioni estrogeniche su statura, composizione corporea, rischio trombotico e altro. Laddove tentati, tali studi sono risultati fallimentari per la difficoltà a mantenere in studio per lunga durata soggetti arruolati, e scarsamente informativi dell'effetto in diverse corti ipogonadiche. La maggior parte dei dati, infatti, deriva da studi condotti in bambine con sindrome di Turner, una patologia cromosomica associata a disgenesia gonadica che non può essere equiparata a corti di soggetti con ipogonadismo primario o secondario in cariotipo normale.

Nel nostro studio, comprendente ad oggi 56 adolescenti affette da ipogonadismo secondario a trattamento oncologico, di cui 21 randomizzate a terapia orale o transdermica e 35 non randomizzate trattate con schemi analoghi, abbiamo dimostrato che le due formulazioni nelle 38 pazienti con amenorrea primaria si associavano ad effetti in parte comparabili ed in parte differenti che ci consentono di identificare come migliore la scelta della formulazione transdermica in questa categoria di soggetti.

Per i motivi sopra indicati per altri studi, anche nel nostro studio si è registrata un'estrema difficoltà di conduzione di uno studio randomizzato, in particolare nel proseguire un trattamento transdermico se non scelto "spontaneamente". Sebbene infatti tale strategia sia più facilmente maneggevole in termini di bassi dosaggi erogabili soprattutto nei primi 24 mesi di trattamento, prima di raggiungere la dose adulta, tuttavia l'opzione si accompagna a più difficile gestione della terapia stessa. Il cerotto a matrice tagliabile in porzioni più piccole implica infatti il facile distacco delle stesse e la necessità di un controllo più assiduo, almeno due volte al giorno o dopo docce/bagni/attività fisica, contrariamente alla regolarità di assunzione più facilmente mantenuta con una terapia orale.

A seguire gli effetti a confronto di terapia orale vs transdermica, in base agli obiettivi prefissati dello studio.

Crescita staturale ed età scheletrica

L'obiettivo primario di guadagno cumulativo staturale a 24 mesi $> 7,5$ cm è stato raggiunto e superato (valore mediano 9,1 cm) dalle pazienti in terapia transdermica e non dalle pazienti in terapia orale.

Abbiamo dimostrato come in generale la TES consenta una crescita staturale significativa, che è però risultata pressochè doppia nelle pazienti in terapia con la formulazione transdermica rispetto a quelle in terapia con l'orale, da quanto si evince dal guadagno staturale cumulativo, al termine dei 48 mesi di follow-up pari a 12,2 (8,2-15,4 IQR) cm nel braccio TD e a 6,6 (3,5-8,8 IQR) cm nell'OS.

Questa differenza si accentua se si va a confrontare l'effetto di ciascuna delle due terapie sull'accrescimento staturale nella corte di pazienti con deficit associato di GH, il più frequente tra i difetti ormonali secondari in particolare in pazienti trattati con radioterapia includente l'asse ipotalamo-ipofisi (RTC e RTCS): il guadagno staturale a 4 anni risulta triplicato nelle pazienti con GHD in terapia TD rispetto a quelle in terapia OS (14,6 vs 5,4 cm) ed è anche più elevato rispetto alla controparte in terapia TD senza GHD (14,6 vs 10,2). Le pazienti che hanno avuto il minor accrescimento staturale nell'arco dei 4 anni sono state quelle con GHD in terapia orale.

Esistono lavori antecedenti in letteratura a supporto di quest'evidenza: Davenport et al.⁴¹ nel 2006 suggerivano che l'induzione di pubertà nelle giovani già in terapia con GH venisse somministrata con estrogeni transdermici o percutanei piuttosto che con terapia orale e che venisse iniziata fra i 12-13 anni per non compromettere l'altezza finale in età adulta. Questa raccomandazione si basava su dati estrapolati da lavori precedenti, tra cui uno studio osservazionale condotto su oltre 1500 pazienti con Turner Syndrome¹¹⁵ e pubblicato nel 2005, nel quale era stata analizzata l'altezza in età adulta di queste pazienti trattate con GH durante la pubertà e si era osservato, nel sottogruppo di pazienti nelle quali la pubertà non era stata spontanea ma indotta, una statura finale di 2,1 cm maggiore con terapia estrogenica transdermica rispetto a quelle trattate con terapia orale (guadagno rispetto all'altezza prevista: $8,4 \pm 4,5$ cm con etinil estradiolo orale; $9,6 \pm 4,0$ cm con estradiolo orale; $11,2 \pm 3,6$ cm con estradiolo transdermico; $8,4 \pm 3,6$ cm combinazioni preformate di estrogeni e progestinici).

In secondo luogo, vi è stata anche una differente progressione della velocità di crescita nei 48 mesi: questa si è mantenuta più elevata per un periodo maggiore con terapia TD, differenziandosi significativamente dal braccio in terapia OS già al dodicesimo mese di

follow-up. La risalita della curva della velocità di crescita con terapia TD è quindi risultata più graduale e costante rispetto a quella del braccio in terapia OS, che ha subito un picco iniziale per poi assestarsi ad un plateau. Quest'ultima quindi, a causa della sua minore maneggevolezza (dosi prestabilite minime di 5 - ½ pillola- o 10 mg/die -1 pillola- al contrario di dosi più piccole erogabili mediante terapia transdermica per possibilità di taglio delle matrici in quarti e mezzi) non ottimizzerebbe la statura determinando un'induzione puberale rapida non ricalcante la normale crescita fisiologica; al fine dell'ottenimento di una statura definitiva ottimale, tale minor maneggevolezza intrinseca alla formulazione orale (a meno di utilizzare preparazione galeniche a basso dosaggio) sembra giocare a sfavore, mentre l'attività costante e maggiormente distribuita nel tempo degli estrogeni transdermici sembra dare risultati significativamente superiori.

Il peggior incremento staturale che si rileva con terapia orale dunque potrebbe essere spiegato da dosi troppo elevate precoci (consapevoli che tale estrogeno è riportato avere una potenza maggiore) con un conseguente più precoce e rapido avanzamento scheletrico. Le alte concentrazioni di ormone estrogeno che si hanno con la formulazione orale infatti porterebbero alla fine ad una saldatura più precoce delle metafisi delle ossa lunghe, a discapito della statura finale. Questo fatto è chiaramente evidenziato dalla curva di progressione dell'età scheletrica, che appare sovrapponibile a quella della velocità di crescita: il momento T12 in cui la velocità di crescita è maggiore è immediatamente seguito dal raggiungimento dell'età scheletrica massima, che è di fatto quasi definitiva; a seguito, la velocità di crescita diminuisce progressivamente e l'età scheletrica rimane invariata. Nelle pazienti in terapia transdermica invece l'età scheletrica continua ad aumentare lentamente nei successivi controlli radiografici, fino a raggiungere il valore definitivo a T48. Già nel 2015 in uno studio pubblicato sul *Journal of Pediatric Endocrinology and Metabolism* si era constatato, in una coorte di 13 pazienti con sindrome di Turner, come gli estrogeni transdermici rispetto a quelli orali determinassero una più lenta progressione dell'età ossea¹¹⁶. I dati raccolti con questo studio confermano quindi quest'evidenza e dimostrano il legame con il miglior outcome staturale della terapia estrogenica con *patches*. Si può quindi concludere che entrambe le formulazioni influiscano positivamente sulla maturazione ossea e permettano l'acquisizione di un'età scheletrica analoga, ma che la terapia transdermica consenta un maggior allungamento osseo rispetto alla terapia orale a vantaggio dell'altezza definitiva del soggetto.

La miglior crescita staturale nelle pazienti a cui è stata somministrata la terapia transdermica può essere spiegata in parte anche dai livelli più elevati di IGF1 che sono stati riscontrati in

circolo in queste pazienti durante tutto il follow-up. La terapia OS ha dimostrato infatti di provocare una diminuzione significativa delle IGF1 nel tempo, mentre la terapia TD li ha mantenuti elevati, confermando quindi quanto già detto in letteratura sulla caratteristica farmacocinetica della formulazione transdermica di evitamento del primo passaggio epatico. In questo modo viene preservata la funzione epatica di produzione di questo mediatore del GH e si ha così il mantenimento di un adeguato potenziale di crescita^{4,16,19}.

In aggiunta, la differenza fra livelli ematici di IGF1 nelle pazienti in terapia OS rispetto a quelle in trattamento TD risulta ancora maggiore se si va a prendere in esame solamente la fetta di popolazione in studio con GHD. In queste pazienti già a partire dal primo controllo si rileva un assestamento del valore mediano di IGF1 SDS al di sotto dei limiti fisiologici con terapia OS (< -2 SDS), mentre con terapia TD sembra esserci un rientro delle IGF1 SDS, che risultavano in partenza patologiche, a valori di normalità (> -1 SDS). Anche questi dati dunque risultano coerenti e sovrapponibili a quelli emersi dall'analisi di velocità di crescita, guadagno staturale cumulativo ed età scheletrica.

In conclusione, tutte le evidenze indicano una netta superiorità della terapia transdermica rispetto all'orale per ciò che concerne i parametri auxologici in corso di pubertà, dimostrando come il trattamento estrogenico con cerotto possa risultare più vantaggioso da questo punto di vista per l'induzione puberale, in accordo e a rafforzamento della letteratura esistente. Di notevole importanza sono inoltre i dati riguardanti le giovani con difetto di ormone della crescita associato a ipogonadismo, per le quali appare fondamentale prediligere la formulazione transdermica estrogenica che, in associazione alla terapia sostitutiva con GH, garantisce il mantenimento di un potenziale di crescita staturale ottimale, il quale viene invece compromesso dalla via di somministrazione orale.

Femminilizzazione

Sulla base delle valutazioni cliniche ed ecografiche effettuate semestralmente nelle pazienti coinvolte nello studio possiamo affermare come anche la crescita di utero e mammella risulti più graduale con terapia transdermica, soprattutto nei primi 18 mesi di terapia, durante i quali le pazienti in terapia orale invece mostrano una progressione molto più rapida sia dei diametri uterini che dello sviluppo mammario. Ciononostante, all'ultimo controllo di follow-up (T48) le due coorti (OS e TD) risultano simili e sovrapponibili in termini di sviluppo dimensionale uterino e stadio Tanner mammario, dimostrando come entrambe le formulazioni di TES garantiscano un'adeguata maturazione dei caratteri sessuali secondari.

Metabolismo lipidico e BMI

Dai dati raccolti con questo studio si può osservare come la terapia transdermica sia associata al mantenimento dei livelli ematici di trigliceridi significativamente inferiori rispetto a quelli riscontrati con terapia orale; lo stesso vale per colesterolo totale, per quanto per quest'ultimo sia presente un valore di significatività solamente al controllo a due anni dall'inizio della terapia. I bassi livelli di colesterolo che si hanno nella corte TD sembrerebbero inoltre manifestarsi a spese della componente HDL, che presenta una curva sovrapponibile ad esso. Al contrario, sebbene vi sia una tendenza al ribasso anche dei valori di LDL con terapia TD rispetto a OS, non vi è una significatività tale da poter affermare che la TES condizioni questo parametro biochimico. Al netto dell'effetto sui lipidi poi, in queste pazienti non si è osservato alcun effetto sul parametro BMI.

In letteratura troviamo dati discordi in merito all'effetto della terapia estrogenica sul metabolismo lipidico: mentre Goldštajn et al.²⁰ riportano, alla luce della revisione dei numerosi lavori scientifici, una tendenza alla riduzione (non significativa) di LDL e HDL con TD e un aumento di HDL e TG con OS, Voutsadaki et al.⁴ riportano un'equivalenza delle due vie di somministrazione della TES sotto questo aspetto.

La questione rimane dunque aperta, per quanto sia innegabile un'influenza dell'HRT sui lipidi sistemici e sia ipotizzabile un effetto più favorevole della formulazione transdermica rispetto all'orale.

Rischio VTE

Nel corso dei 48 mesi di follow-up, in nessuna delle 56 pazienti con amenorrea primaria e secondaria coinvolte nello studio si sono verificati fenomeni tromboembolici di tipo venoso o arterioso. L'analisi di alcuni fra i parametri coagulativi nelle 38 pazienti con amenorrea primaria ha rilevato una minore livelli di proteina S anticoagulate con terapia orale rispetto a transdermica e, all'opposto, minori livelli di proteina C con terapia transdermica rispetto ad orale; si è inoltre osservato un più elevato livello di fattore di Von Willerbrand con terapia TD rispetto ad OS.

Questi risultati, per quanto non siano stati in grado di indicare una superiorità delle due terapie in merito alla protezione da eventi tromboembolici e cardiovascolari, andranno sicuramente considerati nell'ambito di un'analisi più approfondita dei dati raccolti con questo studio che tenga conto dei molteplici agenti in gioco all'interno del processo coagulativo.

Punti di forza

Il nostro studio valuta per la prima volta l'impatto della ERT in una corte abbastanza ampia di adolescenti lungo-sopravvivenenti da tumore pediatrico con sola amenorrea primaria; è inoltre l'unico in assoluto fino ad ora ad aver studiato tale trattamento nell'ambito della progressione puberale, trattando una corte di pazienti omogenea e molto giovane rispetto a quelle considerate negli studi presenti in letteratura, le quali sono mediamente composte da giovani tra i 19-20 anni di età.

Si tratta inoltre di uno studio monocentrico: tale caratteristica garantisce che tutte le pazienti in studio siano state seguite allo stesso identico modo e valutate con i medesimi parametri.

Il numero di valutazioni in toto effettuate in questo studio clinico randomizzato è in assoluto la più estesa ad oggi pubblicata (457 valutazioni di soggetti con amenorrea primaria e secondaria) con un'evidenza di risultati talmente differente nei due bracci in studio da avere valenza scientifica nonostante il mancato raggiungimento della potenza numerica statistica.

Limitazioni

Per la corte in terapia orale non è stata raggiunta la numerosità statistica sancita all'inizio dello studio, pur aggiungendo il gruppo di controllo al numero delle pazienti randomizzate.

È risultato infatti complesso non solo ottenere il consenso all'arruolamento da parte delle pazienti e delle famiglie ma anche seguire le pazienti semestralmente per un tempo così lungo, durante il quale era facile che venissero saltate delle visite o che le pazienti scegliessero di cambiare terapia in itinere.

Le due coorti OS e TD, inoltre, di fatto non erano esattamente sovrapponibili sia per tipo di tumore (SNC e non-SNC), sia per tipo di ipogonadismo e sia per percentuale di soggetti con deficit di GH.

7. CONCLUSIONI

In adolescenti con ipogonadismo secondario a trattamento oncologico la terapia estroprogestinica transdermica favorisce una gradualità della crescita ossea permettendo il raggiungimento di una statura definitiva ottimale, con un guadagno in altezza di valore doppio rispetto a quello dato dalla terapia orale e addirittura triplicato nelle pazienti con difetto di ormone della crescita. La TES somministrata con cerotto garantisce inoltre un profilo metabolico migliore, con una riduzione di colesterolo totale e trigliceridi.

In base a queste evidenze emerse da una prima analisi dei dati raccolti in questo studio possiamo quindi concludere che la terapia transdermica risulta preferibile a quella orale e quindi raccomandabile per l'induzione di pubertà in giovani ipogonadiche con storia di pregresso tumore, in particolare in presenza di un difetto associato di GH.

BIBLIOGRAFIA

1. Kiess W, Conway G, Ritzen M, et al. Induction of puberty in the hypogonadal girl--practices and attitudes of pediatric endocrinologists in Europe. *Horm Res.* 2002;57(1-2):66-71. doi:10.1159/000057952
2. Howard SR, Dunkel L. Delayed Puberty-Phenotypic Diversity, Molecular Genetic Mechanisms, and Recent Discoveries. *Endocr Rev.* 2019;40(5):1285-1317. doi:10.1210/er.2018-00248
3. Nordenström A, Ahmed SF, van den Akker E, et al. Pubertal induction and transition to adult sex hormone replacement in patients with congenital pituitary or gonadal reproductive hormone deficiency: an Endo-ERN clinical practice guideline. *Eur J Endocrinol.* 2022;186(6):G9-G49. doi:10.1530/EJE-22-0073
4. Voutsadaki K, Matalliotakis M, Ladomenou F. Hypogonadism in adolescent girls: treatment and long-term effects. *Acta Bio-Medica Atenei Parm.* 2022;93(5):e2022317. doi:10.23750/abm.v93i5.13719
5. Klein KO, Phillips SA. Review of Hormone Replacement Therapy in Girls and Adolescents with Hypogonadism. *J Pediatr Adolesc Gynecol.* 2019;32(5):460-468. doi:10.1016/j.jpag.2019.04.010
6. Divasta AD, Gordon CM. Hormone replacement therapy and the adolescent. *Curr Opin Obstet Gynecol.* 2010;22(5):363-368. doi:10.1097/GCO.0b013e32833e4a35
7. DiVasta AD, Gordon CM. Hormone replacement therapy for the adolescent patient. *Ann N Y Acad Sci.* 2008;1135:204-211. doi:10.1196/annals.1429.012
8. Klein KO, Rosenfield RL, Santen RJ, et al. Estrogen Replacement in Turner Syndrome: Literature Review and Practical Considerations. *J Clin Endocrinol Metab.* 2018;103(5):1790-1803. doi:10.1210/jc.2017-02183
9. Gravholt CH, Andersen NH, Conway GS, et al. Clinical practice guidelines for the care of girls and women with Turner syndrome: proceedings from the 2016 Cincinnati International Turner Syndrome Meeting. *Eur J Endocrinol.* 2017;177(3):G1-G70. doi:10.1530/EJE-17-0430
10. Boehm U, Bouloux PM, Dattani MT, et al. Expert consensus document: European Consensus Statement on congenital hypogonadotropic hypogonadism--pathogenesis, diagnosis and treatment. *Nat Rev Endocrinol.* 2015;11(9):547-564. doi:10.1038/nrendo.2015.112
11. Ankarberg-Lindgren C, Elfving M, Wikland KA, Norjavaara E. Nocturnal application of transdermal estradiol patches produces levels of estradiol that mimic those seen at the onset of spontaneous puberty in girls. *J Clin Endocrinol Metab.* 2001;86(7):3039-3044. doi:10.1210/jcem.86.7.7667
12. Ankarberg-Lindgren C, Kriström B, Norjavaara E. Physiological estrogen replacement therapy for puberty induction in girls: a clinical observational study. *Horm Res Paediatr.* 2014;81(4):239-244. doi:10.1159/000356922

13. Taboada M, Santen R, Lima J, et al. Pharmacokinetics and pharmacodynamics of oral and transdermal 17 β estradiol in girls with Turner syndrome. *J Clin Endocrinol Metab.* 2011;96(11):3502-3510. doi:10.1210/jc.2011-1449
14. Torres-Santiago L, Mericq V, Taboada M, et al. Metabolic effects of oral versus transdermal 17 β -estradiol (E₂): a randomized clinical trial in girls with Turner syndrome. *J Clin Endocrinol Metab.* 2013;98(7):2716-2724. doi:10.1210/jc.2012-4243
15. Trolle C, Hjerrild B, Cleemann L, Mortensen KH, Gravholt CH. Sex hormone replacement in Turner syndrome. *Endocrine.* 2012;41(2):200-219. doi:10.1007/s12020-011-9569-8
16. Kenigsberg L, Balachandar S, Prasad K, Shah B. Exogenous pubertal induction by oral versus transdermal estrogen therapy. *J Pediatr Adolesc Gynecol.* 2013;26(2):71-79. doi:10.1016/j.jpag.2011.09.012
17. Harel Z, Riggs S, Vaz R, Flanagan P, Dunn K, Harel D. Adolescents' experience with the combined estrogen and progestin transdermal contraceptive method Ortho Evra. *J Pediatr Adolesc Gynecol.* 2005;18(2):85-90. doi:10.1016/j.jpag.2004.11.016
18. Pierson RA, Archer DF, Moreau M, Shangold GA, Fisher AC, Creasy GW. Ortho Evra/Evra versus oral contraceptives: follicular development and ovulation in normal cycles and after an intentional dosing error. *Fertil Steril.* 2003;80(1):34-42. doi:10.1016/s0015-0282(03)00556-9
19. Dural O, Ulusoy HE, Tikiz MA, et al. Effects of Hormone Replacement Therapy on Low Bone Mineral Density in Adolescents and Young Women with Hypogonadism: Comparison of Oral and Transdermal 17 Beta-Estradiol Administration. *J Pediatr Adolesc Gynecol.* 2022;35(6):634-637. doi:10.1016/j.jpag.2022.05.004
20. Goldštajn MŠ, Mikuš M, Ferrari FA, et al. Effects of transdermal versus oral hormone replacement therapy in postmenopause: a systematic review. *Arch Gynecol Obstet.* Published online June 17, 2022. doi:10.1007/s00404-022-06647-5
21. Foudila T, Söderström-Anttila V, Hovatta O. Turner's syndrome and pregnancies after oocyte donation. *Hum Reprod Oxf Engl.* 1999;14(2):532-535. doi:10.1093/humrep/14.2.532
22. Gawlik AM, Hankus M, Szeliga K, et al. Late-Onset Puberty Induction by Transdermal Estrogen in Turner Syndrome Girls-A Longitudinal Study. *Front Endocrinol.* 2018;9:23. doi:10.3389/fendo.2018.00023
23. Paterson WF, Hollman AS, Donaldson MDC. Poor uterine development in Turner syndrome with oral oestrogen therapy. *Clin Endocrinol (Oxf).* 2002;56(3):359-365. doi:10.1046/j.1365-2265.2002.01477.x
24. Nabhan ZM, Dimeglio LA, Qi R, Perkins SM, Eugster EA. Conjugated oral versus transdermal estrogen replacement in girls with Turner syndrome: a pilot comparative study. *J Clin Endocrinol Metab.* 2009;94(6):2009-2014. doi:10.1210/jc.2008-2123

25. Cauley JA, Robbins J, Chen Z, et al. Effects of estrogen plus progestin on risk of fracture and bone mineral density: the Women's Health Initiative randomized trial. *JAMA*. 2003;290(13):1729-1738. doi:10.1001/jama.290.13.1729
26. Cartwright B, Robinson J, Seed PT, Fogelman I, Rymer J. Hormone Replacement Therapy Versus the Combined Oral Contraceptive Pill in Premature Ovarian Failure: A Randomized Controlled Trial of the Effects on Bone Mineral Density. *J Clin Endocrinol Metab*. 2016;101(9):3497-3505. doi:10.1210/jc.2015-4063
27. European Society for Human Reproduction and Embryology (ESHRE) Guideline Group on POI, Webber L, Davies M, et al. ESHRE Guideline: management of women with premature ovarian insufficiency. *Hum Reprod Oxf Engl*. 2016;31(5):926-937. doi:10.1093/humrep/dew027
28. Herrmann M, Seibel MJ. The effects of hormonal contraceptives on bone turnover markers and bone health. *Clin Endocrinol (Oxf)*. 2010;72(5):571-583. doi:10.1111/j.1365-2265.2009.03688.x
29. Lopez LM, Grimes DA, Schulz KF, Curtis KM. Steroidal contraceptives: effect on bone fractures in women. *Cochrane Database Syst Rev*. 2011;(7):CD006033. doi:10.1002/14651858.CD006033.pub4
30. Guttmann H, Weiner Z, Nikolski E, et al. Choosing an oestrogen replacement therapy in young adult women with Turner syndrome. *Clin Endocrinol (Oxf)*. 2001;54(2):159-164. doi:10.1046/j.1365-2265.2001.01181.x
31. Crofton PM, Evans N, Bath LE, et al. Physiological versus standard sex steroid replacement in young women with premature ovarian failure: effects on bone mass acquisition and turnover. *Clin Endocrinol (Oxf)*. 2010;73(6):707-714. doi:10.1111/j.1365-2265.2010.03868.x
32. Goodman MP. Are all estrogens created equal? A review of oral vs. transdermal therapy. *J Womens Health* 2002. 2012;21(2):161-169. doi:10.1089/jwh.2011.2839
33. Singhal V, Ackerman KE, Bose A, Flores LPT, Lee H, Misra M. Impact of Route of Estrogen Administration on Bone Turnover Markers in Oligoamenorrhoeic Athletes and Its Mediators. *J Clin Endocrinol Metab*. 2019;104(5):1449-1458. doi:10.1210/jc.2018-02143
34. Misra M, Katzman D, Miller KK, et al. Physiologic estrogen replacement increases bone density in adolescent girls with anorexia nervosa. *J Bone Miner Res Off J Am Soc Bone Miner Res*. 2011;26(10):2430-2438. doi:10.1002/jbmr.447
35. Ackerman KE, Singhal V, Baskaran C, et al. Oestrogen replacement improves bone mineral density in oligo-amenorrhoeic athletes: a randomised clinical trial. *Br J Sports Med*. 2019;53(4):229-236. doi:10.1136/bjsports-2018-099723
36. Federici S, Goggi G, Quinton R, et al. New and Consolidated Therapeutic Options for Pubertal Induction in Hypogonadism: In-depth Review of the Literature. *Endocr Rev*. 2022;43(5):824-851. doi:10.1210/endrev/bnab043
37. Phelan N, Conway SH, Llahana S, Conway GS. Quantification of the adverse effect of ethinylestradiol containing oral contraceptive pills when used in conjunction with growth

- hormone replacement in routine practice. *Clin Endocrinol (Oxf)*. 2012;76(5):729-733. doi:10.1111/j.1365-2265.2011.04277.x
38. Matthews D, Bath L, Höglér W, Mason A, Smyth A, Skae M. Hormone supplementation for pubertal induction in girls. *Arch Dis Child*. 2017;102(10):975-980. doi:10.1136/archdischild-2016-311372
 39. Lissett CA, Shalet SM. The impact of dose and route of estrogen administration on the somatotrophic axis in normal women. *J Clin Endocrinol Metab*. 2003;88(10):4668-4672. doi:10.1210/jc.2003-022036
 40. Davenport ML. Moving toward an understanding of hormone replacement therapy in adolescent girls: looking through the lens of Turner syndrome. *Ann N Y Acad Sci*. 2008;1135:126-137. doi:10.1196/annals.1429.031
 41. Davenport ML. Evidence for early initiation of growth hormone and transdermal estradiol therapies in girls with Turner syndrome. *Growth Horm IGF Res Off J Growth Horm Res Soc Int IGF Res Soc*. 2006;16 Suppl A:S91-97. doi:10.1016/j.gHIR.2006.04.002
 42. Anderson GL, Limacher M, Assaf AR, et al. Effects of conjugated equine estrogen in postmenopausal women with hysterectomy: the Women's Health Initiative randomized controlled trial. *JAMA*. 2004;291(14):1701-1712. doi:10.1001/jama.291.14.1701
 43. Hodis HN, Mack WJ. A "window of opportunity:" the reduction of coronary heart disease and total mortality with menopausal therapies is age- and time-dependent. *Brain Res*. 2011;1379:244-252. doi:10.1016/j.brainres.2010.10.076
 44. Oelkers W, Foidart JM, Dombrovicz N, Welter A, Heithecker R. Effects of a new oral contraceptive containing an antimineralocorticoid progestogen, drospirenone, on the renin-aldosterone system, body weight, blood pressure, glucose tolerance, and lipid metabolism. *J Clin Endocrinol Metab*. 1995;80(6):1816-1821. doi:10.1210/jcem.80.6.7775629
 45. Kalantaridou SN, Naka KK, Papanikolaou E, et al. Impaired endothelial function in young women with premature ovarian failure: normalization with hormone therapy. *J Clin Endocrinol Metab*. 2004;89(8):3907-3913. doi:10.1210/jc.2004-0015
 46. Langrish JP, Mills NL, Bath LE, et al. Cardiovascular effects of physiological and standard sex steroid replacement regimens in premature ovarian failure. *Hypertens Dallas Tex 1979*. 2009;53(5):805-811. doi:10.1161/HYPERTENSIONAHA.108.126516
 47. Zaiem F, Alahdab F, Al Nofal A, Murad MH, Javed A. ORAL VERSUS TRANSDERMAL ESTROGEN IN TURNER SYNDROME: A SYSTEMATIC REVIEW AND META-ANALYSIS. *Endocr Pract Off J Am Coll Endocrinol Am Assoc Clin Endocrinol*. 2017;23(4):408-421. doi:10.4158/EP161622.OR
 48. Mohammed K, Abu Dabrh AM, Benkhadra K, et al. Oral vs Transdermal Estrogen Therapy and Vascular Events: A Systematic Review and Meta-Analysis. *J Clin Endocrinol Metab*. 2015;100(11):4012-4020. doi:10.1210/jc.2015-2237

49. Canonico M, Carcaillon L, Plu-Bureau G, et al. Postmenopausal Hormone Therapy and Risk of Stroke: Impact of the Route of Estrogen Administration and Type of Progestogen. *Stroke*. 2016;47(7):1734-1741. doi:10.1161/STROKEAHA.116.013052
50. Renoux C, Dell'aniello S, Garbe E, Suissa S. Transdermal and oral hormone replacement therapy and the risk of stroke: a nested case-control study. *BMJ*. 2010;340:c2519. doi:10.1136/bmj.c2519
51. Scarabin PY, Oger E, Plu-Bureau G, ESTrogen and THromboEmbolism Risk Study Group. Differential association of oral and transdermal oestrogen-replacement therapy with venous thromboembolism risk. *Lancet Lond Engl*. 2003;362(9382):428-432. doi:10.1016/S0140-6736(03)14066-4
52. Canonico M, Plu-Bureau G, Lowe GDO, Scarabin PY. Hormone replacement therapy and risk of venous thromboembolism in postmenopausal women: systematic review and meta-analysis. *BMJ*. 2008;336(7655):1227-1231. doi:10.1136/bmj.39555.441944.BE
53. Renoux C, Dell'Aniello S, Suissa S. Hormone replacement therapy and the risk of venous thromboembolism: a population-based study. *J Thromb Haemost JTH*. 2010;8(5):979-986. doi:10.1111/j.1538-7836.2010.03839.x
54. Vinogradova Y, Coupland C, Hippisley-Cox J. Use of hormone replacement therapy and risk of venous thromboembolism: nested case-control studies using the QResearch and CPRD databases. *BMJ*. 2019;364:k4810. doi:10.1136/bmj.k4810
55. Straczek C, Oger E, Yon de Jonage-Canonico MB, et al. Prothrombotic mutations, hormone therapy, and venous thromboembolism among postmenopausal women: impact of the route of estrogen administration. *Circulation*. 2005;112(22):3495-3500. doi:10.1161/CIRCULATIONAHA.105.565556
56. Sweetland S, Beral V, Balkwill A, et al. Venous thromboembolism risk in relation to use of different types of postmenopausal hormone therapy in a large prospective study. *J Thromb Haemost JTH*. 2012;10(11):2277-2286. doi:10.1111/j.1538-7836.2012.04919.x
57. Canonico M, Oger E, Plu-Bureau G, et al. Hormone therapy and venous thromboembolism among postmenopausal women: impact of the route of estrogen administration and progestogens: the ESTHER study. *Circulation*. 2007;115(7):840-845. doi:10.1161/CIRCULATIONAHA.106.642280
58. Shifren JL, Rifai N, Desindes S, McIlwain M, Doros G, Mazer NA. A comparison of the short-term effects of oral conjugated equine estrogens versus transdermal estradiol on C-reactive protein, other serum markers of inflammation, and other hepatic proteins in naturally menopausal women. *J Clin Endocrinol Metab*. 2008;93(5):1702-1710. doi:10.1210/jc.2007-2193
59. O'Connell MB. Pharmacokinetic and pharmacologic variation between different estrogen products. *J Clin Pharmacol*. 1995;35(9S):18S-24S. doi:10.1002/j.1552-4604.1995.tb04143.x
60. de Lauzon-Guillain B, Fournier A, Fabre A, et al. Menopausal hormone therapy and new-onset diabetes in the French Etude Epidemiologique de Femmes de la Mutuelle Générale

- de l'Education Nationale (E3N) cohort. *Diabetologia*. 2009;52(10):2092-2100. doi:10.1007/s00125-009-1456-y
61. Shakir YA, Samsioe G, Nerbrand C, Lidfeldt J, Women's Health in the Lund Area study. Combined hormone therapy in postmenopausal women with features of metabolic syndrome. Results from a population-based study of Swedish women: Women's Health in the Lund Area study. *Menopause N Y N*. 2004;11(5):549-555. doi:10.1097/01.gme.0000133076.09175.6d
 62. Bruschi F, Meschia M, Soma M, Perotti D, Paoletti R, Crosignani PG. Lipoprotein(a) and other lipids after oophorectomy and estrogen replacement therapy. *Obstet Gynecol*. 1996;88(6):950-954. doi:10.1016/s0029-7844(96)00349-3
 63. Colditz GA, Willett WC, Stampfer MJ, Rosner B, Speizer FE, Hennekens CH. Menopause and the risk of coronary heart disease in women. *N Engl J Med*. 1987;316(18):1105-1110. doi:10.1056/NEJM198704303161801
 64. Tikkanen MJ, Nikkilä EA, Kuusi T, Sipinen SU. High density lipoprotein-2 and hepatic lipase: reciprocal changes produced by estrogen and norgestrel. *J Clin Endocrinol Metab*. 1982;54(6):1113-1117. doi:10.1210/jcem-54-6-1113
 65. Chu MC, Cosper P, Nakhuda GS, Lobo RA. A comparison of oral and transdermal short-term estrogen therapy in postmenopausal women with metabolic syndrome. *Fertil Steril*. 2006;86(6):1669-1675. doi:10.1016/j.fertnstert.2006.04.043
 66. Beral V, Million Women Study Collaborators. Breast cancer and hormone-replacement therapy in the Million Women Study. *Lancet Lond Engl*. 2003;362(9382):419-427. doi:10.1016/s0140-6736(03)14065-2
 67. 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(3):448-454. doi:10.1002/ijc.20710
 68. Lyytinen H, Pukkala E, Ylikorkala O. Breast cancer risk in postmenopausal women using estrogen-only therapy. *Obstet Gynecol*. 2006;108(6):1354-1360. doi:10.1097/01.AOG.0000241091.86268.6e
 69. Viuff MH, Stochholm K, Lin A, Berglund A, Juul S, Gravholt CH. Cancer occurrence in Turner syndrome and the effect of sex hormone substitution therapy. *Eur J Endocrinol*. 2021;184(1):79-88. doi:10.1530/EJE-20-0702
 70. Illig R, DeCampo C, Lang-Muritano MR, et al. A physiological mode of puberty induction in hypogonadal girls by low dose transdermal 17 beta-oestradiol. *Eur J Pediatr*. 1990;150(2):86-91. doi:10.1007/BF02072044
 71. Alves ST de F, Gallichio CT, Guimarães MM. Insulin resistance and body composition in Turner syndrome: Effect of sequential change in the route of estrogen administration. *Gynecol Endocrinol Off J Int Soc Gynecol Endocrinol*. 2006;22(10):590-594. doi:10.1080/08916930600929586
 72. MacGillivray MH, Morishima A, Conte F, Grumbach M, Smith EP. Pediatric endocrinology update: an overview. The essential roles of estrogens in pubertal growth,

- epiphyseal fusion and bone turnover: lessons from mutations in the genes for aromatase and the estrogen receptor. *Horm Res.* 1998;49 Suppl 1:2-8. doi:10.1159/000053061
73. Warming L, Ravn P, Christiansen C. Levonorgestrel and 17beta-estradiol given transdermally for the prevention of postmenopausal osteoporosis. *Maturitas.* 2005;50(2):78-85. doi:10.1016/j.maturitas.2004.03.016
 74. Gussinyé M, Terrades P, Yeste D, Vicens-Calvet E, Carrascosa A. Low areal bone mineral density values in adolescents and young adult turner syndrome patients increase after long-term transdermal estradiol therapy. *Horm Res.* 2000;54(3):131-135. doi:10.1159/000053246
 75. Mendelsohn ME, Karas RH. The protective effects of estrogen on the cardiovascular system. *N Engl J Med.* 1999;340(23):1801-1811. doi:10.1056/NEJM199906103402306
 76. Hemelaar M, van der Mooren MJ, van Baal WM, Schalkwijk CG, Kenemans P, Stehouwer CDA. Effects of transdermal and oral postmenopausal hormone therapy on vascular function: a randomized, placebo-controlled study in healthy postmenopausal women. *Menopause N Y N.* 2005;12(5):526-535. doi:10.1097/01.GME.0000153888.94399.AF
 77. Maffei S, Mercuri A, Zucchelli GC, Vassalle C. Estrogen therapy effects on different vasoactive factors in recent postmenopausal healthy women. *Int J Cardiol.* 2006;107(2):194-199. doi:10.1016/j.ijcard.2005.03.007
 78. Bloemenkamp KWM, Helmerhorst FM, Rosendaal FR, Vandenbroucke JP. Thrombophilias and gynaecology. *Best Pract Res Clin Obstet Gynaecol.* 2003;17(3):509-528. doi:10.1016/s1521-6934(03)00015-4
 79. Rosendaal FR. Venous thrombosis: the role of genes, environment, and behavior. *Hematol Am Soc Hematol Educ Program.* Published online 2005:1-12. doi:10.1182/asheducation-2005.1.1
 80. Rosendaal FR, Helmerhorst FM, Vandenbroucke JP. Female hormones and thrombosis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2002;22(2):201-210. doi:10.1161/hq0202.102318
 81. Sumino H, Ichikawa S, Kasama S, et al. Effect of transdermal hormone replacement therapy on carotid artery wall thickness and levels of vascular inflammatory markers in postmenopausal women. *Hypertens Res Off J Jpn Soc Hypertens.* 2005;28(7):579-584. doi:10.1291/hypres.28.579
 82. Koster T, Blann AD, Briët E, Vandenbroucke JP, Rosendaal FR. Role of clotting factor VIII in effect of von Willebrand factor on occurrence of deep-vein thrombosis. *Lancet Lond Engl.* 1995;345(8943):152-155. doi:10.1016/s0140-6736(95)90166-3
 83. de Visser MC, Poort SR, Vos HL, Rosendaal FR, Bertina RM. Factor X levels, polymorphisms in the promoter region of factor X, and the risk of venous thrombosis. *Thromb Haemost.* 2001;85(6):1011-1017.
 84. van Hylckama Vlieg A, van der Linden IK, Bertina RM, Rosendaal FR. High levels of factor IX increase the risk of venous thrombosis. *Blood.* 2000;95(12):3678-3682.

85. Vandenbroucke JP, Koster T, Briët E, Reitsma PH, Bertina RM, Rosendaal FR. Increased risk of venous thrombosis in oral-contraceptive users who are carriers of factor V Leiden mutation. *Lancet Lond Engl.* 1994;344(8935):1453-1457. doi:10.1016/s0140-6736(94)90286-0
86. Martinelli I, Taioli E, Bucciarelli P, Akhavan S, Mannucci PM. Interaction between the G20210A mutation of the prothrombin gene and oral contraceptive use in deep vein thrombosis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 1999;19(3):700-703. doi:10.1161/01.atv.19.3.700
87. Koster T, Rosendaal FR, de Ronde H, Briët E, Vandenbroucke JP, Bertina RM. Venous thrombosis due to poor anticoagulant response to activated protein C: Leiden Thrombophilia Study. *Lancet Lond Engl.* 1993;342(8886-8887):1503-1506. doi:10.1016/s0140-6736(05)80081-9
88. Bertina RM, Koeleman BP, Koster T, et al. Mutation in blood coagulation factor V associated with resistance to activated protein C. *Nature.* 1994;369(6475):64-67. doi:10.1038/369064a0
89. Rosendaal FR, Koster T, Vandenbroucke JP, Reitsma PH. High risk of thrombosis in patients homozygous for factor V Leiden (activated protein C resistance). *Blood.* 1995;85(6):1504-1508.
90. Poort SR, Rosendaal FR, Reitsma PH, Bertina RM. A common genetic variation in the 3'-untranslated region of the prothrombin gene is associated with elevated plasma prothrombin levels and an increase in venous thrombosis. *Blood.* 1996;88(10):3698-3703.
91. Colucci M, Binetti BM, Tripodi A, Chantarangkul V, Semeraro N. Hyperprothrombinemia associated with prothrombin G20210A mutation inhibits plasma fibrinolysis through a TAFI-mediated mechanism. *Blood.* 2004;103(6):2157-2161. doi:10.1182/blood-2003-06-2169
92. von Ahsen N, Oellerich M. The intronic prothrombin 19911A>G polymorphism influences splicing efficiency and modulates effects of the 20210G>A polymorphism on mRNA amount and expression in a stable reporter gene assay system. *Blood.* 2004;103(2):586-593. doi:10.1182/blood-2003-02-0419
93. Rosendaal FR. Risk factors for venous thrombotic disease. *Thromb Haemost.* 1999;82(2):610-619.
94. Tait RC, Walker ID, Perry DJ, et al. Prevalence of antithrombin deficiency in the healthy population. *Br J Haematol.* 1994;87(1):106-112. doi:10.1111/j.1365-2141.1994.tb04878.x
95. Tait RC, Walker ID, Reitsma PH, et al. Prevalence of protein C deficiency in the healthy population. *Thromb Haemost.* 1995;73(1):87-93.
96. Lensen RP, Rosendaal FR, Koster T, et al. Apparent different thrombotic tendency in patients with factor V Leiden and protein C deficiency due to selection of patients. *Blood.* 1996;88(11):4205-4208.

97. de Groot PG, Lutters B, Derksen RHWM, Lisman T, Meijers JCM, Rosendaal FR. Lupus anticoagulants and the risk of a first episode of deep venous thrombosis. *J Thromb Haemost JTH*. 2005;3(9):1993-1997. doi:10.1111/j.1538-7836.2005.01485.x
98. Jick H, Slone D, Westerholm B, et al. Venous thromboembolic disease and ABO blood type. A cooperative study. *Lancet Lond Engl*. 1969;1(7594):539-542. doi:10.1016/s0140-6736(69)91955-2
99. Fermo I, Vigano' D'Angelo S, Paroni R, Mazzola G, Calori G, D'Angelo A. Prevalence of moderate hyperhomocysteinemia in patients with early-onset venous and arterial occlusive disease. *Ann Intern Med*. 1995;123(10):747-753. doi:10.7326/0003-4819-123-10-199511150-00002
100. Simioni P, Prandoni P, Burlina A, et al. Hyperhomocysteinemia and deep-vein thrombosis. A case-control study. *Thromb Haemost*. 1996;76(6):883-886.
101. Kluijtmans LA, den Heijer M, Reitsma PH, Heil SG, Blom HJ, Rosendaal FR. Thermolabile methylenetetrahydrofolate reductase and factor V Leiden in the risk of deep-vein thrombosis. *Thromb Haemost*. 1998;79(2):254-258.
102. Den Heijer M, Lewington S, Clarke R. Homocysteine, MTHFR and risk of venous thrombosis: a meta-analysis of published epidemiological studies. *J Thromb Haemost JTH*. 2005;3(2):292-299. doi:10.1111/j.1538-7836.2005.01141.x
103. Abdollahi M, Cushman M, Rosendaal FR. Obesity: risk of venous thrombosis and the interaction with coagulation factor levels and oral contraceptive use. *Thromb Haemost*. 2003;89(3):493-498.
104. Kemmeren JM, Algra A, Meijers JCM, Bouma BN, Grobbee DE. Effect of second- and third-generation oral contraceptives on fibrinolysis in the absence or presence of the factor V Leiden mutation. *Blood Coagul Fibrinolysis Int J Haemost Thromb*. 2002;13(5):373-381. doi:10.1097/00001721-200207000-00001
105. Daly E, Vessey MP, Hawkins MM, Carson JL, Gough P, Marsh S. Risk of venous thromboembolism in users of hormone replacement therapy. *Lancet Lond Engl*. 1996;348(9033):977-980. doi:10.1016/S0140-6736(96)07113-9
106. Rovinski D, Ramos RB, Figuera TM, Casanova GK, Spritzer PM. Risk of venous thromboembolism events in postmenopausal women using oral versus non-oral hormone therapy: A systematic review and meta-analysis. *Thromb Res*. 2018;168:83-95. doi:10.1016/j.thromres.2018.06.014
107. Mah PM, Webster J, Jönsson P, Feldt-Rasmussen U, Koltowska-Häggström M, Ross RJM. Estrogen replacement in women of fertile years with hypopituitarism. *J Clin Endocrinol Metab*. 2005;90(11):5964-5969. doi:10.1210/jc.2005-1207
108. O'Sullivan AJ, Ho KK. Route-dependent endocrine and metabolic effects of estrogen replacement therapy. *J Pediatr Endocrinol Metab JPEM*. 2000;13 Suppl 6:1457-1466. doi:10.1515/jpem-2000-s620

109. Corrao G, Zambon A, Conti V, et al. Menopause hormone replacement therapy and cancer risk: an Italian record linkage investigation. *Ann Oncol Off J Eur Soc Med Oncol*. 2008;19(1):150-155. doi:10.1093/annonc/mdm404
110. Wang Y, Wang W, Feng Y, et al. What is behind the fear of cancer during menopausal hormone therapy in China? *Arch Gynecol Obstet*. 2021;304(5):1353-1361. doi:10.1007/s00404-021-06052-4
111. Santen RJ. Vaginal administration of estradiol: effects of dose, preparation and timing on plasma estradiol levels. *Climacteric J Int Menopause Soc*. 2015;18(2):121-134. doi:10.3109/13697137.2014.947254
112. Lee NK, Cheung MK, Shin JY, et al. Prognostic factors for uterine cancer in reproductive-aged women. *Obstet Gynecol*. 2007;109(3):655-662. doi:10.1097/01.AOG.0000255980.88205.15
113. Sendag F, Terek MC, Karadadas N. Sequential combined transdermal and oral postmenopausal hormone replacement therapies: effects on bleeding patterns and endometrial histology. *Arch Gynecol Obstet*. 2001;265(4):209-213. doi:10.1007/s004040100231
114. Samsioe G, Dvorak V, Genazzani AR, et al. One-year endometrial safety evaluation of a continuous combined transdermal matrix patch delivering low-dose estradiol-norethisterone acetate in postmenopausal women. *Maturitas*. 2007;57(2):171-181. doi:10.1016/j.maturitas.2007.01.001
115. Soriano-Guillen L, Coste J, Ecosse E, et al. Adult height and pubertal growth in Turner syndrome after treatment with recombinant growth hormone. *J Clin Endocrinol Metab*. 2005;90(9):5197-5204. doi:10.1210/jc.2005-0470
116. Çakır EDP, Sağlam H, Eren E, Özgür T, Tarım ÖF. Retrospective evaluation of pubertal development and linear growth of girls with Turner Syndrome treated with oral and transdermal estrogen. *J Pediatr Endocrinol Metab JPEM*. 2015;28(11-12):1219-1226. doi:10.1515/jpem-2014-0007