

La Pillola per la Pillola

Finalmente anche in Italia arriva la pillola per migliorare compliance e tollerabilità della contraccezione ormonale

PREAMBOLO

L'Italia si conferma agli ultimi posti in Europa per l'utilizzo della contraccezione ormonale, soprattutto per la mancanza di volontà di utilizzare metodi contraccettivi (53%), la mancata conoscenza (38%) e l'errato utilizzo (9%).

Oltre alla paura infondata delle possibili correlazioni tra ormoni e patologia neoplastica, ciò che maggiormente influenza in senso negativo la diffusione della contraccezione ormonale è rappresentato, paradossalmente, da quelli che vengono definiti effetti collaterali "minori": ritenzione idrica e incremento ponderale, tensione mammaria, cefalea e alterazioni dell'umore.

Sebbene tali paure sembrano essere evidenziati principalmente da chi non ha mai usato un contraccettivo ormonale è anche vero che più del 25% delle utilizzatrici manifestano una ridotta tolleranza del trattamento che porta al cambio del tipo di contraccettivo se non addirittura all'interruzione definitiva.

Diversi studi hanno evidenziato il fatto che i contraccettivi orali influenzano lo stato nutrizionale delle donne modificando le cinetiche di assorbimento e metabolismo di particolari Vitamine e Minerali. Una recente Review ha evidenziato quali alterazioni e come esse possano indurre o enfatizzare le problematiche lamentate dalle donne che usano la contraccezione¹.

Una dieta sana, ad alto contenuto di nutrienti, è la migliore protezione contro eventuali problemi nutrizionali correlati all'uso di contraccettivi orali. Purtroppo la biodisponibilità di molti nutrienti dipende molto dalla forma in cui essi si trovano in un dato alimento, inoltre molte donne, e in particolare adolescenti e giovani donne, seguono un'alimentazione non corretta, povera di nutrienti che pertanto predispone ad un maggior rischio di stati carenziali. Anche altri fattori come il fumo di sigaretta, alcune patologie, associati all'uso di contraccettivi orali, concorrono ad esacerbare tali deficienze, per tale ragioni, si raccomandano un'integrazione adeguata per le donne che utilizzano la contraccezione ormonale.

EXECUTIVE SUMMERY

ALTERAZIONE DELL'EQUILIBRIO IDRO-SALINO

L'alterazione dell'equilibrio idro-salino, sebbene possa essere considerato l'effetto secondario meno rilevante da un punto di vista del rischio, rappresenta la causa principale della ridotta compliance delle pazienti che devono o vogliono far uso della contraccezione orale.

Il 75% delle donne, soprattutto tra le più giovanissime, manifestano la preoccupazione della possibile modificazione della propria immagine corporea.

Tale preoccupazione trova un suo fondamento nel fatto che la componente estrogenica delle pillole contraccettive agisce come potente stimolante di angiotensinogeno, con conseguente incremento dei livelli di angiotensina e aldosterone. L'aldosterone agisce sui tubuli renali a livello del tubulo distale e del dotto collettore favorendo il riassorbimento di sodio. Facilita inoltre il successivo rilascio di vasopressina che induce il conseguente riassorbimento di acqua. Tutti questi effetti hanno l'azione comune di aumentare la quantità di liquido nel sangue con conseguente incremento della pressione.

La componente progestinica è un potente antagonista dell'aldosterone, pertanto, agendo sui recettori mineralcorticoidi, previene la ritenzione di sodio. Il risultato è l'attenuazione dell'effetto attivante il sistema renina-angiotensina-aldosterone indotto dagli estrogeni.

Purtroppo la necessità di avere una componente progestinica priva o con ridotta attività androgena ha comportato la perdita anche dell'attività anti-mineralcorticoidi, che giustifica il rischio di ritenzione idrica, cellulite, gonfiore e aumento di peso^{2,3}.

MALASSORBIMENTO DI NUTRIENTI

L'interferenza della pillola contraccettiva su assorbimento e metabolismo di vitamine e minerali è una problematica evidenziata anzitempo, nel 1975 dalla World Health Organization (WHO), in cui si poneva molto l'accento del mantenimento della fertilità dopo assunzione di OC. Negli anni successivi una gran parte di letteratura aveva dimostrato che in effetti le donne che usano la pillola contraccettiva andavano incontro a stati carenziali significativi che potevano essere facilmente compensati da una supplementazione adeguata.

1) ACIDO FOLICO

L'acido folico (Vitamina B9 o folacina), nelle forma attiva di tetraidrofolato ed altri coenzimi, gioca un ruolo cruciale sia come donatore che accettore di unità di carbonio per importanti reazioni enzimatiche, incluse quelle che coinvolgono il metabolismo degli amminoacidi, sintesi di purine e pirimidine e la metilazione del DNA.

Carenze di acido folico comportano una ridotta sintesi di DNA e divisione cellulare. Poiché tale deficienza è più marcata nelle cellule con elevata attività replicativa, quali i globuli rossi e le piastrine, non sorprende che la deficienza di folati dia come primo effetto anemia, leucopenia e trombocitopenia.

Ricordiamo inoltre che la concentrazione plasmatica di folati è inversamente proporzionale ai livelli plasmatici di omocisteina e che l'iperomocisteinemia è correlata all'incidenza di patologie vascolari occlusive⁴.

Lancet nel 1968 riportò un articolo che dimostrava come i livelli sierici di folati fossero più bassi nelle donne che utilizzano la pillola contraccettiva rispetto alle non-users.

Gli stessi Autori dimostrarono che i livelli di folati si riducevano all'aumentare del tempo di utilizzo della pillola e che fossero necessari almeno tre mesi di sospensione per riportare i livelli a valori ottimali.

Questo dato risulta molto interessante se andiamo a considerare l'importante ruolo dell'acido folico nella corretta chiusura del tubo neurale^{5,6}. Donne che volessero interrompere l'uso della pillola per avere una gravidanza (o peggio che restano incinta nonostante la contraccezione) si troverebbero in una situazione di deficienza che metterebbe a forte rischio la salute del feto.

2) VITAMINA B12

La Vitamina B12 (o cobalamina) è un nutriente essenziale perché svolge un ruolo chiave nel metabolismo cellulare, influenzando sintesi e processi di regolazione del DNA, degli acidi grassi e la produzione di energia. Deficienze di cobalamina hanno un forte impatto sul sistema emopoietico e sul sistema nervoso, da qui il rischio di anemia megaloblastica e ancora una volta rischio di difetti del tubo neurale (NTDs).

La sensibilità del sistema ematopoietico è dovuto all'elevato turnover cellulare. Un'inadeguata supplementazione di Vit. B12, comporta elevate anomalie della replicazione del DNA. Una volta che una cellula staminale è impegnata ad entrare in una programmata serie di divisioni cellulari, il difetto nella replicazione cellulare indotto dalla carenza di Vit. B12 porta ad una incapacità della cellula matura a completare la divisione nucleare mentre continua la maturazione citoplasmatica. Questo comporta la produzione di cellule morfologicamente anomale e morte cellulare, un fenomeno noto come ematopoiesi inefficace. Nei casi di deficit di Vit. B12, la maturazione dei globuli rossi è fortemente anormale (eritropoiesi megaloblastica). Altri tessuti con elevato turnover cellulare (es. mucosa ed epitelio cervicale) necessitano di livelli adeguati di Vitamina B12. Uno stato materno inadeguato di Vit. B12, come per l'acido folico, è causa indipendente di rischi per i NTDs.

Molti studi hanno evidenziato la comparsa di deficit di Vit. B12 nelle donne che assumono contraccettivi orali^{7,8,9,10}. Sebbene esista una forte correlazione tra il metabolismo dei folati e la Vit. B12, il meccanismo che causa la riduzione dei livelli di Vit. B12 è indipendente da quello che causa la deficienza di folati, così come la correzione dei livelli di folati non corregge anche i livelli di Vit. B12¹¹. Il meccanismo che comporta la riduzione dei livelli di Vit. B12 non è ancora ben chiaro. Shojania et al, hanno trovato che la capacità legante totale della Vit. B12 risulti ridotta nelle OCs users; i livelli di transcobalamina I, una glicoproteina che serve a proteggere la Vit. B12 dalla degradazione gastrica, risultano essere anch'essi più bassi rispetto alle non-users¹². Poiché gli stessi Autori hanno trovato che l'assorbimento e l'escrezione urinaria di Vitamina B12 nelle donne sotto OC fosse normale e che la carenza plasmatica non correlava con una carenza tissutale, il problema era probabilmente dovuto alla capacità legante della cobalamina e alla riduzione di transcobalamina I.

Poiché l'anemia perniziosa può svilupparsi in donne in età riproduttiva, i ridotti livelli di Vit. B12 che si manifestano nelle utilizzatrici di OC non devono essere trascurati.

3) VITAMINA B2

La Vitamina B2 o riboflavina è nota per il coinvolgimento in processi metabolici vitali, nella produzione di energia,

nella normale funzione cellulare e crescita cellulare.

La Vitamina B2 svolge inoltre un ruolo chiave nella conversione dell'acido folico e della Vit. B6 nelle rispettive forme attive. Ecco perché una riduzione di Vit. B2 è associata in genere ad uno stato di ipovitaminosi generale. Per quel che riguarda in particolare le donne che utilizzano OC un fattore importante è la capacità della vitamina di attenuare l'emicrania indotta dalla terapia ormonale o associata a bassi livelli di Vit. B2¹³.

Numerosi studi hanno evidenziato gli effetti benefici della somministrazione di riboflavina nella prevenzione del mal di testa^{14,15}.

Tale azione sembrerebbe essere legata alla sua capacità di promuovere la fosforilazione ossidativa mitocondriale. In particolare uno studio controllato su 55 pazienti ha evidenziato che 3 mesi di supplementazione con Vit. B2 induce una riduzione significativa degli episodi e durata dell'emicrania ed una riduzione di ricorso alla terapia farmacologica.

Pertanto una supplementazione nelle donne che utilizzano la pillola contraccettiva risulta utile non solo in condizioni di deficienza ma anche a prevenire o mitigare l'emicrania estrogeno-dipendente.

4) VITAMINA B6

Gran parte delle donne che usano contraccettivi orali sviluppano manifestazioni simili a quelli osservati nei casi di carenza di Vitamina B6¹⁶. Si evidenzia un'aumentata escrezione dei metaboliti secondari del triptofano che si corregge tranquillamente con la somministrazione supplementare di Vitamina B6.

Sono state anche riportate alterazioni dell'attività della transaminasi eritrocitaria ed una ridotta saturabilità con piridossal fosfato (PLP). Studi su animali avevano già evidenziato che i composti estrogenici interferiscono con il legame del PLP all'apoenzima in vitro, e che l'attività di numerosi enzimi coinvolti sia nel metabolismo del triptofano che di altri amminoacidi ne viene compromessa.

Gli OC incrementano il fabbisogno di piridossina in quanto inducono la produzione cellulare di quantità maggiori di numerosi metaboliti del triptofano, in particolare acido xantinico e acido chinurenico¹⁷.

Secondo alcuni Autori tale richiesta è indotta dalla componente estrogenica attraverso 2 meccanismi¹⁸:

- gli estrogeni aumentano i livelli di cortisolo circolante che a sua volta aumenta i livelli di triptofano ossigenasi, l'enzima che inibisce la conversione del triptofano in niacina e serotonina; molti degli enzimi coinvolti in questo processo necessitano di Vit. B6 come coenzima;
- I prodotti del metabolismo degli estrogeni interferiscono con il legame tra il coenzima-Vit. B6 e gli enzimi Vit. B6-dipendenti.

La produzione di questi metaboliti, quando raggiungono livelli elevati, possono compromettere la neurotrasmissione. Tale situazione può essere compensata dalla somministrazione di Piridossina.

Un recente studio a larga scala condotto negli USA ha evidenziato che i valori plasmatici di Piridossal-5'-fosfato sono significativamente ridotti nel 75% delle donne che usano OC rispetto alle non-users.

La Vit. B6 è inoltre importante nel mantenimento dei livelli di omocisteina¹⁹, oltre che alla produzione di emoglobina¹⁷.

5) VITAMINA C e VITAMINA E

Gli estrogeni aumentano il metabolismo della Vitamina C determinandone una riduzione sia a livello piastrinico che leucocitario.

Allo stesso tempo è stata riscontrata una riduzione dei livelli ematici di Vitamina E nelle donne sotto OC e tale carenza si manifesta in particolare nelle donne fumatrici.

Entrambe le vitamine sono note per la loro azione antiossidante.

Un recente studio pubblicato su Contraception ha evidenziato un incremento dello stress ossidativo nelle donne che utilizzano la contraccezione ormonale orale a basso dosaggio. In tali donne erano significativamente elevati i livelli di malondialdeide, prodotto ultimo della perossidasi lipidica mentre erano ridotte le attività del glutatione perossidasi e glutatione reduttasi: ne consegue un incremento dello stress ossidativo indotto da terapia ormonale contraccettiva²⁰.

La supplementazione con Vit.E e Vit.C consentiva di prevenire la propagazione di radicali liberi e di ripristinare lo stato ossidativo ottimale in queste donne.

I ridotti livelli di α -tocoferolo (Vit E) che si riscontrano nelle utilizzatrici di OC possono essere concausa dell'aumentata iperattività piastrinica, fattore di rischio trombotico.

La supplementazione con Vitamina E è in grado di compensare tale alterazione²¹.

6) ZINCO

Lo zinco è un minerale essenziale con importanti funzioni biologiche. Si ritrova in numerosi enzimi e ha un ruolo importante nel metabolismo di RNA e DNA, nella trasduzione del segnale e nell'espressione genica. Regola inoltre l'apoptosi. Nel cervello, lo zinco è immagazzinato in vescicole sinaptiche specifiche dei neuroni glutammatergici e gioca un ruolo chiave nella plasticità sinaptica e nei processi d'apprendimento. Alte concentrazioni di zinco si ritrovano nel muscolo, ossa, polmoni, prostata e in parti dell'occhio. Il seme è particolarmente ricco di zinco, infatti è un componente fondamentale per la funzione riproduttiva.

Lo stato di zinco nelle donne che usano OC è stato considerato già dal 1968, evidenziarono come i livelli plasmatici di zinco fossero molto più alti nelle users rispetto alle non-users. Molti studi negli anni successivi hanno confermato i dati precedenti^{22,23,24}. Si pensa che tale riduzione possa riflettere una riduzione dello stato tissutale di zinco dovuta ad alterazioni dell'assorbimento, escrezione o del turnover tissutale. Da qui la necessità di una supplementazione a donne sotto OC.

7) SELENIO

Il selenio è un micronutriente che funziona come cofattore per la riduzione di enzimi antiossidanti, quali il glutatione perossidasi e certe forme di tioredossina reductasi trovata in alcuni animali e piante.

Il selenio ha anche un ruolo nel funzionamento della tiroide in ogni cellula che utilizza gli ormoni tiroidei, partecipando come cofattore per tre noti deiodinasi degli ormoni tiroidei che attivano e disattivano vari ormoni tiroidei e i loro metaboliti. È stato mostrato che la supplementazione con selenio può avere effetti benefici nella tiroidite di Hashimoto, una malattia autoimmune nella quale la tiroide subisce l'attacco da parte di cellule e anticorpi attivati dal sistema immunitario. Infatti è riportata una riduzione del 21% dei livelli di anticorpi perossidasi anti-tiroide in seguito a somministrazione di 0.2 mg di selenio. Poiché il selenio è un importante antiossidante, la sua carenza può incrementare il rischio di cancro e malattie cardiovascolari^{24,25}.

Molti studi indicano che gli OC interferiscono con l'assorbimento del selenio. Hesse et al. hanno condotto uno studio coinvolgendo 200 studentesse, metà delle quali stavano prendendo contraccettivi trifasici a basso dosaggio da almeno 3 mesi. La differenza nelle concentrazioni sieriche di selenio tra i due gruppi si sono rivelate significative²⁶.

8) MAGNESIO

Il magnesio è un elemento essenziale nel sistema biologico. Per esempio, l'ATP, la fonte principale di energia nelle cellule, deve trovarsi legata al magnesio per essere biologicamente attiva. Similmente, il magnesio gioca un ruolo nella stabilità di tutti i composti polifosfati delle cellule, inclusi quelli associati alla sintesi di DNA e RNA. Oltre 300 enzimi richiedono la presenza di ioni magnesio per la loro attività catalitica. Inadeguate quantità di magnesio causano frequentemente spasmi muscolari, e sono associati a malattie cardiovascolari, diabete, ipertensione arteriosa, disturbi d'ansia, emicrania, osteoporosi e infarto cerebrale.

Molti studi hanno evidenziato che gli OC inducono carenze di magnesio. Così come anche il trattamento ormonale con calcio in postmenopausa per la prevenzione dell'osteoporosi riduce i livelli di magnesio. Quando il magnesio si riduce si ha un'alterazione dell'equilibrio Ca^{2+}/Mg^{2+} che influisce sulla coagulabilità del sangue. Pertanto si ipotizza che la riduzione sierica di magnesio è uno dei fattori che possono aumentare il rischio cardiovascolare per le donne che usano OC²⁷.

I dati di letteratura, iniziati nel 1970 mostravano che i contraccettivi orali possono indurre e/o esacerbare carenze nutrizionali significativi che contribuiscono a numerosi effetti avversi. Pertanto la possibilità di prevenire la carenza minerale e vitaminica attraverso la supplementazione con integratori dietetici appropriati dovrebbe essere un approccio di prima linea per i medici. Il supplemento dietetico ideale deve contenere vitamine del gruppo B insieme ad acido folico, Vitamine C ed E, e minerali quali magnesio, zinco e selenio.

IL PRODOTTO

Zyxelle® è una formulazione completa che consente di integrare tutte le vitamine e i minerali il cui assorbimento e metabolismo risultano alterati dall'assunzione della pillola contraccettiva.

Previene le deficienze di Acido folico indotte dalla pillola consentendo, oltre al corretto andamento dei numerosi processi biochimici folato-dipendenti, di ridurre il rischio di malformazioni fetali in caso di interruzione della contraccezione per desiderata gravidanza.

Ripristina livelli adeguati di Vitamina B12 e Vitamina B6, notoriamente ridotti dalla pillola contraccettiva; entrambe queste vitamine sono importanti per prevenire il rischio cardiovascolare e le complicanze fetali in caso di gravidanze successive all'interruzione della pillola. La presenza di Vitamina B2 aiuta a ridurre il rischio di avitaminosi ed a mitigare la cefalea estrogeno-dipendente.

Vitamina C, Vitamina E e Selenio, grazie alla loro azione antiossidante, riducono lo stress ossidativo, che risulta aumentato nelle donne che usano pillole anticoncezionali anche a bassi dosaggi.

La contemporanea presenza di Zinco e Magnesio, i cui livelli plasmatici risultano ridotti dalla terapia ormonale, consente di contrastare le alterazioni indotte dalla loro carenza quali ansia, cardiopatie, osteoporosi e malformazioni fetali in caso di successiva gravidanza.

Oltre alla compensazione nutrizionale, Zyxelle® ,grazie alla presenza della Centella asiatica, migliora il flusso sanguigno riducendo il ristagno nei vasi venosi e mostra un'azione trofica sul tessuto connettivo prevenendo l'indebolimento della parete vasale.

Tali azioni della Centella asiatica rendono Zyxelle® ideale per contrastare la cellulite e la ritenzione idrica indotta dalla pillola contraccettiva così da aumentare la compliance e aderenza alla terapia contraccettiva.

Riferimenti Bibliografici

1. PALMERY M. ET AL. Oral contraceptives and changes in nutritional requirements. *Eur Rev Med Pharmacol Sci.* 2013; 17: 1804-1813.
2. OELKERS W. Antimineralocorticoid activity of a novel oral contraceptive containing drospirenone, a unique progestogen resembling natural progesterone. *Eur J Contracept Reprod Health Care* 2002; 7(Suppl 3): 19-26; discussion 42-13.
3. SMALS AG. Fluid retention with oral contraceptives. *Gynecol Endocrinol* 2000; 14: 476-478.
4. SCOTT JM, WEIR DG. Homocysteine and cardiovascular disease. *Quarterly J Med* 1996: 561-563.
5. WALD NJ, BOWER C. Folic acid and the prevention of neural tube defects. *Br Med J* 1995; 310: 1019-1020.
6. WALD NJ, GILBERTSON MP. Folic acid in prevention of neural tube defects. *Lancet* 1995; 345: 389.
7. WERTALIK LF, METZ EN, LOBUGLIO AF, BALCERZAK SP. Decreased serum B 12 levels with oral contraceptive use. *JAMA* 1972; 221: 1371-1374.
8. PRASAD AS, LEI KY, MOGHISSI KS, STRYKER JC, OBERLEAS D. Effect of oral contraceptives on nutrients. III. Vitamins B6, B12, and folic acid. *Am J Obstet Gynecol* 1976; 125: 1063-1069.
9. WILSON SM, BIVINS BN, RUSSELL KA, BAILEY LB. Oral contraceptive use: impact on folate, vitamin B(6), and vitamin B(1)(2) status. *Nutr Rev* 2011; 69: 572-583.
10. RIEDEL B, BJORKE MONSEN AL, UELAND PM, SCHNEEDE J. Effects of oral contraceptives and hormone replacement therapy on markers of cobalamin status. *Clin Chem* 2005; 51: 778-781.
11. SHOJANIA AM. Oral contraceptives: effect of folate and vitamin B12 metabolism. *Can Med Assoc J* 1982; 126:244-247.
12. SHOJANIA AM, WYLIE B. The effect of oral contraceptives on vitamin B12 metabolism. *Am J Obstet Gynecol* 1979; 135: 129-134.
13. SANPITAK N, CHAYUTIMONKUL L. Oral contraceptives and riboflavine nutrition. *Lancet* 1974; 1: 836-837.
14. BOEHNKE C, REUTER U, FLACH U, SCHUH-HOFER S, EINHÄUPL KM, ARNOLD G. High-dose riboflavin treatment is efficacious in migraine prophylaxis: an open study in a tertiary care centre. *Eur J Neurol* 2004;11:475-7;
15. BREEN C, CROWE A, ROELFSEMA HJ, SALUJA IS, GUENTER D. High-dose riboflavin for prophylaxis of migraine. *Can Fam Physician* 2003;49:1291-3.
16. MCCORMICK D. Vitamin B6. IX ed. *Present Knowledge in Nutrition.* ed. R.R. Bowman B. Washington DC. International Life Sciences Institute; 2006.
17. MACKEY A, DAVIS S, GREGORY J. Vitamin B6. X ed. *Modern Nutrition in Health and Disease.* ed. M. Shils, Shike M, Ross A, Caballero B, Cousins R. Baltimore, MD. Lippincott Williams & Wilkins; 2005.
18. MORRIS MS, PICCIANO MF, JACQUES PF, SELHUB J. Plasma pyridoxal 5'-phosphate in the US population: the National Health and Nutrition Examination Survey, 2003-2004. *Am J Clin Nutr* 2008; 87: 1446-1454.
19. CANDITO M, RIVET R, HERBETH B, BOISSON C, RUDIGOZ RC, LUTON D, JOURNEL H, OURY JF, ROUX F, SAURA R, VERNHET I, GAUCHERAND P, MULLER F, GUIDICELLI B, HECKENROTH H, POULAIN P, BLAYAU M, FRANCANET C, ROSZYK L, BRUSTIE C, STACCINI P, GERARD P, FILLION-EMERY N, GUEANT-RODRIGUEZ RM, VAN OBERGHEN E, GUEANT JL. Nutritional and genetic determinants of vitamin B and homocysteine metabolisms in neural tube defects: a multicenter case-control study. *Am J Med Genet A* 2008; 146A: 1128-1133.
20. ZAL F, MOSTAFAVI-POUR Z, AMINI F, HEIDARI A. Effect of vitamin E and C supplements on lipid peroxidation and GSH-dependent antioxidant enzyme status in the blood of women consuming oral contraceptives. *Contraception* 2012.
21. AFTERGOOD L, ALFIN-SLATER RB. Oral contraceptive-alpha-tocopherol interrelationships. *Lipids* 1974; 9: 91-96.

22. HALSTED JA, HACKLEY BM, SMITH JC, JR. Plasma-zinc and copper in pregnancy and after oral contraceptives. *Lancet* 1968; 2: 278-279.
23. AKINLOYE O, ADEBAYO TO, OGUNTIBEJU OO, OPARINDE DP, OGUNYEMI EO. Effects of contraceptives on serum trace elements, calcium and phosphorus levels. *West Indian Med J* 2011; 60: 308-315.
24. WAPNIR RA. Protein Nutrition and Mineral Absorption. Boca Raton, Florida. CRC Press; 1990.
25. FALLAH S, SANI FV, FIROOZRAI M. Effect of contraceptive pill on the selenium and zinc status of healthy subjects. *Contraception* 2009; 80: 40-43.
26. HEESE HD, LAWRENCE MA, DEMPSTER WS, POCOCK F. Reference concentrations of serum selenium and manganese in healthy nulliparas. *S Afr Med J* 1988; 73: 163-165.
27. SEELIG MS. Increased need for magnesium with the use of combined oestrogen and calcium for osteoporosis treatment. *Magnes Res* 1990; 3: 197-215.