

Il deficit estrogenico come fattore di stress infiammatorio: un'ipotesi patogenetica unificata per l'aumentato rischio osteoporotico e cardiovascolare in postmenopausa.

*Francesco S. Pansini, Carlo M. Bergamini**

Dipartimento di Scienze Biomediche e Terapie Avanzate,

*Dipartimento di Biochimica e Biologia Molecolare, Università degli Studi di Ferrara

“Malattia infiammatoria” e patologie croniche.

E' noto che il processo infiammatorio è il risultato della risposta immunitaria cellulare e umorale nei confronti di agenti aggressivi esogeni (come microbi, virus, sostanze chimiche e inquinanti ambientali/alimentari) o endogeni (come i ROS – Reactive Oxygen Species – coinvolti nello “stress ossidativo”). Tale processo è scatenato dall'azione fisica degli stessi leucociti e da quella chimica delle così dette “molecole infiammatorie” da loro prodotte. Diverse sono le “molecole” coinvolte (anticorpi, citochine, ecc.) e complessi sono i meccanismi a livello biologico-tessutale. Mentre l'infiammazione acuta è caratterizzata dai classici sintomi (calore, dolore, rossore, gonfiore), l'infiammazione cronica tende spesso ad essere clinicamente silente. Quest'ultima è essenzialmente legata al persistere nel tempo nell'organismo degli stessi insulti aggressivi (spesso presenti a livello subliminale) o è legata a un deficit di autoregolamentazione della risposta immunitaria a tali insulti (anche se non più presenti) che risulta sproporzionata ed auto-aggressiva, il più delle volte per un'insufficiente

soppressione della stessa risposta ad opera dei competenti linfociti T (“suppressor T cells”).

Fino ad oggi il concetto di “patologia” è stato essenzialmente incentrato su “patologia d'organo” che si genera, si organizza e si estrinseca per fattori patogenetici specifici intrinseci al tessuto/organo coinvolto. Recenti evidenze, provenienti dalla ricerca di base e clinica, prospettano una possibilità patogenetica alternativa per la quale in un individuo, per varie cause di ordine generale (invecchiamento, modificazioni ormonali, squilibri nutrizionali, presenza di “agenti ambientali” aggressivi), si viene a realizzare una condizione globale persistente di sbilanciamento immunitario (in difetto o in eccesso) in grado comunque di porre le basi per lo sviluppo nell'organismo di una condizione “infiammatoria”. Quest'ultima, nelle fasi iniziali si estrinseca solo a livello biologico (ed è diagnosticabile attraverso il dosaggio di specifici “marker infiammatori” come PCR, omocisteina, IL-6, TNF- α) (1). mentre successivamente, in presenza già di un danno organico, si svela clinicamente in relazione agli organi/tessuti interessati. Tale processo rappresenta quindi un meccanismo

patogenetico comune per lo sviluppo di svariate patologie croniche (come malattia cardiovascolare, osteoporosi, malattia di Alzheimer, diabete, cancro) normalmente considerate, dal punto di vista patogenetico, tra loro indipendenti. Tale ipotesi patogenetica è avvalorata: (i) da dati provenienti da studi osservazionali, come il "Framingham Heart Study" e il "Nurses'Health Study", che dimostrano una più bassa incidenza delle malattie degenerative negli individui che assumono in modo regolare farmaci anti-infiammatori non steroidei (NSAIDs) prescritti solo per alleviare sintomi algici di natura aspecifica; (ii) da evidenze scientifiche che dimostrano l'associazione tra malattia infiammatoria e insorgenza di patologie croniche, come la malattia cardiovascolare l'osteoporosi, la malattia di Alzheimer e condizioni neurovegetative (2-11).

Menopausa e

"malattia infiammatoria cronica"

E' noto che la menopausa è fenomeno endocrino "unico" presente solo nel sesso femminile caratterizzato da un significativo calo della produzione degli ormoni steroidei riproduttivi ed in particolare dell'estradiolo, il principale estrogeno femminile. Il deficit ormonale si instaura in modo repentino nella menopausa chirurgica (ovariectomia bilaterale in donna ancora normalmente mestruante) e spontanea con modalità più lenta e progressiva nella menopausa spontanea (12-14).

Le modificazioni ormonali menopausali sono spesso responsabili dell'insorgenza di

importanti "sintomi climaterici" (vampate di calore, secchezza vaginale, sindrome distrofica uro-genitale). E' osservazione epidemiologica che l'insorgenza della menopausa e la conseguente condizione di carenza estrogenica siano anche significativamente associati con l'insorgenza di svariate patologie cronico-degenerative (come l'osteoporosi, la malattia cardiovascolare, la malattia di Alzheimer) (15-17). Il deficit estrogenico ha un importante ruolo patogenetico nei confronti della comparsa di queste patologie, come anche confermato da diversi studi farmacologici, osservazionali e prospettici sull'effetto protettivo della estrogeno-terapia sostitutiva (18-20). I dati ad oggi disponibili indicano comunque che tale effetto protettivo del trattamento estrogenico sostitutivo sarebbe in grado di manifestarsi solo se la terapia viene iniziata nei tempi iniziali subito dopo la menopausa allorquando non si sono ancora instaurate alterazioni irreversibili a livello d'organo (scheletro, apparato cardiovascolare, sistema nervoso), quando il processo patologico è assente o solo nelle fasi iniziali biologiche di "pre-evento clinico", come recentemente dimostrato per il rischio cardiovascolare (21). Tutto ciò ha fatto prospettare, pur in assenza ancora di sufficienti studi prospettici-controllati, il possibile ruolo dell'estrogeno-terapia sostitutiva nella prevenzione primaria. Tale applicazione della terapia ormonale in menopausa appare ancor più importante alla luce del progressivo aumento dell'aspettativa di vita e della sempre più prolungata

esposizione della donna allo stato di carenza estrogenica postmenopausale, in assenza di una sostanziale variazione dell'età della menopausa (la donna attualmente vive oltre 30 anni "scoperta" dall'effetto protettivo dei suoi estrogeni).

L'incidenza in genere delle patologie infiammatorie è globalmente inferiore nel genere femminile rispetto a quello maschile, verosimilmente per una più spiccata capacità di difesa immunologica presente nella donna rispetto all'uomo (22-24). Tale maggiore reattività, se può da un lato risultare vantaggiosa per la protezione nei confronti di agenti aggressivi esterni (microbi, virus, inquinanti), può dall'altro, in alcuni casi di eccessiva risposta, avere ripercussioni negative sull'organismo con possibili aggressioni autoimmuni. E' noto infatti da tempo che nel sesso femminile l'incidenza delle malattie autoimmunitarie è più elevata rispetto al sesso maschile (23, 25). Infatti, in situazioni in cui gli estrogeni sono più presenti (sindrome dell'ovaio policistico, gravidanza, eccessiva dose terapeutica estrogenica) la donna appare più predisposta all'insorgenza di patologie malattie autoimmuni (23,26, 27). D'altra parte, un più spiccato "stato infiammatorio" nella donna è documentato anche in carenza di estrogeni come in postmenopausa (28, 29) per aumento dell'espressione e della secrezione di svariate citochine pro-infiammatorie (IL-1, IL-6, and TNF) senza, peraltro, che siano apparentemente documentabili nell'organismo la comparsa di nuovi fattori aggressivi. In

postmenopausa lo "stato infiammatorio" sarebbe favorito dalla diminuita risposta di difesa immunologica a causa della carenza estrogenica in presenza di una più spiccata azione aggressiva di diversi fattori già presenti normalmente nell'organismo, ma ora non più in grado di essere controbilanciati da una efficiente difesa immunitaria. Nel lungo periodo, tale condizione di "aggressione" legata al deficit estrogenico è condizione di rischio importante per l'insorgenza di processi patologici degenerativi come la malattia cardiovascolare, l'osteoporosi, la sindrome di Alzheimer (6, 30, 31). Particolare importanza ha lo stress ossidativo come fattore promuovente lo "stato infiammatorio" (3).

Estrogeni e infiammazione.

La correlazione tra estrogeni e infiammazione è ampiamente documentata e particolarmente complessa (32). Gli estrogeni, in relazione ai livelli circolanti, possono agire sia come agenti pro-infiammatori che anti-infiammatori. In caso di un eccessivo livello (per una condizione patologica o per dosi terapeutiche non fisiologiche) gli estrogeni possono svelarsi come agenti pro-infiammatori. In tale situazione il maggior rischio infiammatorio sarebbe legato a una eccessiva risposta immunitaria a stimoli aggressivi endogeni o esogeni eventualmente già presenti (33). Egualmente, in presenza di un deficit estrogenico, come in postmenopausa, nell'organismo femminile tenderebbe a svelarsi uno "stato infiammatorio", legato viceversa ad una eccessiva diminuzione della risposta immunitaria prevalendo questa volta l'azione di

stimoli aggressivi esogeni o endogeni, questi ultimi sempre più presenti nell'organismo con l'avanzare dell'età (34-36). Solo quindi in presenza di livelli fisiologici di estrogeni e di una equilibrata risposta immunitaria è difficile lo sviluppo di uno "stato infiammatorio". Il trattamento ormonale sostitutivo in menopausa, se attuato in modo bilanciato, con dosi solo "sostitutive" di quelle deficitarie utilizzando molecole bio-identiche e vie di somministrazione, come quella transdermica, che rispettano la fisiologia (evitando il "first pass" epatico e il conseguente stimolo alla produzione di molecole pro-infiammatorie) permette alla terapia di estrinsecare gli effetti benefici protettivi e minimizzare i rischi. Esistono evidenze del ruolo degli estrogeni come "anti-infiammatori" a livello di svariati organi (37-39). Le evidenze più rilevanti sono quelle che riguardano il rischio cardiovascolare e quello osteoporotico.

Estrogeni, infiammazione e rischio cardiovascolare.

E' ben noto che la menopausa ed il deficit estrogenico sono significativamente associati a disordini del metabolismo del colesterolo responsabili nella donna dell'aumentato rischio cardiovascolare presente dopo la menopausa (40, 41). L'aumento dello stato infiammatorio in menopausa sembra avere un ruolo importante nell'incremento di tale rischio. Infatti, esiste una correlazione significativa tra incremento delle proteine infiammatorie in coincidenza della transizione menopausale e rischio cardiovascolare. Tale correlazione è

particolarmente evidente per la sICAM-1 (soluble Intercellular Adhesion Molecule), una proteina infiammatoria dimostrata essere fattore indipendente di rischio cardiovascolare (42). Gli estrogeni sono in grado di esercitare sui vasi effetti anti-infiammatori e protettivi attraverso diversi meccanismi (antiossidante, produzione di ossido nitrico, prevenzione dei fenomeni apoptotici, soppressione della produzione di citochine e del sistema renina-angiotensina). D'altra parte, in condizioni particolari (come l'assunzione per via orale) gli estrogeni, divenendo agenti facilitatori la risposta infiammatoria a danno dell'apparato cardiovascolare, favoriscono l'espressione dei recettori pro-infiammatori (ciò permette la glicazione di prodotti terminali tossici), l'aumento della produzione di tirosina nitrata a livello delle proteine cellulari, la produzione di specie reattive dell'ossigeno (ROS) per disaccoppiamento dell'eNOS (39). Alcuni di questi effetti sono mediati dal metabolismo epatico e quindi favoriti dalla via di somministrazione orale. L'assunzione orale degli estrogeni induce infatti l'incremento dei livelli della PCR, della amiloide A, di fattori pro coagulanti (come i frammenti 1+2 della protrombina) e di svariati enzimi che sono coinvolti nei meccanismi di destabilizzazione e rottura delle placche ateromasiche (43).

E' noto inoltre che sovrappeso e obesità sono importanti fattori di rischio cardiovascolare significativamente correlati con la mortalità. Il tessuto adiposo è un'altra sorgente importante di "molecole infiammatorie" (44). In particolare, gli adipociti presenti nel grasso viscerale sono

in grado di rilasciare quantitativi 2-3 volte superiori, rispetto agli adipociti presenti nel grasso sottocutaneo, di Interleukina-6 (IL-6), una delle più importanti molecole infiammatorie (45). Poichè con l'avanzare dell'età e con la menopausa il grasso viscerale tende ad aumentare (46-49), ciò contribuisce ulteriormente all'incremento dei livelli di IL-6 e allo "stato infiammatorio". E' dimostrato che una restituzione ormonale fisiologica, effettuata mediante il trattamento ormonale sostitutivo, può prevenire l'incremento del grasso viscerale e ridurre il rilascio in circolo della IL-6 (50). La presenza di eccessivo grasso viscerale è responsabile dell'aumentato "rischio infiammatorio" non solo attraverso un aumento della produzione di IL-6, ma anche dalla capacità di tale tipo di grasso di "attrarre" dal circolo macrofagi leucocitari e di indurre il rilascio di altre citochine infiammatorie (51). Sembra che gli adipociti, soprattutto viscerali, tendono a rompersi più facilmente; ciò attrarrebbe macrofagi leucocitari verso il tessuto adiposo per intervenire e liberarlo da residui cellulari con conseguente rilascio di "molecole infiammatorie" (52). Tutto ciò spiegherebbe perché, in presenza di elevate quantità di grasso (specie addomino-viscerale), come avviene nel sovrappeso/obesità, sia documentabile una condizione di maggior rischio infiammatorio e trombotico, che risulta ancor più elevato qualora venga prescritta una terapia ormonale per via orale e non sistemica. Il rischio trombotico arterioso, in particolare, appare legato alla "destabilizzazione" di placche

ateromasiche pre-esistenti in conseguenza della aggressione infiammatoria (53-55).

Estrogeni, infiammazione e rischio osteoporotico.

E' definitivamente accertato che gli estrogeni partecipano alla regolazione del metabolismo osseo. Recettori estrogenici specifici sono stati infatti identificati da tempo a livello degli osteoblasti, osteociti e osteoclasti (56-58). Il meccanismo d'azione degli estrogeni a livello osseo coinvolge 2 tipi di recettori solubili il recettore alfa (ER- α) e il recettore beta (ER- β) (59) presenti ambedue sulle cellule ma con una distribuzione non omogenea nel tessuto osseo, essendo il tipo ER- α presente prevalentemente nell'osso corticale e il tipo ER- β soprattutto a livello trabecolare. La componente ossea trabecolare è quella più sensibile alle modificazioni degli estrogeni circolanti ed è per questo motivo che l'osteoporosi postmenopausale (e le conseguenti fratture) colpisce prevalentemente i distretti scheletrici a maggior contenuto di osso trabecolare come i corpi vertebrali e le estremità delle ossa lunghe (collo del femore e polso). Sebbene la maggior parte degli effetti degli estrogeni sul tessuto osseo sia mediata dai recettori nucleari ER, alcuni effetti sono mediati da risposte originate dall'azione degli estrogeni a livello di membrana (effetti di tipo non genomico). Questi effetti sono più rapidi, e tra questi si annovera la capacità degli estrogeni di facilitare l'apoptosi degli osteoclasti e di inibire l'apoptosi degli osteoblasti (60). Tale tipo di meccanismo non

A comprova di ciò è anche la recente dimostrazione che farmaci anti-infiammatori, utilizzati nel trattamento della psoriasi e dell'artrite reumatoide contenenti etanercept (Embrex®), sostanza in grado di bloccare l'azione pro-flogistica del TNF- α , sono in grado anche di ridurre drasticamente il riassorbimento osseo (65). Interessanti sono inoltre le relazioni tra infiammazione e "stress ossidativo". Gli estrogeni avrebbero effetto osteoprotettivo anche per la loro attività antiossidante in quanto molecole polifenoliche.

E' dimostrato, infatti, che il deficit estrogenico postmenopausale è responsabile di un aumento dello "stress ossidativo", con eccessiva presenza di specie reattive dell'ossigeno (ROS) (66, 67) e con possibili ripercussioni degenerative a vario livello (apparato muscolo-articolare-scheletrico, cardiovascolare e cerebrale) (68). In particolare, dati sperimentali sull'animale dimostrano che i ROS sarebbero in grado di creare uno "stato infiammatorio" a livello scheletrico attraverso l'attivazione dei linfociti T e la produzione di citochine (con conseguente attivazione osteoclastica e del riassorbimento osseo) attraverso un complesso meccanismo cellulare che coinvolge l'attivazione delle cellule dendritiche D e l'immuno-antigene CD80 (3).

Le relazioni tra ROS e infiammazione sono complesse. I ROS sempre presenti nell'organismo in risposta agli agenti aggressivi endogeni o esogeni, in condizioni fisiologiche sarebbero frenati da un sistema immunitario competente e dalle stesse capacità antiossidanti dell'organismo.

In conclusione, la carenza estrogenica menopausale, inducendo un deficit di risposta immunitaria competente può essere causa dell'aggressione da parte di agenti presenti nell'organismo ma, normalmente, silenti ed in equilibrio con incremento di citochine pro-infiammatorie dirette verso vari distretti e tessuti organici (cardiovascolare, apparato muscolo-oste articolare, sistema nervoso). Una eccessiva presenza di ROS a sua volta ancor più favorisce lo stato infiammatorio e l'aggressione degenerativa. L'apparato cardiovascolare e quello scheletrico sono i più sensibili nei confronti di questo "stato infiammatorio" e delle sue conseguenze. Sulla base di queste nuove evidenze è prospettabile per i prossimi anni sia lo sviluppo di una nuova diagnostica biochimica precoce preventiva basata su "marker infiammatori" e "marker di patologia d'organo" (marker di pre-evento) sia lo sviluppo di nuovi farmaci. Prospettive interessanti si aprono anche per l'utilizzo delle terapie antiossidanti nella prevenzione dell'osteoporosi (69-72).

Bibliografia

1. Browning LM, Krebs JD, Jebba SA. Discrimination ratio analysis of inflammatory markers: implications for the study of inflammation in chronic disease. *Metabolism - Clinical & Experimental*. 2004;53:899-903.
2. Ridker PM, Rifai N, Rose L, et al: Comparison of C-reactive protein and low-density lipoprotein cholesterol levels in the prediction of first cardiovascular events. *N Eng J Med* 2002; 347:1557-1565,
3. Grassi F, Tell G, Robbie-Ryan M, Gao Y, Terauchi M, Yang X, Romanello M, Jones DP, Weitzmann MN, Pacifici R. Oxidative stress causes bone loss in estrogen-deficient mice through enhanced bone marrow dendritic cell activation. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2007;104:15087-15092.
4. Weitzmann MN, Pacifici R. The role of T lymphocytes in bone metabolism. *Immunol Rev*. 2005;208:154-168.
5. Raisz LG. Pathogenesis of osteoporosis: concepts, conflicts, and prospects. *J. Clin. Invest*. 2005;115:3318–3325.
6. Weisman D, Hakimian E, Ho GJ. Interleukins, inflammation, and mechanisms of Alzheimer's disease. *Vitam Horm*. 2006;74:505-530.
7. Griffin WS. Inflammation and neurodegenerative diseases. *Am J Clin Nutr*. 2006;83:470S-474S.
8. Mundy GR. Osteoporosis and inflammation. *Nutr Rev*. 2007;65:S147-S151;
9. Ginaldi L, Di Benedetto MC, De Martinis M. Osteoporosis, inflammation and ageing. *Immunity & Ageing* 2005; 2:14 doi:10.1186/1742-4933-2-14.
10. Danilevicius CF, Lopes JB, Pereira RMR. Bone metabolism and vascular calcification. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research* 2007; 40: 435-442.
11. Kritchevsky SB, Cesari M, Pahor M. Inflammatory markers and cardiovascular health in older adults. Review. *Cardiovascular Research* 2005;66:265– 275.
12. Chakravarti S, Collins WP, Forecast JD, Newton JR, Oram DH, Studd JWW. Hormonal profiles after the menopause. *British Medical Journal*, 1976;2:784-786.
13. Dennerstein L, Wood C, Hudson B, Burrows G. Clinical Features and Plasma Hormone Levels After Surgical Menopause. *Australian and New Zealand Journal of Obstetrics and Gynaecology* 1978;18:202-205.

14. Burger HG, Dudley EC, Hopper JL, Groome N, Guthrie JR, Green A, Dennerstein L. Prospectively measured levels of serum follicle-stimulating hormone, estradiol, and the dimeric inhibins during the menopausal transition in a population-based cohort of women. *J Clin Endocrinol Metab* 1999; 84:4025–4030.
15. Cooper C. The crippling consequences of fractures and their impact on quality of life. *Am J Med* 1997;103:12S–19S.
16. Maxwell SRJ 1998 Women and heart disease. *Basic Res Cardiol* 1998;93 (Suppl 2):79–84.
17. Henderson VW. Alzheimer's disease and other neurological disorders. *Climacteric*. 2007 Oct;10 Suppl 2:92-96.
18. Morales LBJ, Loo KK, Liu H-B, Peterson C, Tiwari-Woodruff S, Voskuhl RR. Treatment with an estrogen receptor ligand is neuroprotective in experimental autoimmune encephalomyelitis. *The Journal of Neuroscience*, 2006;26:6823–6833.
19. Rees M and Stevenson J on behalf of the British Menopause Society Council. Primary prevention of coronary heart disease in women British Menopause Society Council Consensus Statement. *Menopause International* 2008; 14: 40–45.
20. Purdie DW. Role of oestrogen in osteoporosis. What is the role of oestrogen in prevention and treatment of osteoporosis ? *J R Coll Physicians Edinb* 2004;34:18-24.
21. Rossouw JE, Prentice RL, Manson JE, Wu L, Barad D, Barnabei VM, Ko M, LaCroix AZ, Margolis KL, Stefanick ML. Postmenopausal hormone therapy and risk of cardiovascular disease by age and years since menopause. *JAMA*. 2007;297:1465-1477.
22. Grossman CJ. Interactions between the gonadal steroids and the immune system. *Science* 1985;227:257–261.
23. Olsen NJ, Kovacs WJ. Gonadal steroids and immunity. *Endocr Rev* 1996;17:369–384.
24. Berkley KJ, Zalcman SS, Simon VR. Sex and gender differences in pain and inflammation: a rapidly maturing field. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 2006;291:R241–R244.
25. Talal N. Sex steroid hormones and systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum* 1981;24:1054–1056.
26. Bijlsma JW, van den Brink HR. Estrogens and rheumatoid arthritis. *Am J Reprod Immunol* 1992;28:231–234.

27. Cutolo M, Wilder RL 2000 Different roles for androgens and estrogens in the susceptibility to autoimmune rheumatic diseases. *Rheum Dis Clin North Am* 26:825–839.
28. Pacifici R, Brown C, Puscheck E, Friedrich E, Slatopolsky E, Maggio D, McCracken R, Avioli LV Effect of surgical menopause and estrogen replacement on cytokine release from human blood mononuclear cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 1991;88:5134–5138.
29. Pfeilschifter J, Koditz R, Pfohl M, Schatz H. Changes in proinflammatory cytokine activity after menopause. *Endocrine Reviews* 2002;23: 90–119.
30. Kovacs EJ. Aging, traumatic injury, and estrogen treatment. *Exp Gerontol* 2005;40:549–555.
31. Cenci S, Weitzmann MN, Roggia C, Namba N, Novack D, Woodring J, Pacifici R. Estrogen deficiency induces bone loss by enhancing T-cell production of TNF- α . *J. Clin. Invest.* 2000; 106:1229–1237.
32. Straub RH. The complex role of estrogens in inflammation. *Endocrine Reviews* 2007; 28:521–574.
33. Cutolo M, Capellino S, Sulli A, Seriola B, Secchi ME, Villaggio B, Straub RH. Estrogens and autoimmune diseases. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 2006;1089:538–547.
34. Gomeza CR, Plackett TP, Kovacs EJ. Aging and estrogen: modulation of inflammatory responses after injury. *Exp Gerontol.* 2007;42:451–456.
35. Verthelyi D. Sex hormones as immunomodulators in health and disease. *Int Immunopharmacol* 2001;1:983–993.
36. Fahlman MM, Boardley D, Flynn MG, Bouillon LE, Lambert CP, Braun WA. Effects of hormone replacement therapy on selected indices of immune function in postmenopausal women. *Gynecol Obstet Invest* 2000;50:189–193.
37. Vegeto E, Benedusi V, Maggi A. Estrogen anti-inflammatory activity in brain: a therapeutic opportunity for menopause and neurodegenerative diseases. Review. *Front Neuroendocrinol.* 2008;29:507-519.
38. Miller VM, Duckles SP. Vascular actions of estrogens: functional implications. *Pharmacol Rev.* 2008;60:210-241.
39. Chakrabarti S, Lekontseva O, Davidge ST. Estrogen is a modulator of vascular inflammation. *IUBMB Life.* 2008;60:376-382.

40. Pansini F, Bergamini C, Bettocchi S Jr, Basi P, Malfaccini M, Bagni B, Mollica G. Short-term effect of oophorectomy on lipoprotein metabolism. *Gynecol Obstet Invest* 1984;18:134-139.
41. Pansini F, Bonaccorsi G, Calisesi M, Campobasso C, Franze' GP, Gilli G, Locorotondo G, Mollica G. Influence of spontaneous and surgical menopause on atherogenic metabolic risk. *Maturitas* 1993;17:181-190.
42. Stefanska A, Sypniewska G, Senterkiewicz L. Inflammatory markers and cardiovascular risk in healthy polish women across the menopausal transition. *Clinical Chemistry* 2005;51:1893-1895.
43. Dileep VM, Wanpen V. Effects of transdermal estrogen replacement therapy on cardiovascular risk factors. *Treatments in Endocrinology* 2006;5:37-51.
44. Ahima RS, Flier JS. Adipose tissue as an endocrine organ. *Trends Endocrinol Metab* 2000;11:327-332.
45. Fried SK, Bunkin DA, Greenberg AS. Omental and subcutaneous adipose tissues of obese subjects release interleukin-6: depot difference and regulation by glucocorticoid. *J Clin Endocrinol Metab* 1998;83:847-850.
46. Barzilai N, Rossetti L. Relationship between changes in body composition and insulin responsiveness in models of the aging rat. *Am J Physiol* 1995;269:E591-7.
47. Beaufriere B, Morio B. Fat and protein redistribution with aging: metabolic considerations. *Eur J Clin Nutr* 2000;54(Suppl 3):S48-53.
48. Pansini F, Cervellati C, Guariento A, Stacchini MA, Castaldini C, Bernardi A, Bonaccorsi G, Patella A, Bagni B, Mollica G, Bergamini CM. Oxidative stress, body fat composition, and endocrine status in pre- and postmenopausal women. *Menopause*, 2008; 15: 112-118.
49. Cervellati C, Pansini F, Bonaccorsi G, Pascale G, Bagni B, Castaldini C, Ferrazzini S, Ridolfi F, Pedriali M, Guariento A, Bergamini CM. Body mass index is a major determinant of abdominal fat accumulation in pre, peri- and post-menopausal women. *Gynecological Endocrinology*, 2009 (in press).
50. Straub RH, Hense HW, Andus T, Scholmerich J, Riegger GA, Schunkert H. Hormone replacement therapy and interrelation between serum interleukin-6 and body mass index in postmenopausal women: a population-based study. *J Clin Endocrinol Metab* 2000;85:1340-1344.

51. Skurk, T et al. Production and release of macrophage migration inhibitory factor from human adipocytes, *Endocrinology*. 2005;146:1006-1011.
52. Weisberg, SP et al, Obesity is associated with macrophage accumulation in adipose tissue. *J Clin Invest*. 2003;112:1796-1808.
53. Lewandowski KC, Komorowski J, Mikhalidis DP, Bienkiewicz M, Tan BK, O'Callaghan CJ, Lewinski A, Prelevic G, Randeva HS. Effects of hormone replacement therapy type and route of administration on plasma matrix metalloproteinases and their tissue inhibitors in postmenopausal women. *Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism* 2006; 91:3123-3130.
54. Chu MC, Cushman M, Solomon R, Lobo RA. Metabolic syndrome in postmenopausal women: the influence of oral or transdermal estradiol on inflammation and coagulation markers. *Am J Obstet Gynecol*. 2008 May 27. [Epub ahead of print].
55. Canonico M, Plu-Bureau G, Lowe GDO, Scarabin P-Y. Hormone replacement therapy and risk of venous thromboembolism in postmenopausal women: systematic review and meta-analysis. *BMJ* 2008;336:1227-1231.
56. Komm, B.S., et al. Estrogen binding, receptor mRNA, and biologic response in osteoblast-like osteosarcoma cells. *Science*. 1988; 241:81-84.
57. Tomkinson A., Gevers EF, Wit JM, Reeve J, Noble BS. The role of estrogen in the control of rat osteocyte apoptosis. *J. Bone Miner. Res.*1998; 13:1243-1250.
58. Oursler, M.J., Osdoby, P., Pyfferoen, J., Riggs, B.L., and Spelsberg, T.C. Avian osteoclasts as estrogen target cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 1991;88:6613-6617.
59. Kuiper, G.G., Enmark, E., Peltö-Huikko, M., Nilsson, S., and Gustafsson, J.A. Cloning of a novel receptor expressed in rat prostate and ovary. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 1996;93:5925-5930.
60. Kousteni, S., et al. Nongenotropic, sex-nonspecific signaling through the estrogen or androgen receptors: dissociation from transcriptional activity. 2001; *Cell*. 104:719-730.
61. Pansini F, Bergamini CM, Bellinazzi A, Andreoli M, Perri G, Bagni B, Mollica G. Ovarian steroids modulate the action of calcitonin in women. *J Endocrinol* 1988;116, 155-159.

62. Eriksen EF, Langdahl B, Vesterby A, Rungby J, Kassem M. Hormone replacement therapy prevents osteoclastic hyperactivity: a histomorphometric study in early postmenopausal women. *J. Bone Miner. Res.* 1999;14:1217–1221.
63. Ambrogini E, Toraldo G, Marcocci C. Post-menopausal osteoporosis: is it an autoimmune disease? *J Endocrinol Invest.* 2005;28:43-47.
64. Weitzman MN, Pacifici R. Estrogen deficiency and bone loss: an inflammatory tale. *J Clin Invest* 2006;116:1156-1194.
65. Charatcharoenwithaya N, Khosla S, Atkinson EJ, et al. Effect of blockade of TNF- α and interleukin-1 action on bone resorption in early postmenopausal women. *J Bone Miner Res.* 2007;22:724-729.
66. Signorelli SS, Neri S, Sciacchitano S et al. Behaviour of some indicators of oxidative stress in postmenopausal and fertile women. *Maturitas*, 2006;53:77-82.
67. Pansini F, Cervellati C, Guariento A et al. Oxidative stress, body fat composition, and endocrine status in pre- and postmenopausal women. *Menopause: The Journal of The North American Menopause Society* 2008;15:112-118.
68. Pansini F, Mollica G and Bergamini CM. Management of the menopausal disturbances and oxidative stress. *Current Pharmaceutical Design*, 2005;11:2063-2073.
69. Cuzzocrea S, Riley DP, Caputi AP, Salvemini D. Antioxidant Therapy: A New Pharmacological Approach in Shock, Inflammation, and Ischemia/Reperfusion Injury. *Pharmacological Reviews.* 2001;53:135–159.
70. Maggio D, Barabani M, Pierandrei M, Polidori MC, Catani M, Mecocci P, Senin U, Pacifici R, Cherubini A. Marked Decrease in Plasma Antioxidants in Aged Osteoporotic Women: Results of a Cross-Sectional Study. *J Clin Endocrinol Metab* 2003;88:1523–1527.
71. Ozgocmen S, Kaya H, Fadillioglu E, Aydogan R, Yilmaz Z. Role of antioxidant systems, lipid peroxidation, and nitric oxide in postmenopausal osteoporosis. *Mol Cell Biochem.* 2006 Jul 14; [Epub ahead of print].
72. Koh JM, Lee YS, Kim YS, Kim DJ, Kim HH, Park JY, Lee KU, Kim GS. Homocysteine enhances bone resorption by stimulation of osteoclast formation and activity through increased intracellular ROS generation. *J Bone Miner Res.* 2006;21:1003-1011.