

“SAPIENZA” UNIVERSITA’ DEGLI STUDI DI ROMA
FACOLTA’ DI MEDICINA E CHIRURGIA



Dottorato di Ricerca in Scienze Endocrinologiche,
Metaboliche ed Andrologiche

XXV ciclo

**“Studio in doppio cieco, cross-over, controllato con placebo sugli effetti
della somministrazione acuta di testosterone transdermico sulla funzione
endoteliale in pazienti affetti da ipogonadismo grave”**

Tutor:

Prof.ssa Loredana Gandini

Dottorando:

Dott. Giorgio Fattorini

Co-Tutors:

Prof. Francesco Romanelli

Dott. Antonio Aversa

Anno accademico 2011/'12

INDICE

Capitolo primo

Fisiologia dell'asse Ipotalamo-Ipofisi-Testicolo	3
Gli ipogonadismi	11

Capitolo secondo

Endotelio e disfunzione endoteliale	14
Testosterone e reattività vascolare	19

Capitolo terzo (parte sperimentale)

Obiettivi dello studio	30
Materiali e metodi	30
Risultati	36
Discussione	40
Conclusioni	50

Bibliografia	51
---------------------	-----------

CAPITOLO PRIMO

Fisiologia dell'asse Ipotalamo-Ipofisi-Testicolo

La funzione testicolare è sottoposta ad un controllo endocrino estremamente sensibile, che prende origine principalmente da strutture encefaliche, l'ipotalamo e l'ipofisi, e che assicura il corretto funzionamento delle due principali attività gonadiche: quella dedicata alla produzione di cellule germinali (spermatogenesi o gametogenesi) e l'altra responsabile della sintesi di steroidi sessuali (testosterone). Denominato "asse ipotalamo-ipofisi-testicolo", tale sistema ormonale integrato si comporta secondo un classico meccanismo di "feedback negativo", in cui l'entità dello stimolo ipotalamo-ipofisario si modifica in base alla risposta dell'organo periferico, rappresentato dai testicoli (Allan CA, 2005; Bhasin S, 2008).

Le gonadotropine, l'ormone follicolostimolante (FSH) e l'ormone luteinizzante (LH), così denominate per le funzioni che esercitano a livello ovarico nella donna, sono prodotte e secrete entrambe dalle cellule gonadotrope localizzate nella parte anteriore dell'ipofisi (anche chiamata adenoipofisi) e controllano nell'uomo rispettivamente la spermatogenesi e la steroidogenesi testicolare. La ghiandola ipofisaria rappresenta la stazione di controllo centrale dell'asse endocrino ed è, a sua volta, sottoposta alla regolazione dell'ormone di rilascio delle gonadotropine (GnRH o LHRH), di origine ipotalamica, anche definita gonadorelina.

Il GnRH è un ormone decapeptidico (ovvero costituito da 10 aminoacidi) prodotto da neuroni GnRH-secernenti localizzati principalmente nei nuclei ipotalamici medio-basale ed arcuato, e rilasciato nella circolazione portale ipotalamo-ipofisaria portale in maniera pulsatile.

La secrezione di GnRH è subordinata al controllo esercitato dal sistema kisspeptina-GPR54.

La kisspeptina è il prodotto del gene *KISS1* che mappa sul cromosoma 1q32.1. Il nome *KISS1* deriva dai cioccolatini *kisses* di Hershey, Pennsylvania, la città nella quale il gene è

stato per la prima volta identificato. KISS1 è stato descritto in origine come gene oncosoppressore per la sua capacità di inibire la crescita del melanoma e delle metastasi di cancro della mammella. In seguito è stato dimostrato che la kisspeptina (conosciuta anche come metastina) era il ligando naturale del recettore orfano GPR54 e svolgeva un ruolo importante nell'avviare la secrezione di GnRH alla pubertà (Weinbauer et al. 2010).

Ad ogni picco secretorio di GnRH corrisponde un innalzamento dei livelli circolanti di FSH ed LH. Un *pattern* secretorio del GnRH non fisiologico, ad esempio caratterizzato da picchi secretori di ridotta ampiezza o troppo ravvicinati, o ancora l'assenza di picchi sostituiti da un *pattern* secretorio continuo, determinano una modificazione dell'espressione dei recettori ipofisari, con scarsa stimolazione recettoriale o fenomeni di desensibilizzazione, con conseguente stimolazione ipofisaria non adeguata. Inoltre, le caratteristiche quali-quantitative delle gonadotropine rilasciate dall'ipofisi dipendono dal tipo di secrezione del fattore di rilascio ipotalamico ed, in particolare, dalla durata, dalla frequenza e dall'ampiezza dei picchi secretori di GnRH: gonadotropine di scarsa qualità possono essere biologicamente meno efficaci, con riduzione dell'effetto finale sui tessuti bersaglio. Il testosterone inibisce la secrezione gonadotropinica attraverso un meccanismo di *feedback* negativo, agendo sia in maniera diretta, che dopo conversione a diidrotestosterone (DHT) o aromatizzazione ad estradiolo. Esiste inoltre un *feedback* negativo "corto", esercitato dalle medesime gonadotropine sulla sintesi di GnRH, nonché un *feedback* negativo "ultracorto", attraverso cui il GnRH modula l'attività secretiva degli stessi neuroni GnRH-secernenti.

Numerosi neurotrasmettitori e neuromodulatori si ritiene siano in grado di interferire con la secrezione del GnRH: la noradrenalina ed il neuropeptide Y (NPY) sembrano esercitare un'azione stimolatoria, diversamente dalla interleuchina-1 e dai sistemi dopaminergici, serotoninergici e GABA-ergici che ricoprirebbero un ruolo inibitorio. Altri fattori verosimilmente coinvolti sono i peptidi oppioidi e la leptina, quest'ultima prodotta nel tessuto

adiposo e preposta principalmente al controllo dell'appetito alimentare e della massa corporea.

Il GnRH agisce mediante interazione con uno specifico recettore di membrana: il complesso ormone-recettore, una volta formatosi, mette in moto una serie di eventi che, mediante la produzione di secondi messaggeri (diacilglicerolo ed inositolo-trifosfato) ed incremento delle concentrazioni intracellulari di calcio, determinano infine la pronta sintesi di gonadotropine, poi rilasciate direttamente nel torrente circolatorio.

Il GnRH è capace di modulare il numero e l'attività dei propri recettori; l'effetto di tale peptide dipende dal suo *pattern* secretorio e dalle concentrazioni ematiche raggiunte. In condizioni sperimentali, l'espressione dei recettori è ottimale quando il GnRH è somministrato in maniera pulsatile, mentre un'esposizione continua al GnRH comporta un iniziale provvisorio aumento nella risposta, seguito da un fenomeno persistente di desensibilizzazione recettoriale (fenomeno di *downregulation*). L'utilizzo di farmaci cosiddetti "GnRH analoghi", che trova indicazione ad esempio nella terapia del cancro della prostata, dove si mira alla soppressione dell'ormonosintesi testicolare (castrazione chimica), capaci di determinare un'attivazione tonica, prolungata e sostenuta del recettore, permette di ottenere una progressiva desensibilizzazione del recettore ed, in ultima analisi, la riduzione della sintesi di LH ed FSH.

LH ed FSH sono ormoni glicoproteici secreti dall'ipofisi, preposti al controllo dello sviluppo, della maturazione e della funzione delle gonadi. Condividono la medesima struttura eterodimerica, comune anche all'ormone stimolante la tiroide (TSH) ed alla gonadotropina corionica umana (hCG), che consiste in due catene polipeptidiche, denominate α e β : la subunità α è identica in tutti i membri della famiglia degli ormoni glicoproteici, mentre la subunità β è diversa nei vari ormoni e conferisce specificità di azione. La particolare similitudine strutturale tra LH ed hCG permette ad entrambe di agire sul medesimo recettore.

Completato il processo di sintesi e dopo essere state sottoposte in maniera differenziata a procedimenti di glicosilazione o sializzazione, le gonadotropine vengono immagazzinate all'interno della cellula in granuli, pronte ad essere rilasciate dopo lo stimolo del GnRH.

Il testosterone viene già prodotto dal testicolo fetale durante la decima settimana di gestazione, sotto l'influsso dell'LH fetale e soprattutto dell'hCG materna.

Durante l'infanzia i livelli circolanti di gonadotropine sono particolarmente bassi e la secrezione del GnRH appare estremamente ridotta: la secrezione pulsatile di FSH ed LH diviene evidente al tempo della pubertà, inizialmente durante il riposo notturno ed in seguito progressivamente durante l'intera giornata. Ad eccezione del primo anno di vita, durante il quale si osserva generalmente un transitorio rialzo della testosteronemia, fino all'inizio della pubertà i livelli circolanti di testosterone sono trascurabili: si ipotizza che siano svariati i fattori responsabili del mantenimento di tale stato di quiescenza dell'intero asse ipotalamo-ipofisi-testicoli, che perdura fino al tempo programmato.

Il testosterone rappresenta il principale prodotto testicolare in grado di inibire la secrezione di FSH ed LH nell'uomo. La secrezione di FSH è inoltre sotto il controllo inibitorio di un'altra proteina, l'inibina, prodotta nel testicolo dalle cellule di Sertoli.

La determinazione delle concentrazioni ematiche dell'inibina riveste un ruolo estremamente importante nella valutazione della fertilità nell'uomo: i livelli sierici di tale ormone sembrerebbero riflettere l'integrità dell'epitelio germinale e delle cellule di Sertoli, con bassi valori suggestivi di presenza di alterazioni del processo di gametogenesi.

Entrambe le gonadotropine esercitano la loro funzione attivando specifici recettori: questi ultimi, in seguito all'interazione con il ligando specifico, vanno incontro a modificazioni conformazionali che portano all'attivazione della proteina G associata, con successiva produzione di secondi messaggeri (AMP-ciclico) ed attivazione di protein chinasi, il cui compito consiste nella fosforilazione di altre proteine, quali ad esempio enzimi, proteine

strutturali o di trasporto, ed attivatori dei processi di trascrizione genica.

L'LH stimola direttamente le cellule di Leydig a produrre testosterone, mentre l'FSH controlla la spermatogenesi agendo sulle cellule di Sertoli. Nell'uomo entrambe le gonadotropine sono tuttavia necessarie affinché possa aver luogo una corretta spermatogenesi: le evidenze scientifiche finora accumulate indicano che l'LH, il testosterone e l'FSH sono fondamentali non solo per l'induzione alla pubertà di una spermatogenesi qualitativamente e quantitativamente normale, ma anche per il mantenimento della stessa durante l'intero arco di vita.

Studi *in vitro* suggeriscono la possibilità che numerose altre sostanze, sia prodotte localmente a livello del parenchima gonadico (ad esempio, oltre alla già citata inibina, l'attivina, il *Transforming Growth Factor* [TGF α e β], il *Nerve Growth Factor* [NGF], l'*Insulin-Like Growth Factor I* [IGF-I], ecc.), che prodotte in tessuti extragonadici (come gli oppioidi, la somatoliberina [GHRH], la corticoliberina [CRH], la corticotropina [ACTH], il GnRH, la renina, l'angiotensina, ecc.), possano intervenire sui meccanismi di comunicazione tra cellule, tra i compartimenti interstiziale (Leydig) e tubulare, ed infine tra cellule di Sertoli e cellule della linea germinale; tali fattori quindi sarebbero presumibilmente in grado di modulare/mediare l'attività degli ormoni sopracitati.

La steroidogenesi testicolare utilizza come substrato il colesterolo, sintetizzato *ex novo* o captato dal circolo ematico. Il colesterolo viene convertito a pregnenolone e da questo si giunge al prodotto finale, ovvero il testosterone, steroide a 19 atomi di carbonio, attraverso due vie metaboliche principali, identificate come delta-4 e delta-5 (quest'ultima utilizzata in maniera preferenziale nel testicolo), così denominate in riferimento alla localizzazione del doppio legame all'interno della struttura molecolare dei vari precursori.

Altri ormoni secreti dalle cellule di Leydig sono il progesterone, il 17 α -idrossiprogesterone, l'androstanediolo, l'androstenedione (utilizzato come precursore per la produzione

extratesticolare di estrogeni), il 5 α -diidrotestosterone (DHT), quest'ultimo principalmente prodotto nei tessuti bersaglio (prostata, ecc.).

Il testosterone, secreto nel torrente circolatorio, presenta un ritmo circadiano, con picco nelle ore mattutine, e si trova solo in minima parte libero (circa il 2%), in quanto principalmente circolante in forma legata, o all'albumina (circa 54%) o ad una specifica globulina denominata SHBG (*Sex Hormone Binding Globulin*) (circa 44%). L'affinità di legame del testosterone con l'albumina è circa 100 volte inferiore rispetto all'affinità di legame dell'androgeno con la SHBG: tuttavia, poiché la concentrazione ematica dell'albumina è molto più alta di quella della globulina, la capacità di legame di entrambe le proteine è pressoché sovrapponibile. La sintesi di quest'ultima proteina vettrice dipende da svariati fattori, tra cui i più importanti sono gli estrogeni, con funzione stimolatoria, e gli androgeni come inibitori. Da un punto di vista clinico è estremamente importante sottolineare che le frazioni di testosterone non legate alla SHBG (e quindi quella libera e quella legata all'albumina) rappresentano la quota di ormone biologicamente attivo (ovvero, il testosterone biodisponibile).

Il testosterone dissocia dalla SHBG a livello degli organi bersaglio e diffonde all'interno delle cellule. Il testosterone esercita le sue due principali azioni endocrine, anabolizzante ed androgenizzante, direttamente o previa conversione a DHT (tramite l'intervento dell'enzima 5 α -reduttasi), legandosi ad uno specifico recettore intracellulare, a livello dei tessuti bersaglio (muscolare, adiposo, epatico, pilifero, urogenitale, cerebrale, ecc). Un'ulteriore via metabolica, che ha luogo principalmente nei tessuti periferici, in particolare nell'adipocita, prevede l'aromatizzazione del testosterone ad estradiolo, il quale può influenzare gli effetti dell'androgeno, agendo sia in maniera sinergica che da antagonista. Alcuni effetti attribuiti originariamente al testosterone sono in realtà riconducibili all'azione dell'estrogeno, in particolare a livello osseo; difatti, in presenza di alterazioni della funzione del recettore degli

estrogeni o dell'attività dell'enzima aromatasi, si può osservare mancata/ritardata chiusura delle cartilagini di accrescimento, con un prolungamento anomalo della fase di crescita lineare ossea.

Nei tessuti bersaglio, il testosterone si dissocia dall'SHBG e diffonde all'interno delle cellule. La conversione del testosterone in DHT è organo-dipendente, e si verifica ad esempio nella prostata. Una volta dentro la cellula, il testosterone si lega al suo recettore, il quale interagendo con specifiche sequenze di DNA, acquisisce la capacità di stimolare la sintesi di RNA e dunque di proteine. Difetti nel recettore androgenico, come delezioni o mutazioni inattivanti, possono profondamente pregiudicarne la funzione: il fenotipo risultante, ovvero l'aspetto osservabile dell'individuo portatore di tale difetto genetico, è altamente variabile, con possibilità di condizioni di ridotta virilizzazione fino a forme di femminilizzazione testicolare. In particolare, la sensibilità agli androgeni può essere modulata da polimorfismi funzionali del recettore androgenico, capaci di influenzare la potenza del segnale genomico trasdotto successivo all'interazione con l'androgeno. Uno di questi polimorfismi del recettore androgenico riguarda la sequenza di triplette CAG (poliglutammina) nell'esone 1, il cui numero di ripetizioni è direttamente correlato con i livelli di testosterone (Zitzmann 2009).

Il gene che codifica per il recettore degli androgeni è localizzato sul cromosoma Xq 11-12 e consiste di otto esoni separati da 7 introni che codificano per una proteina di 919 residui amminoacidici con un peso molecolare di 110 kDa. L'esone 1 contiene due catene polimorfiche di glutammine e glicine codificate rispettivamente dalle sequenze CAG e da GGC. La lunghezza della catena poligluttammica presenta una distribuzione normale nella popolazione, con un *range* compreso tra 9 e 36 ripetizioni e una media di 21-22 nella razza Caucasica. La media di ripetizioni CAG cambia significativamente tra le varie etnie: in Africa il numero medio di ripetizioni è di circa 18-20, mentre tra gli Ispanici è di 23. Nell'Est Asiatico questo numero varia intorno alle 21-23 ripetizioni.

Nella popolazione generale, una sequenza di ripetizione delle triplette CAG più corta è associata ad una attivazione di trascrizione da parte del recettore androgenico più alta, mentre sequenza di ripetizioni CAG una più lunga è associata a ridotti effetti androgenici, sulla lipidemia (Zitzmann et al. 2001a), sulla reattività vascolare (Zitzmann et al. 2002), sulla densità minerale ossea (Zitzmann et al. 2001b) e sulla spermatogenesi (Ferlin et al. 2004). Inoltre una lunghezza della sequenza superiore alle 40 ripetizioni causa una patologia del motoneurone nota come sindrome di Kennedy (o atrofia muscolare spinale e bulbare) con associata insensibilità androgenica (Aversa et al. 2005).

Il recettore per gli androgeni può essere localizzato non solo nei classici organi androgeno-dipendenti a cui si è precedentemente accennato (muscoli, prostata, vescichette seminali, epididimi e testicoli), ma in numerosi altre sedi, con una distribuzione pressoché ubiquitaria (ad esempio, ipotalamo, ipofisi, rene, milza, cuore, laringe, ecc.). Gli ormoni sessuali maschili ricoprono un ruolo importante in ogni fase di vita, promuovendo, durante la fase embrionale, il processo di differenziazione degli organi sessuali, garantendo durante la pubertà l'induzione della spermatogenesi e la comparsa di tutte quelle modificazioni che conducono l'individuo prepubere al raggiungimento del fenotipo maschile adulto (caratteri sessuali secondari), e mantenendo i caratteri sessuali acquisiti per tutto l'arco di vita.

Il testosterone ed il DHT sono necessari per il normale trofismo di epididimi, vasi deferenti, vescichette seminali e prostata, tessuti che richiedono un continuo contributo ormonale per garantire la loro completa funzionalità: la mancanza di testosterone può determinare una regressione dell'epitelio secernente, che può condurre eventualmente ad aspermia (assenza di eiaculato).

Il testosterone è il principale androgeno presente nel tessuto muscolare, il quale è caratterizzato da una scarsa attività 5α -reduttasica; l'ormone esercita effetti anabolizzanti a livello del muscolo liscio, striato ed anche cardiaco, determinando l'aumento della massa

muscolare e dunque anche della massa corporea, per aumento del diametro delle fibre muscolari dovuto alla neoformazione di miofilamenti e alla divisione delle preesistenti miofibrille ingrandite.

Altri effetti sistemici degli androgeni sono dovuti alla stimolazione del midollo osseo (eritropoiesi), dell'unità pilo-sebacea (produzione di sebo e crescita di pelo terminale), dell'osso (maturazione scheletrica e mantenimento della corretta densità minerale), del metabolismo lipidico, della laringe (accrescimento in lunghezza durante la pubertà), e del sistema nervoso centrale (comportamento sessuale, libido, aggressività, agonismo, performance atletica).

Gli Ipogonadismi

Gli ipogonadismi maschili costituiscono un vasto capitolo dell'endocrinologia, comprendente numerosi quadri clinici accomunati dalla presenza di un'insufficienza testicolare, con coinvolgimento del compartimento interstiziale (leydigiano) e/o della componente tubulare e, dunque, produzione deficitaria di ormoni sessuali e/o di spermatozoi (Darby E, 2005; Seftel AD, 2006a; Seftel AD, 2006b).

Le principali categorie di ipogonadismo sono rappresentate dalle forme primitive, caratterizzate da un danno testicolare primario (ipogonadismo ipergonadotropo), e dalle forme secondarie o centrali, in cui il difetto va ricercato a livello ipotalamo-ipofisario, riconducibile ad un'inadeguata secrezione ipofisaria di LH/FSH (ipogonadismo ipogonadotropo), e nelle quali la funzionalità testicolare risulta virtualmente conservata e dunque potenzialmente evocabile se adeguatamente stimolata (Tab.1).

L'ipogonadismo, a prescindere dalla natura, può essere congenito o acquisito, e pertanto presentarsi in epoca pre- o post-puberale: il danno prodotto dal deficit di testosterone sarà tanto più evidente quanto più precoce è l'età d'insorgenza. Nel primo caso, il paziente

presenterà segni deboli o assenti di sviluppo sessuale, con assenza di peli nelle zone androgeniche (viso, petto, pube, ecc.), voce con persistente tonalità alta, mancato sviluppo tonico-trofico delle masse muscolari, *habitus* “eunucoide” (elevata statura e caratteristica sproporzione tra lunghezza del tronco e degli arti), conseguenza di una ritardata saldatura delle cartilagini di accrescimento, testicoli e pene dalle dimensioni ridotte (infantili).

Nel caso di un ipogonadismo con esordio post-puberale, sarà possibile osservare un quadro clinico relativamente meno drammatico rispetto al precedente, con lenta ma progressiva perdita dei caratteri sessuali secondari acquisiti, con diradamento dell'apparato pilifero, riduzione del tono/trofismo muscolare, eventualmente calo del desiderio sessuale, disfunzione erettile, riduzione dell'eiaculato, disturbi dell'umore (depressione), incremento della massa grassa a scapito della massa magra, riduzione della densità minerale ossea, dismetabolismo glico-lipidico con incremento del rischio cardiovascolare etc.

Entità nosografica distinta dalle forme di ipogonadismo maschile finora descritte, l'ipogonadismo ad esordio tardivo (*Late Onset Hypogonadism*, LOH), di frequente riscontro nell'uomo con l'avanzare dell'età, si manifesta con un quadro clinico riconducibile al deficit androgenico e che, oltre a comprendere tipicamente turbe della funzione sessuale (diminuzione della libido e disfunzione erettile) e modificazioni metaboliche responsabili di incremento ponderale (obesità viscerale) e riduzione della massa corporea magra con proporzionale deterioramento della *performance* muscolare, si può completare con sintomi più subdoli, che possono creare difficoltà in termini di diagnostica differenziale: disturbi neurovegetativi (vertigini, alterazioni spazio-temporali), psico-affettivi (depressione) e cognitivi (turbe della memoria) (Romanelli et al. 2010; Latini et al. 2002).

Tab.1 Classificazione dell'ipogonadismo maschile

Malattie ipotalamo-ipofisarie (ipogonadismo ipogonadotropo)

- Panipopituitarismo
- Tumori (craniofaringioma, adenoma ipofisario, ecc.)
- Iatrogeno (chirurgia a carico della regione ipotalamo-ipofisaria, radioterapia, farmaci, ecc.)
- Deficit di GnRH
 - Con normale senso dell'olfatto
 - Con iposmia o anosmia (sindrome di Kallmann)
- Ipogonadismi secondari incompleti
 - deficit isolato di FSH
 - deficit isolato di LH (sindrome dell'eunuco fertile)
- Sindrome rare (Prader-Willi, Laurence-Moon Bardet-Biedl, Mobius, Lowe)
- Atassia cerebellare
- Patologie infiltrative (emocromatosi, istiocitosi X, ecc.)
- LH biologicamente inattivo
- Iperprolattinemia
- Pubertà ritardata costituzionale
- Malattie sistemiche croniche

Anomalie Gonadiche (ipogonadismo ipergonadotropo)

- Sindrome di Klinefelter
- Altri difetti cromosomici (maschio XX, ecc.)
- Anorchia bilaterale
- Aplasia delle cellule di Leydig
- Criptorchidismo
- Sindrome di Noonan
- Distrofia miotonica
- Insufficienza dei tubuli seminiferi dell'adulto
- Difetti della biosintesi degli androgeni

Difetti dell'azione androgenica

- Insensibilità agli androgeni

Miscellanea

- Idiopatico
- Ipogonadismo ad esordio tardivo (LOH)
- Ipogonadismo correlato all'esercizio
- Ipogonadismo derivante dall'abuso di steroidi anabolizzanti-androgenizzanti (AAS)
- Ipogonadismo secondario associato ad obesità (MOSH)

CAPITOLO SECONDO

Endotelio e disfunzione endoteliale

L'endotelio consiste in un singolo strato cellulare che riveste la superficie luminale dei vasi sanguigni. In condizioni fisiologiche, un endotelio sano funziona da membrana anticoagulante, esercitando effetti fibrinolitici, anticoagulanti ed antiaggreganti. Tali effetti si realizzano attraverso l'espressione, da parte di cellule endoteliali integre, dell'anti-trombina III (che inibisce la conversione del fibrinogeno in fibrina), di molecole eparino-simili (che potenziano l'attività dell'anti-trombina III), dell'inibitore della via del fattore tissutale (che inattiva la via estrinseca) e dell'attivatore tissutale del plasminogeno (tPA). In aggiunta, le cellule endoteliali legano la trombina, attivano la proteina C ed eventualmente inattivano l'inibitore dell'attivatore del plasminogeno (PAI-1) (Kharbanda e Deanfield, 2001). Durante la risposta emodinamica, le cellule endoteliali producono componenti chiave dell'attivazione ed aggregazione delle piastrine, inclusi il fattore di von Willebrand, la fibronectina e la trombospondina, dando l'avvio alla cascata coagulativa (Sagripanti e Carpi, 2000). Tali processi sono estremamente importanti in quanto la formazione del trombo è un momento critico nella progressione dell'aterosclerosi.

L'endotelio regola la tras migrazione delle cellule circolanti attraverso un complesso sistema di molecole intercomunicanti. Le cellule endoteliali reclutano cellule infiammatorie esprimendo molecole di adesione cellulare (CAMs) come la selettina e le molecole di adesione cellulare appartenenti alla superfamiglia delle immunoglobuline, e rispondendo a segnali favorevoli l'adesione cellulare derivanti dalle citochine circolanti (Panés et al. 1999). Anche le piastrine possiedono ampie capacità di segnalazione endoteliale, che includono il rilascio di agenti vasodilatanti (come l'adenosina difosfato e la serotonina), ed anche di agenti

vasocostrittori e procoagulanti (quali l'endotelina-1 e il fattore di von Willebrand). L'endotelio vascolare inoltre gioca un ruolo determinante nella vasodilatazione. L'ossido nitrico (NO), il *gasotransmitter* più studiato e ritenuto il principale responsabile della vasodilatazione, è anche noto per le sue capacità di inibire l'aggregazione/attivazione piastrinica, la proliferazione della muscolatura liscia vasale, l'adesione dei leucociti, e l'ossidazione delle lipoproteine a bassa densità, tutti eventi capaci di contribuire alla progressione degli stati della patologia cardiovascolare. La sintasi endoteliale dell'ossido nitrico (eNOS), una delle tre isoforme della sintasi dell'ossido nitrico (NOS), è il maggior responsabile della produzione di NO a livello endoteliale, ed ha come substrato la L-arginina (Vane et al. 1990). La biodisponibilità dell'NO può essere aumentata incrementando la sua produzione o riducendo la sua inattivazione. In quanto gas capace di diffondere liberamente, l'NO agisce non solo all'interno del lume ma anche sulle circostanti cellule muscolari lisce, all'interno delle quali determina un incremento della produzione di guanosina monofosfato ciclico (cGMP) da cui deriva vasodilatazione. In contrasto, l'endotelio produce anche ormoni ad azione vasocostrittiva conosciuti come endoteline (Maas et al. 2002).

Numerosi fattori di rischio cardiovascolare, quali l'età, il vizio tabagico, l'ipertensione, la dislipidemia ed il diabete mellito, insieme ad altri fattori di rischio meno tradizionali, quali l'infiammazione, l'ipossia, lo stress ossidativo e l'iperomocisteinemia, sono collegati alla disfunzione endoteliale. La disfunzione endoteliale è inoltre una caratteristica delle sindromi coronariche acute, dell'insufficienza cardiaca, del danno da ripercussione, dell'insufficienza renale, dei disordini infiammatori sistemici e della disfunzione erettile. La disfunzione endoteliale è caratterizzata da modificazioni significative di alcuni parametri biochimici e fisiologici, quali: rigidità (*stiffness*) vascolare, incremento del tono vascolare, produzione di citochine infiammatorie, incremento della permeabilità, suscettibilità all'invasione di cellule immunitarie, riduzione della crescita delle cellule endoteliali e disregolazione dei fattori

fibrinolitici. Nello specifico, tra i marcatori clinici e biochimici di disfunzione endoteliale si annoverano i seguenti: (i) ridotta espressione ed attività della ossido nitrico sintasi endoteliale (eNOS), ridotta sintesi di NO ed incremento della produzione della dimetilarginina asimmetrica (ADMA), un inibitore endogeno competitivo della eNOS; (ii) incremento della produzione delle specie reattive dell'ossigeno (ROS); (iii) incremento della sintesi e del rilascio del peptide vasocostrittore endotelina-1 (ET-1); (iv) incremento della produzione di citochine infiammatorie, quali interleuchina-6, proteina C reattiva e fattore di necrosi tumorale- α (TNF- α); (v) incremento dell'espressione di marcatori di adesione cellulare quali selettina-E (Blankenberg et al. 2001), molecole di adesione intracellulare (ICAM) (Witte et al. 2003), e molecole di adesione cellulare vascolare (VCAM); (vi) disregolazione dei fattori fibrinolitici quali il fattore di von Willebrand, l'attivatore tissutale del plasminogeno (tPA), e l'inibitore dell'attivatore del plasminogeno (PAI-1); (vii) incapacità di rigenerazione dalle cellule endoteliali progenitrici; (viii) incremento dell'apoptosi endoteliale; (ix) incremento della permeabilità cellulare; e (x) incremento del tono vascolare (Traish et al. 2008). In generale, una riduzione dell'NO determina una disfunzione endoteliale.

La disfunzione endoteliale può essere testata *in vivo* usando numerose tecniche che sono legate principalmente alla misurazione delle modificazioni del calibro arterioso o del flusso in risposta agli stimoli (Farouque et al. 2001). Osservazioni longitudinali hanno confermato che la disfunzione dell'endotelio, sia a livello del circolo coronarico che di quello periferico, è predittiva di eventi cardiovascolari, con sensibilità e specificità maggiori per la disfunzione endoteliale coronarica rispetto a quella arteriosa periferica (Vita et al. 2002).

Lo sviluppo di test clinici atti a valutare le proprietà funzionali di un endotelio, sia esso normofunzionante e attivato o danneggiato, hanno migliorato la comprensione della biologia dell'endotelio vascolare. Esistono tecniche invasive e non invasive impiegabili per esplorare la funzione endoteliale. Generalmente si valuta la funzione endoteliale delle arterie

periferiche; tuttavia, nell'ultimo decennio, sono state sviluppate anche metodologie di investigazione rivolte all'endotelio venoso, invasive e non invasive.

La valutazione della funzione endoteliale coronarica può essere considerata il *gold standard* tra i test della funzione endoteliale (Bonetti et al. 2004). La tecnica impiegata prevede l'infusione di sostanze vasoattive (come l'acetilcolina) direttamente nel circolo coronarico, con successiva misurazione delle modificazioni del calibro dei vasi attraverso un'angiografia coronarica quantitativa (Cox et al. 1989). La risposta vasodilatatoria del vaso testato può essere misurata con l'aiuto di un'ecografia intravascolare. L'agente vasodilatante somministrato attiva le cellule endoteliali e stimola il rilascio di NO. Fisiologicamente, nei pazienti con normale risposta endoteliale, la sostanza somministrata è in grado di determinare una dilatazione del vaso sanguigno con iperemia. Nei pazienti con disfunzione endoteliale, tale processo è disturbato ed il risultato è una ridotta vasodilatazione; in taluni pazienti può verificarsi una vasocostrizione paradossa, che espone pertanto ogni soggetto testato al rischio di ischemia coronarica. Oltre ad essere invasiva, tale tecnica risulta costosa e dunque a tutt'oggi il suo uso risulta piuttosto limitato.

Recentemente sono stati introdotti metodi non invasivi per la valutazione della funzione endoteliale. La misurazione ecografica della capacità dilatatoria indotta dal flusso (*flow-mediated dilatation*, FMD) dell'arteria brachiale è la più comune tecnica usata per valutare la funzione endoteliale. La FMD rappresenta un indice della vasodilatazione NO-mediata endotelio-dipendente. La disfunzione endoteliale si riflette in una peggiore risposta della FMD (Donald et al. 2008; Thijssen et al. 2011). Essendo la disfunzione endoteliale un processo sistemico, e visto che è stata dimostrata una correlazione tra la risposta misurata a livello coronarico e quella rilevata a livello dell'arteria brachiale (Joannides et al. 2006), la valutazione della capacità funzionale endotelio-dipendente delle arterie periferiche rappresenta una finestra diagnostica sullo *status* funzionale dell'intero sistema circolatorio

(Poredos et al. 2002).

La valutazione della reattività vascolare dell'arteria brachiale per via ultrasonografica [*Brachial Artery Ultrasound-FMD (BAUS-FMD)*] si basa sulla metodica descritta da Celermajer et al. (1994): si misura il diametro dell'arteria brachiale, prossimalmente alla fossa antecubitale, in condizione di riposo e durante la fase di iperemia reattiva. Le misurazioni dovrebbero essere eseguite nella fase telediastolica, individuata mediante monitoraggio elettrocardiografico simultaneo. L'iperemia reattiva si ottiene con il rapido sgonfiamento di un bracciale pneumatico a pressione posizionato intorno al braccio stressato (non dominante) e gonfiato precedentemente ad una pressione sovrasistolica per 5 minuti. La capacità di vasodilatazione endotelio-dipendente (indotta dal flusso) è espressa come modificazione del diametro dell'arteria brachiale, misurato in fase telediastolica, durante la fase di iperemia reattiva, rispetto al suo valore basale. Una mancata vasodilatazione dovrebbe suggerire un ridotto rilascio di agenti vasodilatatori endogeni e quindi una condizione di disfunzione endoteliale.

Sono stati introdotti differenti protocolli per misurare la velocità (di flusso) ed il diametro dell'arteria sottoposta a test. La tecnica standard più frequentemente impiegata prevede la determinazione del diametro dell'arteria 60 secondi dopo la disocclusione.

Recentemente, la tonometria arteriosa periferica (PAT), una nuova tecnica operatore-indipendente, è divenuta molto popolare per diagnosticare la disfunzione endoteliale nei pazienti con patologia cardiovascolare (Hamburg et al. 2008).

La PAT valuta l'ampiezza dell'onda pulsatile arteriosa [*pulse wave amplitude (PWA)*] a livello digitale; la metodica, non invasiva, permette la registrazione pletismografica dell'ampiezza dell'onda pulsatile, che corrisponde alle modificazioni del volume ematico pulsatile. L'ampiezza dell'onda pulsatile è valutata prima e durante la fase di iperemia reattiva. I meccanismi fisiologici alla base della risposta della *pulse wave amplitude (PWA)* non sono

stati completamente chiariti.

Anomalie della PWA sono state ampiamente descritte nella circolazione periferica di pazienti con aterosclerosi (Perticoni et al. 2001). Inoltre, l'iperemia reattiva misurata mediante PAT è stata dimostrata essere un adeguato marcatore surrogato utile nel monitorare nel tempo le modificazioni della funzione vascolare; nella coorte Framingham è risultata strettamente correlata ai fattori di rischio cardiovascolari (Bonetti et al. 2004). Una risposta vascolare anormale registrata mediante PAT è stata inoltre mostrata prevalente negli adolescenti con diabete mellito di tipo 1 (Mahmud et al. 2006). Kitta et al. (2009) hanno dimostrato che la valutazione della PWA è in grado di predire eventi futuri avversi in pazienti con patologia coronarica ostruttiva. Vari altri studi hanno inoltre mostrato una relazione tra disfunzione endoteliale coronarica, valutata mediante tecniche invasive, e risultati ottenuti mediante PAT (Bonetti et al. 2004). Dunque, la PAT permette una misurazione della funzione endoteliale fedele, non invasiva e molto più semplificata rispetto alle altre metodiche sopradescritte.

Testosterone e reattività vascolare

Azione androgenica sull'endotelio

Esistono in letteratura evidenze scientifiche cliniche e precliniche che mettono in relazione la disfunzione endoteliale al deficit androgenico (Akishita et al. 2007; Lu et al. 2007; Miller e Mulvagh 2007; Foresta et al. 2008). In studi su modelli animali condotti su cani (Chou et al. 1996) e conigli (Yue et al. 1995), gli autori hanno attribuito i positivi effetti del testosterone (T) sulla circolazione alla stimolazione diretta del NO di origine endoteliale o dei canali del potassio della muscolatura liscia vasale. Geary et al (2000) hanno analizzato in ratti maschi il tono miogenico arterioso cerebrale, riscontrandone una correlazione con la presenza di T. L'effetto del T svaniva dopo rimozione dell'endotelio o mediante inibizione combinata della

ciclossigenasi e dei canali del potassio. Gli autori hanno suggerito che il tono miogenico potrebbe essere indipendente dall'attività della NOS, e sembrerebbe un processo endotelio-dipendente mediato dall'inibizione della ciclossigenasi, dei canali del K⁺ o di entrambi, dato che tale inibizione eliminava ogni differenza tra i gruppi di animali orchiettomizzati trattati con o senza T. In studi preclinici, Lu et al. (2007) hanno esaminato l'endotelio di ratti castrati mediante microscopia elettronica a trasmissione ed hanno dimostrato un danno significativo a carico dell'endotelio, la cui superficie cellulare appariva irregolare. Tali alterazioni venivano parzialmente risolte dal trattamento dei ratti castrati con T o DHT. Tali osservazioni hanno fortemente suggerito che la riduzione delle concentrazioni di T o di DHT potrebbero determinare un danneggiamento ultrastrutturale dell'endotelio aortico.

Liu e Dillon (2002, 2004) hanno dimostrato, con studi *in vitro* condotti su colture di cellule endoteliali bovine ed umane, che concentrazioni fisiologiche di DHEA incrementano acutamente il rilascio di NO da parte di cellule endoteliali vascolari integre, attraverso un meccanismo dipendente dalla membrana plasmatica. Tale azione del DHEA sembrerebbe mediata da un meccanismo dipendente da un recettore di membrana steroideo-specifico accoppiato ad una proteina-G, capace di attivare la NO-sintasi endoteliale (eNOS). Il DHEA è in grado di ripristinare i livelli aortici di eNOS e l'attività della eNOS, suggerendo la capacità dell'androgeno di esercitare effetti diretti genomici e non-genomici sulla parete vasale. Tali meccanismi potrebbero essere alla base di alcuni degli effetti cardiovascolari protettivi proposti per gli androgeni, come esposto da Simoncini (2004) e da Simoncini e Genazzani (2007).

La relazione tra deficit androgenico, disfunzione endoteliale e patologia vascolare è molto complessa ed è stata oggetto di numerose indagini, con risultati a volte contraddittori. L'insulino-resistenza, che è esacerbata dal deficit androgenico, potrebbe essere responsabile della disfunzione endoteliale e della patologia vascolare (Traish et al. 2009b). Tra le

conseguenze cliniche dell'insulino-resistenza si includono la dislipidemia (Ginsberg 2000), l'ipertrigliceridemia (Haffner 2000; Haffner et al. 2000), l'ipertensione e l'anomala reattività vascolare (Reaven et al. 1996) ed inoltre l'infiammazione vascolare e l'aumentato rischio trombotico (Calles-Escandon et al. 1998; Sobel 1999). La disfunzione endoteliale è inoltre associata con dislipidemia, obesità e diabete (McVeigh e Cohn, 2003). I meccanismi alla base della lipotossicità includono lo stress ossidativo ed il *signalling* proinfiammatorio, mentre i meccanismi alla base della glucotossicità includono lo stress ossidativo, la glicazione, l'attivazione della via enzimatica dell'esosamina ed il *signalling* proinfiammatorio (Kim et al 2006). Gli interventi farmacologici dovrebbero incidere su tali meccanismi tra loro sovrapposti che contribuiscono tutti alla genesi della resistenza insulinica e della disfunzione endoteliale. Il colesterolo LDL sembra essere la più importante frazione lipidica in grado di compromettere la funzione dell'endotelio e di promuovere l'aterosclerosi. Fanno parte del gruppo di farmaci al momento disponibili per migliorare la funzione endoteliale di pazienti diabetici l'acido folico, gli inibitori della HMG-CoA reduttasi, gli ACE inibitori, la niacina, la L-arginina, l'insulina e gli insulino-sensibilizzanti e possibilmente gli inibitori della fosfodiesterasi tipo 5 (iPDE5) (Fonseca e Jawa, 2005). Alcuni studi clinici hanno anche dimostrato che semplici correzioni nutrizionali e l'introduzione di esercizio fisico possono positivamente modificare la funzione endoteliale e ridurre l'infiammazione (Esposito et al. 2006).

In uno studio clinico, Akishita et al. (2007) hanno valutato 187 uomini con fattori di rischio coronarico ed hanno riscontrato che la percentuale di FMD rilevata nei soggetti con livelli di T libero nel quartile più basso, risultava 1.7 volte minore della percentuale di FMD rilevata negli uomini con T libero nei quartili più alti. I valori di T (totale e libero) correlavano con la percentuale di FMD, in maniera indipendente da altri fattori di rischio quali età, indice di massa corporea (BMI), ipertensione arteriosa, dislipidemia e diabete mellito. Gli autori hanno

passato in rassegna i vari meccanismi proposti attraverso i quali il T potrebbe influenzare la funzione vasomotoria, differenti nei vari studi citati a seconda della modalità di somministrazione del T. In particolare, alcuni studi hanno evidenziato che i benefici del T, sia somministrato in acuto per via intracoronarica, che addizionato *in vitro* a dosi sovrafisiologiche, potrebbero essere mediati dai flussi ionici attraverso la membrana plasmatica della cellula muscolare liscia, e non attraverso meccanismi dipendenti dall'endotelio o dal recettore androgenico.

Un'altra ipotesi suggestiva è stata presa in considerazione dal gruppo di Foresta et al. (2006), che hanno suggerito che il T potrebbe ridurre il rischio di patologie cardiovascolari attraverso una modulazione dell'attività delle cellule endoteliali progenitrici. Gli autori hanno quindi studiato l'influenza del T sull'azione di riparazione endoteliale svolta dalle cellule endoteliali progenitrici, in 10 soggetti giovani affetti da ipogonadismo ipogonadotropo idiopatico. Il gruppo di ricerca ha dimostrato che il numero di cellule endoteliali progenitrici negli uomini ipogonadici risultava minore rispetto ai soggetti controllo sani e che il trattamento dell'ipogonadismo ipogonadotropo con T in formulazione gel (50 mg die, per 6 mesi) era in grado di determinare un incremento del numero di cellule endoteliali progenitrici circolanti. È interessante menzionare che lo stesso gruppo di ricerca ha presentato nel 2008 dati clinici che dimostravano la capacità degli androgeni di stimolare le cellule endoteliali progenitrici. Poiché l'effetto era completamente abolito dal pre-trattamento con flutamide, molecola ad azione bloccante il recettore androgenico, gli autori concludevano che tale effetto era dovuto all'attivazione del recettore androgenico. I livelli di T utilizzati in questi studi erano stati calcolati per risultare nel *range* fisiologico (Foresta et al 2008).

Uno studio clinico di Malkin et al. (2004b) ha mostrato una riduzione dei livelli di citochine proinfiammatorie, colesterolo totale e trigliceridi in 27 uomini ipogonadici trattati con T. In maniera specifica, i livelli di TNF- α e di IL-1 β risultavano significativamente ridotti dopo 4

settimane di trattamento rispetto alle misurazioni al *baseline*. Gli autori riportavano che tali fattori proinfiammatori si associavano allo sviluppo di placca ateromatosa e che la riduzione degli stessi fattori indotta dal T poteva essere sicuramente benefica in termini di rischio cardiovascolare. In un altro studio gli stessi autori hanno dimostrato una significativa riduzione dei livelli di colesterolo e di TNF- α dopo terapia con T in 10 uomini ipogonadici con angina (Malkin et al. 2004a); inoltre, negli stessi soggetti, si è osservato un miglioramento della soglia ischemica dopo terapia con T.

È stato dimostrato, attraverso misurazioni della vasoreattività arteriosa brachiale, che il T è capace di determinare effetti positivi sulla funzione dell'endotelio in uomini con patologie cardiovascolari (Kang et al. 2002). I soggetti in questione sono stati sottoposti a trattamento con T undecanoato per via orale (160 mg die) o a placebo. I pazienti ricevuti il trattamento con T per 12 settimane hanno dimostrato una percentuale di dilatazione flusso-mediata e nitroglicerina-mediata significativamente maggiore rispetto alla risposta osservata nei soggetti ricevuti placebo.

Polderman et al. (1993) hanno suggerito che i livelli plasmatici di T potrebbero essere in grado di modulare i livelli di endotelina, dopo aver osservato che questi risultavano più elevati negli uomini rispetto che nelle donne, come per differente regolazione da parte degli ormoni sessuali. Gli autori hanno ipotizzato che l'endotelina, nota per la sua potente azione vasocostrittrice, potrebbe influenzare il tono miogenico vascolare attraverso variazioni delle concentrazioni intracellulari di calcio $[(Ca^{2+})_i]$ e di altri secondi messaggeri, contribuendo all'insorgenza delle patologie cardiovascolari. Al contrario, Kumanov et al. (2002) hanno mostrato che l'ipogonadismo può associarsi ad un incremento significativo dei livelli plasmatici di endotelina. Inoltre, in un altro studio, la castrazione di ratti maschi ha causato un incremento dei livelli di endotelina, a suggerire la possibilità che gli androgeni intervengano nella modulazione della sintesi di endotelina (Ajayi et al. 2004). L'argomento pertanto è

ancora controverso e merita ulteriori ricerche che possano chiarire i reali rapporti tra androgeni ed endotelina.

In uno studio clinico condotto su pazienti maschi con patologia coronarica, Fu et al. (2008) hanno evidenziato una correlazione inversa fra i livelli circolanti di T libero e sia i livelli della molecola di adesione VCAM-1 che lo spessore intima-media (IMT), entrambi indicatori di disfunzione endoteliale. VCAM-1 è prodotta dalle cellule endoteliali e potrebbe giocare un ruolo decisivo nei processi aterosclerotici ed infiammatori, poiché facilita l'adesione e la migrazione dei monociti circolanti attraverso l'endotelio alterato. In maniera interessante, tuttavia, un più recente studio condotto da Webb et al (2008) non ha riscontrato il trattamento con T in grado di influenzare la funzione endoteliale: non è stata riportata alcuna modificazione della funzione endoteliale in uomini con patologia coronarica e ridotto T dopo un trattamento orale con T undecanoato per 8 settimane rispetto al placebo.

Sebbene i meccanismi fisiologici e biochimici siano ancora scarsamente compresi, le evidenze scientifiche cliniche e di base evinte dai dati pubblicati finora sono sufficientemente estese da sostenere un'associazione tra deficit androgenico e disfunzione endoteliale.

Azione androgenica sulla funzione della muscolatura liscia vasale

Numerosi studi *in vitro* hanno esaminato i meccanismi fisiologici della vasodilatazione androgeno-mediata in vari vasi sanguigni di origine animale ed umana. Ad esempio, vari studi hanno dimostrato effetti rilassanti del T e del 5 α -DHT sulla muscolatura liscia vascolare e non vascolare, probabile conseguenza di un'inibizione dei canali del calcio di tipo L (Sochorová et al. 1991; Scragg et al. 2004, 2007; Perusquía et al. 2005; Hall et al. 2006; Er et al. 2007; Montaña et al. 2008). In alcuni studi, il 5 α -DHT si è dimostrato più potente del T nel provocare un rilassamento di contrazioni (muscolari) KCl-indotte. Il T, a concentrazioni nanomolari, risultava essere un potente antagonista dei canali del Ca²⁺ voltaggio dipendenti

(L-VOOCs). I dati mostravano che la vasodilatazione indotta dal 5 α -DHT era attribuibile al blocco selettivo dei L-VOOCs, mentre quella indotta dal T implicava meccanismi addizionali dipendenti dalla concentrazione dell'androgeno, con azione antagonista verso i L-VOOCs a basse concentrazioni ed incremento della [Ca²⁺]_i e della produzione di cAMP ad alte concentrazioni. Dati simili sono stati ricavati studiando le coronarie suine nelle quali il T causava vasodilatazione (Hutchison et al. 2005). Analogamente, Cairrão et al. (2008) hanno osservato che il T induce un rilassamento delle arterie ombelicali umane attraverso un meccanismo non genomico, che secondo gli autori può essere mediato dall'attivazione dei canali del potassio calcio-dipendenti ad alta conduttanza (BK[Ca]) e dei canali del potassio voltaggio-dipendenti (Kv). Il coinvolgimento di questi canali nel meccanismo rilassante legato al T è risultato dipendente dalla via metabolica attivata a seconda dell'agente contrattile usato.

Inoltre, Navarro-Dorado et al. (2008) hanno mostrato che il T ed il suo metabolita non aromatizzabile 5 α -DHT sono stati in grado di evocare un rilassamento concentrazione-dipendente di anelli di piccole arterie prostatiche suine precontratti con noradrenalina, mediante un meccanismo endotelio-indipendente. Gli autori hanno suggerito che il T potrebbe esercitare un'azione vasodilatatoria diretta sulle piccole arterie indipendentemente dall'endotelio, mediante blocco dell'ingresso di Ca²⁺ extracellulare attraverso i L-VOOCs. Studi condotti su arterie ombelicali umane hanno mostrato che il T ed il 5 α -DHT sono in grado di determinare vasodilatazione attraverso una via metabolica indipendente dal recettore androgenico (Perusquía et al. 2007). Una vasodilatazione simile è stata anche osservata nelle arterie mammarie interne (Yildiz et al. 2005). In un altro studio il T induceva una risposta rilassante del muscolo liscio di trachea di coniglio; tale effetto era attribuito alla eNOS (Kouloumenta et al. 2006).

È degno di nota il fatto che in vari studi il T si è dimostrato responsabile della vasodilatazione

di vasi “denudati” (Yue et al. 1995, Murphy e Khalil 1999), a suggerire un meccanismo endotelio-indipendente. Webb et al (1999) hanno mostrato che l’infusione di T all’interno dell’arteria coronaria sinistra determinava vasodilatazione ed incremento di flusso. Tep-Areenan et al. (2003) hanno dimostrato che il T è capace di indurre una vasodilatazione acuta di aorta di ratto probabilmente mediata dall’inibizione dell’ingresso di calcio extracellulare e dalla via dei prostanoidei endotelio-derivati. Allo stesso modo, Jones et al. (2004a) hanno suggerito che la vasodilatazione indotta dal T si realizzerebbe attraverso meccanismi non genomici, indipendenti sia dal recettore androgenico che dall’endotelio. Gli autori hanno postulato che l’azione degli androgeni esercitata sul muscolo liscio vasale potrebbe essere mediata da un’azione calcio-antagonista. Malkin et al. (2006a) hanno dimostrato che il T è capace di facilitare la vasodilatazione delle arterie sottocutanee di resistenza di pazienti con insufficienza cardiaca in maniera concentrazione-dipendente. Curiosamente, la terapia con T riduceva la risposta vasodilatatoria all’acetilcolina ed al sodio nitroprussiato ed incrementava la risposta contrattile alla noradrenalina. Tuttavia le dosi di T usate negli studi *in vitro* erano farmacologiche e non fisiologiche, ovvero nell’ordine micromolare, che è ampiamente al di sopra dei livelli fisiologici noti *in vivo*. Inoltre, le arterie di resistenza erano ottenute da pazienti con patologia vascolare, che potrebbero aver alterato l’esito dello studio. In aggiunta, il rimodellamento dei tessuti in risposta agli ormoni steroidei sessuali è un processo a lungo termine e ciò non può essere ignorato nell’interpretazione dei dati ricavati da studi *in vitro*. I dati di questo studio non negano i benefici derivanti dal T sulla funzione vascolare osservati *in vivo*, che tuttavia non possono essere spiegati solo sulla base dei dati di risposta della contrattilità ottenuti *in vitro*.

Yildiz e Seyrek (2007) hanno ipotizzato che, poiché vasi denudati producevano in risposta al T lo stesso risultato di vasi sanguigni integri, il maggior effetto del T sulla muscolatura liscia vasale possa essere diretto. Il meccanismo ipotizzato prevede che il T da un lato attivi i canali

del K^+ incrementandone l'efflusso, dall'altro inibisce i canali del Ca^{2+} , generando iperpolarizzazione e successiva vasodilatazione. Poiché queste modificazioni avvengono in un lasso di tempo di secondi o minuti, è stato suggerito che tale azione sia verosimilmente mediata da interazioni con recettori di membrana (effetto non genomico) piuttosto che con interazioni con il nucleo (effetto genomico). A conferma di tale ipotesi altri studi hanno mostrato la presenza del recettore androgenico sulla membrana delle cellule muscolari lisce vasali (Fujimoto et al. 1994, Benten et al. 1999). I dati provenienti dagli studi *in vitro* suggeriscono che il rilassamento della parete vasale indotto dal T sia legato alla inibizione dell'ingresso di ioni Ca^{2+} nella cellula muscolare liscia (Crews e Khalil 1999, Giannattasio et al. 1999).

Quindi, sulla base dei dati finora raccolti, limitati ed a volte contrastanti tra loro, l'effetto del T sulla reattività vascolare: 1) dovrebbe coinvolgere l'attivazione dei canali del K^+ , 2) richiederebbe l'antagonismo dei canali del Ca^{2+} , 3) sembrerebbe legato a *signaling* non genomico e 4) potrebbe non richiedere l'intervento dell'endotelio.

Studi clinici hanno dimostrato che il T potrebbe avere effetti benefici negli uomini affetti da patologia cardiovascolare. Una serie di lavori di Malkin et al. (2003a,b,c) hanno suggerito che gli uomini con ridotti livelli di T presenterebbero un rischio aumentato di patologia cardiovascolare, e che il trattamento con T potrebbe rappresentare un fattore protettivo contro lo sviluppo di aterosclerosi. Gli autori hanno notato che il trattamento con T era in grado di determinare una riduzione del tratto Q-T negli uomini con insufficienza cardiaca (Malkin et al. 2003a), ed inoltre hanno suggerito che il T potrebbe possedere proprietà immunomodulanti in grado di inibire la formazione della placca ateromatosa e dunque la progressione verso la sindrome coronarica acuta (Malkin et al. 2004a,b). In un successivo *commentary*, Malkin et al. (2003c) hanno riportato evidenze scientifiche a favore di una correlazione inversa tra i livelli endogeni di T e sia la gravità dell'ateroma aortico che la progressione dell'ateroma

aortico, quando valutato radiologicamente. La terapia sostitutiva con T negli uomini ipogonadici si è dimostrata capace di determinare un ritardo del tempo di comparsa di ischemia e di migliorare l'umore ed è stata associata con una riduzione del colesterolo totale e del TNF- α (Malkin et al. 2004a). Inoltre, gli stessi autori hanno pubblicato dati che dimostravano che la terapia con T a dosi fisiologiche migliorava la sensibilità all'insulina negli uomini con insufficienza cardiaca congestizia di entità moderata-grave (Malkin et al. 2007).

Aversa et al. (2010) hanno valutato gli effetti del trattamento cronico con T undecanoato parenterale (1000 mg/12 settimane) in 50 pazienti ipogonadici affetti da sindrome metabolica. Lo studio, randomizzato-controllato con placebo, ha dimostrato dopo 12 mesi di trattamento con T un marcato miglioramento dell'HOMA (*HOMeostatic Model Assessment*) index, dello spessore medio-intimale carotideo e dei livelli di PCR ad alta sensibilità, rispetto al placebo.

In uno studio clinico Malkin et al. (2006b) hanno riportato che la terapia con T in uomini con insufficienza cardiaca moderata-grave risultava sicura, senza eccesso di eventi avversi: il trattamento androgenico cronico (12 mesi) migliorava la capacità funzionale, la capacità di esercizio ed i sintomi di insufficienza cardiaca, con miglioramento di almeno una classe funzionale nel 35% dei soggetti. In maniera simile Webb et al. (2008) hanno dimostrato che la somministrazione cronica di T undecanoato orale era in grado di esercitare modesti e selettivi effetti potenzianti la perfusione di miocardio fornito da arterie coronarie non ostruite; inoltre hanno suggerito che la riduzione legata al trattamento con T undecanoato della *stiffness* arteriosa basale poteva parzialmente spiegare gli effetti del T esogeno precedentemente mostrati sui segni di ischemia miocardica indotta dall'esercizio.

Jones et al. (2004b) hanno riesaminato il ruolo del T sulla reattività vascolare negli uomini ed hanno citato studi che mostravano che la terapia sostitutiva con T in pazienti maschi sofferenti di patologia cardiovascolare si associava ad un miglioramento della reattività vascolare e della

FMD endoteliale. Gli autori suggerivano che ciò poteva essere vero solo per i vasi sanguigni patologici. Gli autori sottolineavano tuttavia quanto i dati derivanti dagli studi su animali fossero non convincenti e citavano un numero di fonti che fornivano in tal senso risultati positivi, negativi e neutri, a dimostrazione di quanto sia controverso l'argomento inerente l'influenza del T sulla reattività vascolare.

CAPITOLO TERZO

Obiettivi dello studio

Ad oggi, non esistono studi clinici che abbiano indagato i possibili effetti acuti della somministrazione di testosterone transdermico in soggetti maschi affetti da ipogonadismo grave ($<1\text{ng/mL}$). In questo studio abbiamo indagato gli effetti acuti della somministrazione di una formulazione di testosterone transdermico (Tostrex® gel 2%) sulla funzione vascolare in uomini affetti da ipogonadismo grave. Ogni soggetto partecipante ha fornito consenso informato scritto alla partecipazione allo studio.

Materiali e metodi

Sono stati arruolati 10 uomini (età media \pm DS: 31 ± 9) affetti da ipogonadismo grave di diversa origine (valori medi di T = $0.6 \text{ ng/mL} \pm 0.3 \text{ DS}$) dopo un periodo di *wash-out* farmacologico di 4 settimane. Le principali caratteristiche dei soggetti arruolati sono riportate in tabella 2.

I criteri di inclusione erano età maggiore di 18 anni e livelli di testosterone sierico totale $<1 \text{ ng/ml}$ al tempo 0'. I criteri di esclusione erano i seguenti: assenza di storia clinica per cardiomiopatia, ictus, infarto miocardico acuto e trombosi venosa profonda; nessun cambiamento delle terapie farmacologiche eventualmente pre-esistenti negli ultimi 6 mesi; storia clinica di carcinoma prostatico o mammario; valori elevati di PSA (aggiustati per età); esplorazione dito-rettale della prostata suggestiva di carcinoma prostatico; sintomatologia da ipertrofia prostatica benigna grave con sintomi ostruttivi (IPSS >18); ematocrito $> 52\%$ al tempo 0'; storia clinicamente indicativa di patologia epatica, ematologica, renale; iperprolattinemia o altre pa-

tologie endocrine (sindrome sella vuota e patologie espansive ipofisarie valutate mediante risonanza magnetica); qualsiasi altra condizione che precludesse la sicurezza del paziente.

Disegno dello studio

Lo studio, randomizzato, in doppio cieco, *crossover* controllato con placebo, ha utilizzato una dose fissa (4 g al 2%) di T transdermico in formulazione gel (80 mg die di testosterone) o in alternativa una quantità equivalente di placebo gel, per 4 giorni consecutivi. Ciascun soggetto ha ricevuto le medesime informazioni inerenti la corretta modalità di auto-somministrazione del gel, da applicare al mattino (fascia oraria 8:00-9:00), dopo la doccia, con entrambe le mani, su cute glabra, e lavandosi accuratamente le mani dopo ogni applicazione. I soggetti sono stati sottoposti a valutazione della funzione endoteliale con EndoPAT2000 ed a prelievo ematico ai tempi 0, +4 ore e +96 ore (quest'ultimo, prima della somministrazione del gel). Gli ormoni dosati su ciascuno dei prelievi ematici sono i seguenti: testosterone totale, testosterone libero, 17 β -estradiolo, SHBG. Al termine di ciascun trattamento, ogni paziente ha utilizzato il trattamento alternativo dopo aver osservato un periodo di 7 giorni di *wash-out* (Figura 5).

I campioni ematici prelevati sono stati centrifugati ed immediatamente congelati a -20°C. Ogni test è stato eseguito in duplicato. Il T ed il 17 β -estradiolo sono stati misurati con immunodosaggio in chemiluminescenza (CMIA, Architect System, Abbott Laboratories, IL, USA), con limiti di rilevazione di 0.28 nmol/L e 10 pg/mL rispettivamente (coefficienti di variazione intra- ed interdosaggio per il T: 2.1 e 3.6% a 10.08 nmol/L), con valori di norma di 2.8-11 ng/mL (T) e 25-107 pg/mL (E2). Le concentrazioni sieriche di SHBG sono state misurate mediante dosaggio immunoradiometrico (Radim S.p.A., Pomezia, Roma, Italia), con limite di rilevazione di 0.26 nmol/L, coefficienti di variazione intra- ed interdosaggio di 2.8 e 4.1% a 26.4 nmol/L, e valori di norma di 9-54 nmol/L. La determinazione della concentrazione di testosterone libero è stata eseguita con metodica radioimmunologica (RIA)

(DIASource ImmunoAssays S.A. – Louvain-la-Neuve, Belgio), con limite di rilevazione di 0.13 pg/mL, coefficienti di variazione intra- ed interdosaggio di 5.7 e 6.7% a 10.89 pg/mL, e valori di norma di 8.9-42.5 pg/mL.

Il numero di triplette CAG è stato valutato mediante sequenziamento genico del DNA estratto da campioni di sangue. La tipologia di sequenziamento utilizzata è l'analisi dei frammenti che prevede che il DNA da sequenziare sia precedentemente amplificato con un protocollo di PCR. I frammenti marcati con il fluorocromo 6-FAM vengono analizzati con il sequenziatore automatico Genetic Analyzer 3500 (*Applied Biosystems – USA*) e interpretati mediante il software GeneMapper (*Applied Biosystems – USA*).

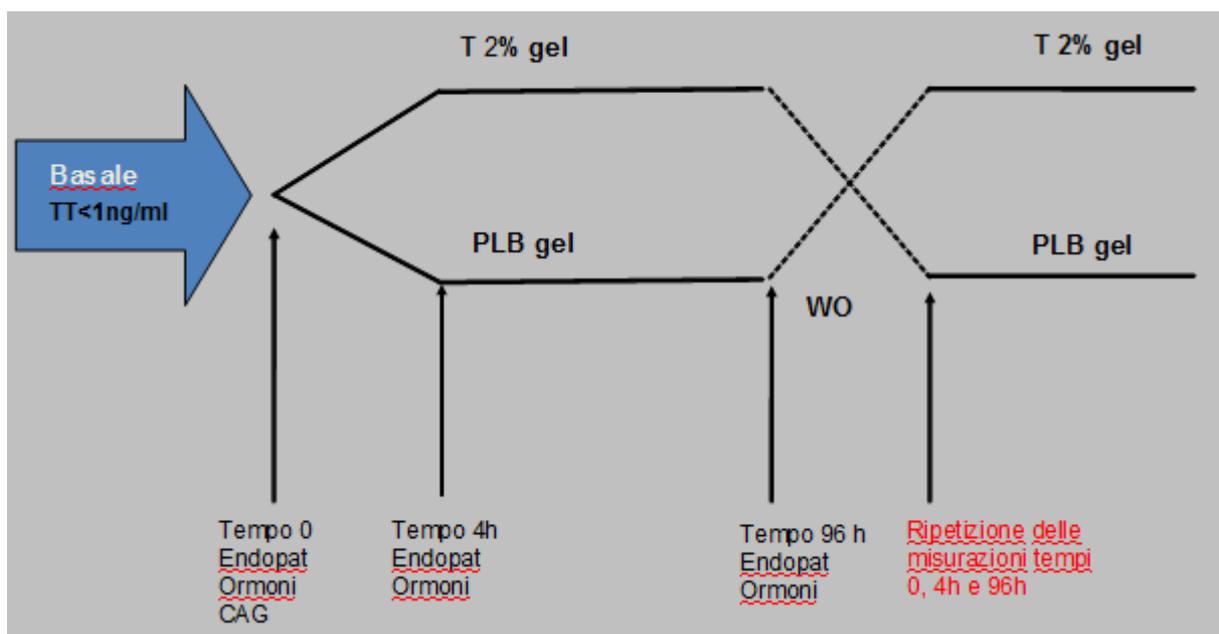


Figura 2. Disegno dello studio.

Gli *end-points* primari sono state le variazioni dell'RHI (*Reactive Hyperemia Index*) e dell'AI (*Augmentation Index*) determinate mediante tonometria arteriosa periferica (metodica Endopat 2000). Gli *end-points* secondari sono stati le variazioni ormonali e lo studio del

polimorfismo del recettore androgenico, mediante misurazione della lunghezza delle CAG repeats.

	n=10
Età (anni)	31±9
Pressione arteriosa sistolica (mmHg)	103±10
Pressione arteriosa diastolica (mmHg)	70±13
BMI (peso/altezza²)	22±3
Testosterone Totale Basale (ng/mL)	0.6±0.3
Tabagismo	0%
Diagnosi di Ipogonadismo Primitivo	4
Diagnosi di Ipogonadismo Secondario	6

Tabella 2. Caratteristiche demografiche basali dei soggetti arruolati.

Tonometria arteriosa periferica

Il *Reactive Hyperemia Index* (RHI) rappresenta una misura della funzione endoteliale, mentre l'*Augmentation Index* (AI) rappresenta una misura della *stiffness* arteriosa: entrambi i parametri sono stati valutati usando il dispositivo EndoPAT 2000 (Itamar Medical Ltd., Caesarea, Israele) e calcolati usando un algoritmo automatico computerizzato (versione software 3.1.2) fornito con il dispositivo. Le misurazioni sono state eseguite in accordo con le istruzioni date dal costruttore.

Il dispositivo consiste in due sonde, ognuna costituita da un sistema di cuscinetti ad aria insufflabili in lattice montati all'interno di un involucro rigido. Una volta applicata sul dito della mano, la conformazione di ogni sonda permette l'applicazione di una pressione simil-diastolica costante ed uniformemente distribuita al suo interno, che incrementa la sensibilità scaricando la tensione di parete arteriosa e previene la stasi di sangue venoso in modo da evitare il riflesso veno-arteriolare di vasocostrizione. Le modificazioni del volume pulsatile registrate

alla punta del dito sono rilevate da un trasduttore di pressione e trasferite ad un personal computer dove il segnale viene filtrato, amplificato, visualizzato su display e salvato.

Lo studio EndoPAT è stato eseguito con il paziente in posizione supina, con entrambe le mani posizionate allo stesso livello, in ambiente confortevole, a temperatura neutra. Un bracciale a pressione è stato posizionato sull'arto superiore stressato (non dominante), mentre il braccio controlaterale è servito come controllo. Le due sonde EndoPAT sono state posizionate su un singolo dito (II, III o IV dito) in ogni mano (stesso dito in entrambe le mani). Le dita adiacenti al dito stressato sono state separate utilizzando degli anelli di spugna soffice ed è stata iniziata una registrazione continua del volume sanguigno pulsatile in entrambe le mani. Dopo un periodo di 10 minuti di acquisizione, il bracciale a pressione posizionato sul braccio stressato è stato gonfiato sino ad una pressione di 60 mmHg superiore alla pressione sistolica. Le modificazioni del tono arterioso sono state ottenute creando una risposta iperemica a valle indotta dall'occlusione standard di 5 minuti dell'arteria brachiale. L'EndoPAT 2000 permette un riscontro in tempo reale della qualità dell'occlusione, dando la possibilità all'operatore di regolare la pressione nel bracciale (Bonetti et al. 2004). Il bracciale è stato quindi sgonfiato per indurre iperemia reattiva, mentre proseguiva la registrazione PAT. Ogni sezione della registrazione PAT è stata misurata mediante cronometro. I dati ottenuti sono stati analizzati da un computer in modo operatore-indipendente (Bonetti et al. 2003).

L'RHI è stato calcolato come rapporto dell'ampiezza media del segnale PAT registrato per 1 minuto a partire da 1 minuto dopo la disocclusione del braccio stressato, diviso l'ampiezza media del segnale PAT registrato per un tempo di 3.5 minuti al basale (prima del gonfiaggio del bracciale); i valori di RHI ricavati dal braccio occluso sono stati successivamente normalizzati al braccio controllo controlaterale, al fine di compensare per potenziali modificazioni sistemiche.

Un valore di RHI inferiore a 1.35 ha una sensibilità dell'80% ed una specificità dell'85% di identificare pazienti con disfunzione endoteliale coronarica (Bonetti et al. 2004). Tuttavia l'analisi PAT è utilizzata come marcatore di salute vascolare sistemica; Kuvin et al. (2003) hanno suggerito che lo studio ambulatoriale della funzione endoteliale può essere un utile strumento con molte applicazioni cliniche potenziali.

L'*arterial stiffness* è stata misurata attraverso l'AI derivato dalla PAT, calcolato automaticamente analizzando la morfologia dell'onda del segnale PAT registrato durante il periodo basale e che rappresenta una media di multipli segnali registrati. Il PAT-AI è stato calcolato come segue: il rapporto tra la differenza di ampiezza tra i due picchi sistolici e l'ampiezza del primo picco [AI = 60% (P2-P1)/P1]. Più ampio risulta il valore di AI maggiormente rigido è il sistema arterioso (fig. 3, parte sinistra). Valori negativi sono possibili (più comunemente negli uomini in età giovanile) qualora il primo picco sia maggiore del secondo (fig. 3, parte destra).

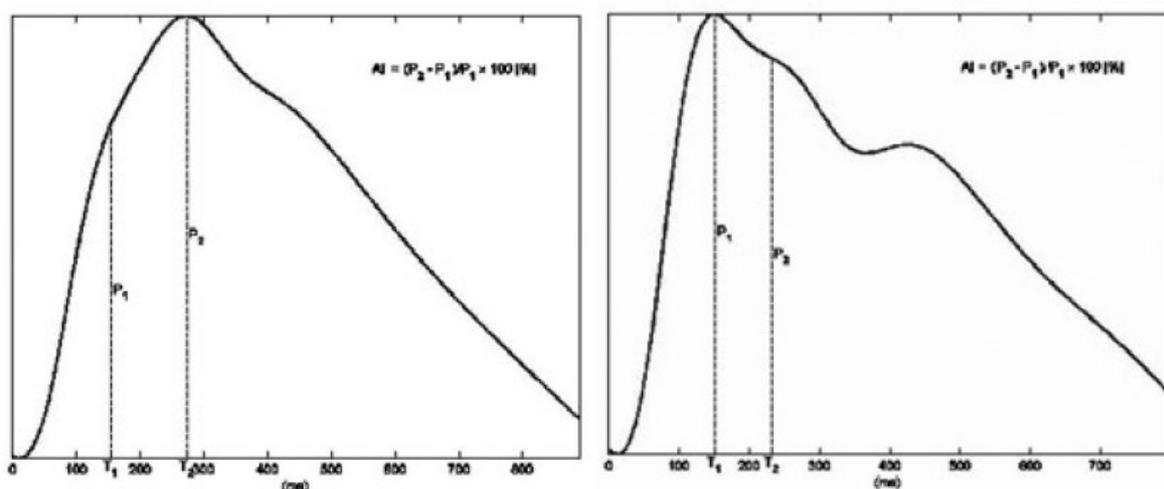


Fig. 3. Differenti tipologie di onde AI misurate mediante EndoPAT2000.

Le differenze statistiche tra ogni singolo gruppo sono state studiate usando il test t di Student per dati non appaiati. L'analisi di regressione multipla è stata effettuata per valutare i dati di RHI e di AI contro i valori di T totale e T libero (ai tempi 0, +4 ore e +96 ore) e per i valori di Δ RHI e di Δ AI contro i valori di Δ T totale e di Δ T libero; la medesima analisi statistica è stata

effettuata anche per i valori di lunghezza della sequenza di ripetizione delle triplette CAG (CAG repeats) contro i valori di RHI e del suo logaritmo naturale (LNRHI) (ai tempi 0, +4 ore e +96 ore). L'analisi statistica è stata eseguita utilizzando il software SPSS 17.0 (SPSS Inc., Chicago, IL, USA).

Risultati

4 e 96 ore dopo l'inizio del trattamento con T transdermico in formulazione gel (Tostrex®), alla dose giornaliera di 80 mg, i livelli sierici di T totale hanno mostrato un incremento statisticamente significativo rispetto ai valori basali per tutti i soggetti, raggiungendo concentrazioni medie \pm DS di 4 ± 2.1 ng/mL ($p < 0.0001$) e di 2 ± 1.48 ng/mL ($p < 0.001$) rispettivamente (figure 4 e 5). Non sono state rilevate variazioni statisticamente significative dei livelli circolanti di 17β -estradiolo e di SHBG. L'analisi dell'RHI ha mostrato un incremento dei valori statisticamente significativo (medie \pm DS) solo al tempo +4 ore rispetto al basale (1.93 ± 0.47 vs 1.75 ± 0.58 ; $p < 0.05$). Per quanto concerne i valori di AI, si è osservata una riduzione statisticamente significativa rispetto al basale sia al tempo +4 ore (-8.78 ± 9.52 vs -2.76 ± 9.09 ; $p < 0.01$) che al tempo +96 ore (-10.58 ± 15.93 vs -2.76 ± 9.09 ; $p < 0.001$), idem per i valori di AI@75 a +4 ore, rispetto al basale (-13.7 ± 12.36 vs -9.2 ± 10.28 ; $p < 0.01$) ed a +96 ore (-15.8 ± 17.5 vs -9.2 ± 10.28 ; $p < 0.001$) (figura 6). È stata trovata una correlazione inversa tra i livelli di T totale ed i valori di AI ($p < 0.03$; $r = -0.31$) e di AI@75 ($p < 0.04$; $r = -0.29$); allo stesso modo è stata trovata una correlazione inversa tra i livelli di T libero ed i valori di AI ($p < 0.02$; $r = -0.32$) e di AI@75 ($p < 0.04$; $r = -0.29$) (figura 7).

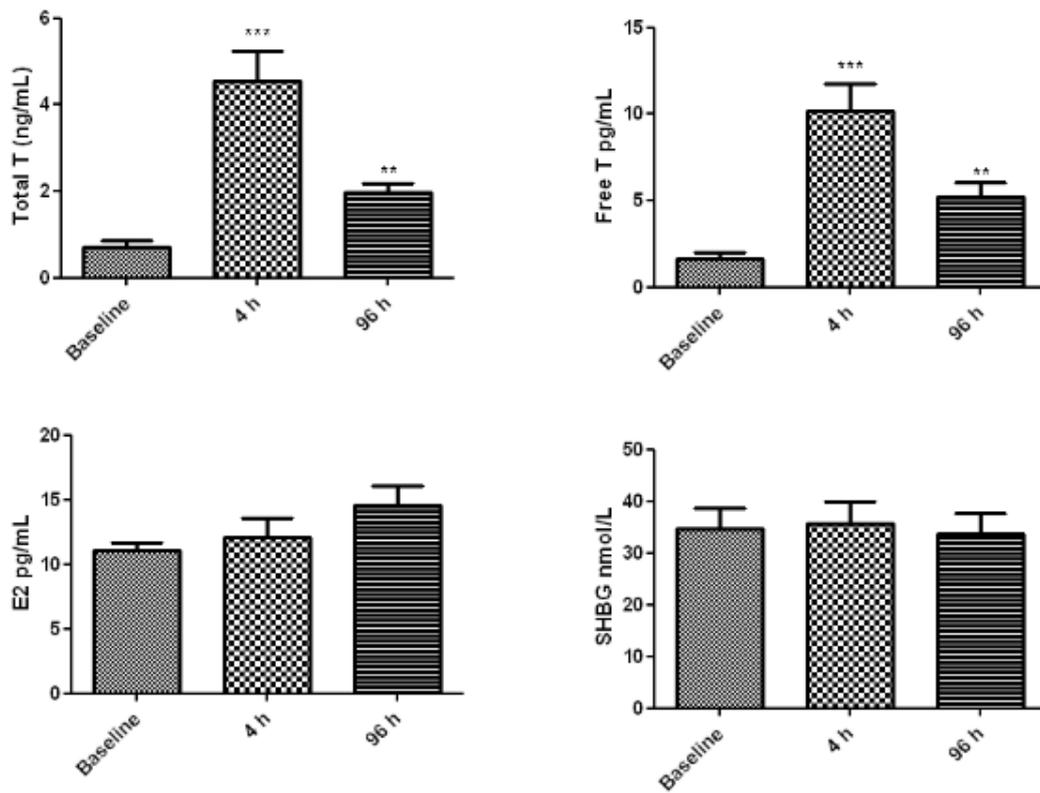


Fig. 4. Livelli ormonali (braccio trattamento con testosterone)

In modo interessante è stata trovata una correlazione diretta tra ΔT totale e ΔRHI ($p < 0.04$ $r = 0.37$). Conformemente è stata trovata una correlazione inversa tra ΔT totale e ΔAI ($p < 0.05$ $r = -0.35$), anche dopo aggiustamento per la frequenza cardiaca, $\Delta AI@75$ ($p < 0.03$ $r = -0.38$) (figura 8). Non sono stati riportati eventi avversi. È stata inoltre riscontrata una correlazione diretta tra i valori di CAG *repeats* e le variazioni del logaritmo naturale del parametro RHI ($\Delta \ln RHI$) al tempo 96 ore ($p < 0.03$ $r^2 = 0.47$) (figura 9).

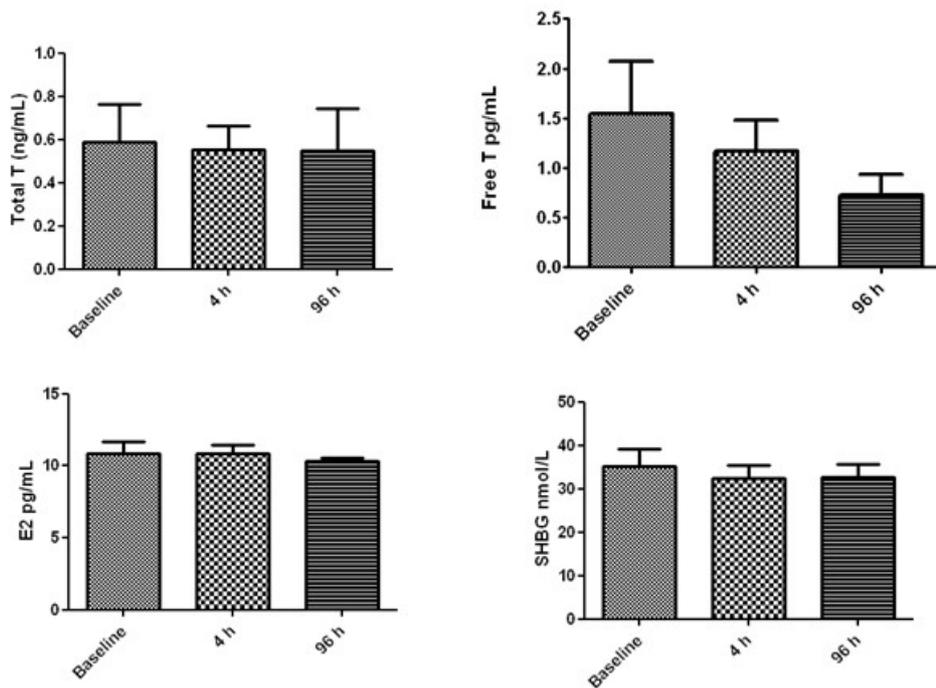


Fig. 5. Livelli ormonali (braccio placebo)

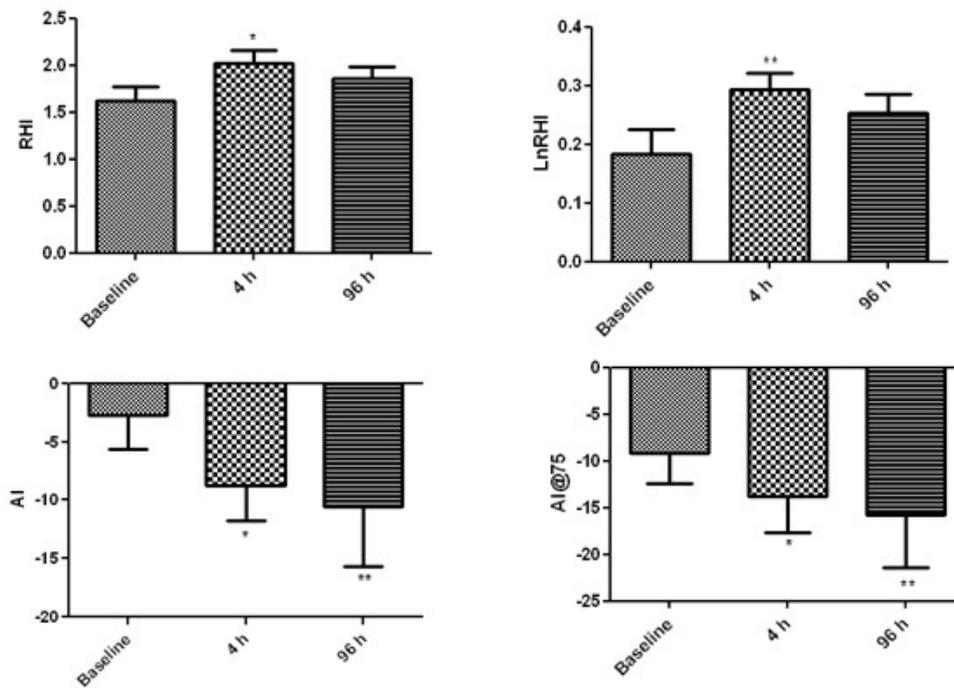


Fig. 6. Reattività vascolare (RHI) ed *arterial stiffness* (AI) nel braccio trattato con T.

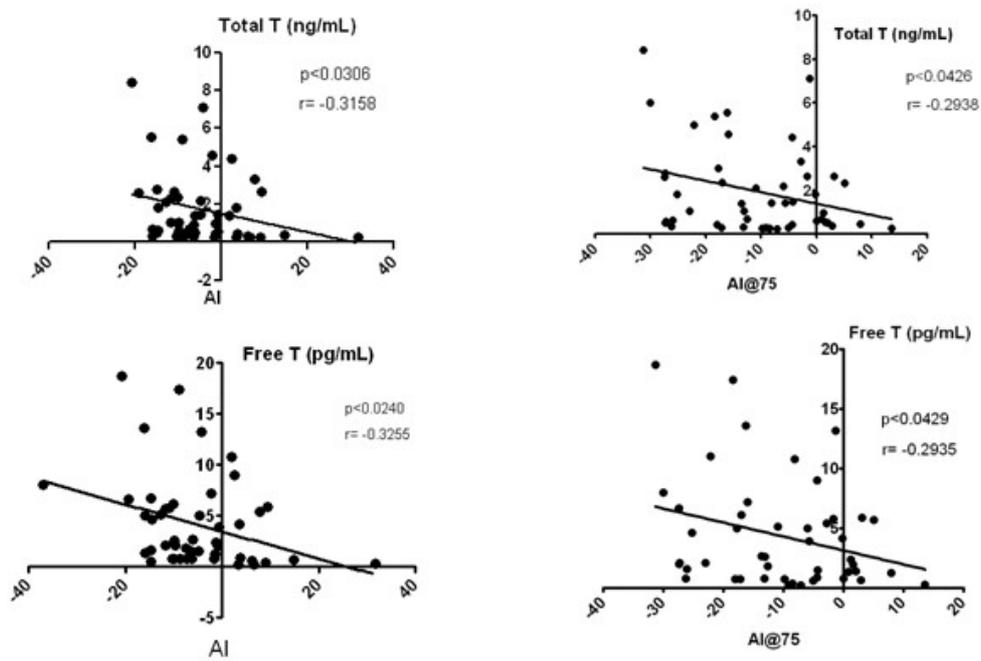


Fig. 7. Correlazioni tra *arterial stiffness* (AI) e livelli androgenici.

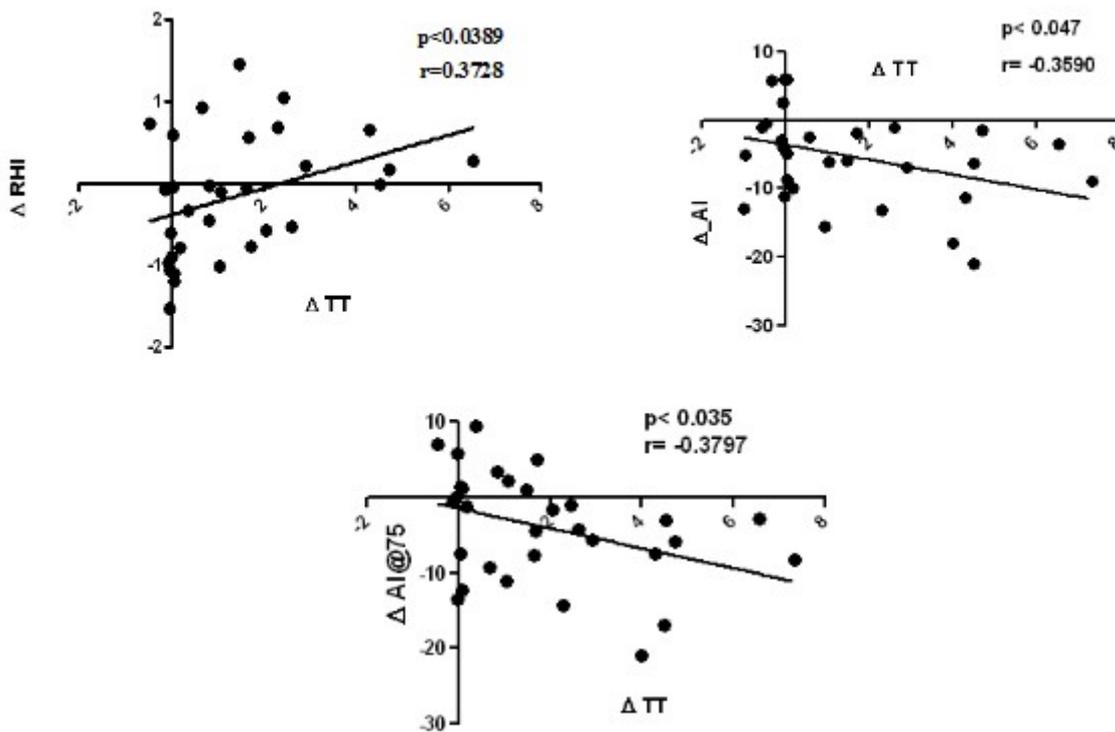


Fig. 8. Correlazioni tra variazioni dei livelli di T totale e variazioni dei parametri EndoPAT.

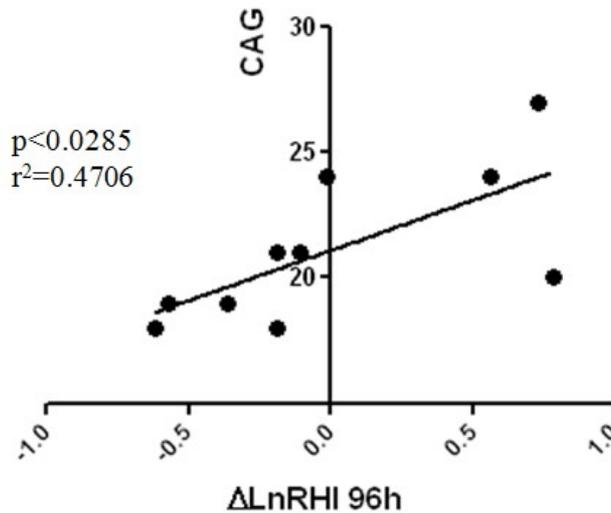


Fig. 9. Correlazione tra CAG repeats e variazioni del logaritmo naturale del parametro RHI (a +96 ore)

Discussione

Viste le limitazioni metodologiche inerenti gli approcci scientifici *in vitro*, la capacità degli androgeni di indurre in acuto la vasodilatazione in vasi sanguigni isolati sembra essere nella maggior parte degli studi un effetto farmacologico che compare ad alte concentrazioni (micromolari); pertanto appare ancora poco chiaro se tale effetto degli androgeni rapido, non genómico, abbia una rilevanza fisiologica.

Mentre gli studi precedenti hanno dimostrato la capacità degli androgeni di determinare vasodilatazione a concentrazioni farmacologiche, più recenti studi sui meccanismi di azione a concentrazioni quasi fisiologiche (11-36 nmol/L) hanno fortemente suggerito che la vasodilatazione indotta dal testosterone potrebbe essere un fenomeno fisiologicamente rilevante (Rowell et al. 2009; Traish et al. 2009; White et al. 2007). L'ipotesi è supportata da quei lavori scientifici che hanno dimostrato come il trattamento sostitutivo con testosterone in uomini ipogona-

dici sia in grado di ridurre la pressione arteriosa (Corona et al. 2009; Mårin et al. 1992; Tenover 1992; Yaron et al. 2009) e come i livelli sierici di testosterone siano ridotti nei soggetti ipertesi di entrambi i generi (Hughes et al. 1989; Khaw et al. 1988; Phillips et al. 1993; Svartberg et al. 2004).

L'obiettivo della ricerca qui presentata è stato di verificare *in vivo* la validità di tali argomentazioni, mediante la valutazione della funzione endoteliale di un gruppo estremamente omogeneo di pazienti affetti da ipogonadismo di grave entità, in condizioni basali e dopo la somministrazione di testosterone transdermico a dose fissa. In particolare i 10 soggetti arruolati, simili per età, si presentavano al *baseline* in buone condizioni di salute generale, in assenza di segni o sintomi indicativi di patologia cardiovascolare in atto, non obesi (fuorché un unico soggetto, caratterizzato da aumentato BMI), non fumatori. L'ipogonadismo era di tipo secondario in 6 soggetti (ipogonadismo ipogonadotropo idiopatico) e primitivo negli altri 4 pazienti: questi ultimi tutti anorchidi per pregressa orchietomia bilaterale, e diagnosi istologica di tumore testicolare (bilaterale in 3 soggetti).

Le misurazioni effettuate mediante tonometria arteriosa periferica digitale sono state eseguite seguendo un *timing* ideale per mettere in luce gli eventuali effetti rapidi (non genomici) indotti dalla somministrazione dello steroide. Inoltre il dosaggio della testosteronemia eseguito sui prelievi al tempo +4 ore ha dimostrato, in tutti i soggetti, il raggiungimento di livelli eugonadici, in maniera pertanto conforme alle caratteristiche di farmacocinetica del T in formulazione gel (Prostrakan, *data on file*). La tempistica delle misurazioni così stabilita rende lo studio particolarmente incisivo e innovativo su un argomento ancora controverso. In uno studio pubblicato da Yaron et al. (2009) 18 soggetti *elderly* (età media 62.5 ± 8.33) affetti da ipogonadismo [valori medi di T totale al basale: 4.76 ± 2.01 nmol/L (1.3 ± 0.5 ng/mL)] sono stati sottoposti a valutazioni ripetute della funzione endoteliale arteriosa mediante metodiche non invasive, eseguite ai tempi 0, +48 ore e +90 giorni dall'inizio del trattamento con testosterone

transdermico gel 1% (25-50 mg die). Gli autori hanno dimostrato che la terapia con testosterone, ripristinando i normali livelli ormonali, è stata in grado di migliorare alcuni parametri della funzione endoteliale in maniera relativamente rapida (+48 ore), suggerendo la possibilità che l'androgeno sia capace di indurre modificazioni funzionali della risposta arteriosa, ancor prima che strutturali. Tali risultati sono sostanzialmente in accordo con quelli presentati nel nostro studio; tuttavia riteniamo che al fine di verificare una risposta vascolare acuta (non genomica) al testosterone, sia necessario anticipare le misurazioni quanto più ravvicinatamente possibile alla somministrazione del farmaco, sfruttando le caratteristiche di farmacocinetica della formulazione di androgeno somministrata.

La valutazione della funzione endoteliale è stata effettuata mediante EndoPAT, metodica non invasiva, recentemente introdotta e ampiamente validata da numerosi studi clinici (Bonetti et al. 2004; Hamburg et al. 2009), che permette di acquisire simultaneamente informazioni sul flusso arterioso periferico provenienti da numerosi distretti vascolari, per lo più costituiti da vasi sanguigni di piccolo calibro e da microcircolazione. L'EndoPAT permette inoltre rilevazioni già corrette per eventuali modificazioni vascolari sistemiche, attraverso la contemporanea misurazione dal braccio controlaterale (non occluso); tale metodica è inoltre operatore-indipendente. Pertanto la metodica offre vari vantaggi rispetto alla BAUS (*Brachial Artery Ultrasound*), altra tecnica ampiamente diffusa che tuttavia richiede esperienza da parte dell'operatore che la esegue, non è corretta per eventuali modificazioni di circolo sistemiche, e permette inoltre la valutazione della sola arteria brachiale del braccio occluso.

I risultati delle misurazioni eseguite mediante EndoPAT hanno mostrato al tempo +4 ore dopo somministrazione di T un incremento statisticamente significativo dei parametri RHI, ed una riduzione statisticamente significativa di AI e di AI@75, a dimostrare da un lato un miglioramento acuto della reattività vascolare e dall'altro una riduzione altrettanto repentina della *stiffness* arteriosa. Tali risultati, imputabili in prima ipotesi ad un effetto acuto non genomico

del T sui meccanismi di vasodilatazione arteriosa, sono conformi con i risultati di numerosi studi, preclinici e clinici, cui già si è fatto riferimento nel corso della trattazione. In particolare, un'interessante sovrapposibilità può essere riscontrata con due studi clinici pubblicati rispettivamente da Webb et al. (1999) e Ong et al. (2000). Nel primo gli autori hanno studiato la funzione endoteliale di 13 uomini, di età media pari a 61 ± 11 anni, affetti da coronaropatia e con testosteronemia (media \pm DS) al *baseline* di 11 ± 6 nmol/L (3.19 ± 1.74 ng/mL). In breve, ogni soggetto è stato sottoposto a misurazioni del diametro e del flusso coronarico durante 3 minuti di infusioni intracoronariche di T a concentrazioni crescenti ($10^{-10} - 10^{-7}$ mol/L). Gli autori hanno dimostrato che, rispetto al basale, il T incrementava significativamente il diametro coronarico, misurato mediante angiografia quantitativa, a concentrazioni comprese tra 10^{-7} e 10^{-9} mol/L; inoltre, sempre rispetto al basale, è stato rilevato un incremento significativo del flusso coronarico, misurato mediante Doppler intracoronarico, ad ogni concentrazione di T. Dunque gli autori hanno dimostrato che il T, somministrato acutamente a concentrazioni sia fisiologiche che sovralfisiologiche, è in grado di indurre una dilatazione del diametro coronarico (più del 4.5%) ed un incremento del flusso coronarico (più del 17.4%) in uomini anziani con patologia coronarica. Sorprendentemente, l'effetto del T sul diametro e sul flusso sanguigno delle arterie coronarie è risultato approssimativamente la metà di quello dimostrato, in un altro studio, dopo somministrazione intracoronarica di diltiazem. Nonostante studi *in vitro* e *in vivo* su animali sostengano l'ipotesi che il T possa determinare una vasodilatazione con meccanismo endotelio-indipendente, tramite una diretta interazione con i canali del K^+ o i canali del Ca^{2+} (vedi parte introduttiva), i risultati di tale studio non possono escludere in nessun modo che il T agisca sulle coronarie in maniera indiretta, mediante un meccanismo endotelio-dipendente flusso-mediato, vista la mancata utilizzazione in questo studio di un inibitore dell'NO.

Tali considerazioni valgono ovviamente anche per il nostro studio; difatti la valutazione della funzione endoteliale eseguita mediante metodica EndoPAT, si basa sulla spontanea vasodilatazione arteriosa indotta dall'iperemia post-occlusione, che è un evento determinato dal rilascio di NO in risposta allo *shear stress* generato dal flusso ematico. Pertanto la maggiore vasodilatazione arteriosa dimostrata nel nostro studio dall'incremento dei valori di RHI dopo 4 ore dalla somministrazione di T, rispetto ai valori registrati in basale, potrebbe essere considerata conseguenza di un effetto dell'androgeno potenziante la funzione endoteliale, la cui esatta natura tuttavia non può essere meglio precisata.

L'altro studio clinico, che ci preme riportare più nel dettaglio, pubblicato da Ong et al. nel 2000, riguarda la misurazione degli effetti acuti del testosterone, somministrato per via endovenosa, sulla reattività dell'arteria brachiale (*flow mediated reactivity*, FMR), misurata mediante BAUS, in 22 uomini con patologia coronarica angiograficamente provata. I soggetti partivano da livelli basali di testosterone circolante pari a 7.7 ± 3.6 nmol/L (2.2 ± 1.0 ng/mL), pertanto compatibili con ipogonadismo di lieve entità. Del totale dei soggetti, 11 hanno ricevuto un'alta dose di T, raggiungendo concentrazioni plasmatiche medie di 771 ± 378 nmol/L (223 ± 109 ng/mL); altri 11 hanno invece ricevuto una bassa dose di T, raggiungendo concentrazioni plasmatiche medie dell'androgeno nel *range* fisiologico [24 ± 11 nmol/L (6.9 ± 3 ng/mL)]. Soltanto i soggetti appartenenti al primo gruppo, ricevuti alte dosi endovena di T, hanno mostrato un incremento significativo della FMR rispetto alla misurazione eseguita dopo somministrazione di placebo (6.8 ± 3.7 % vs 3.1 ± 1.9 %). Il fatto che i soggetti ricevuti dosi fisiologiche di T non abbiano mostrato modificazioni significative della FMR potrebbe essere legato ad una preesistente residua disfunzione endoteliale, che giustificherebbe una ridotta capacità dell'endotelio di rilasciare sostanze endogene vasoattive, in primis ma non solo l'NO, e dunque di reagire all'infusione androgenica. A tal proposito, merita di essere menzionato un altro *gasotransmitter*, l'idrogeno solforato (H₂S), che è stato recentemente portato alla

ribalta come ulteriore possibile mediatore della risposta vasodilatatoria (Bucci e Cirino 2011). È stato dimostrato che l'H₂S, prodotto a partire dalla L-cisteina, per opera principalmente della cistationina gamma-liasi, è in grado di indurre un rilassamento concentrazione-dipendente delle arterie di grosso calibro (di conduttanza) e di piccolo calibro (di resistenza); a livello vascolare il sistema L-cisteina/H₂S entrerebbe in stretta inter-comunicazione con il sistema L-arginina/NO ed inoltre sembrerebbe svolgere azione inibitoria contro la fosfodiesterasi. Bucci et al. (2009) hanno valutato la reattività vascolare di anelli di aorta toracica di ratto maschio Wistar, incubati con concentrazioni crescenti di T. Gli autori hanno dimostrato che il T (10 nM – 10 microM) determinava un incremento della conversione della L-cisteina in H₂S ed una vasodilatazione concentrazione-dipendente degli anelli di aorta, suggerendo pertanto che l'effetto vasodilatatore del T coinvolga l'H₂S.

Di certo i risultati dello studio di Ong et al. ampliano lo scenario dei possibili campi di applicazione della terapia androgenica, suggerendo la possibilità di un loro impiego futuro nell'ambito della gestione delle emergenze coronariche, in associazione ai trattamenti convenzionali, soprattutto considerando l'elevata prevalenza dell'ipogonadismo nei soggetti ad alto rischio cardiovascolare.

Diversamente, i soggetti inclusi nel nostro studio erano tutti esenti da patologia cardiovascolare ed in età giovanile-adulta, pertanto considerabili a basso rischio di maggiori eventi circolatori. Pertanto è plausibile che in questi, fortemente ipogonadici al *baseline*, il semplice ripristino dell'eugonadismo sia in grado di determinare modificazioni del tono arterioso periferico, come chiaramente dimostrato. A tal proposito, una possibile estensione del nostro studio potrebbe contemplare l'inclusione di soggetti con livelli di testosterone basali compresi tra 1.0 e 2.0 ng/mL e/o appartenenza a fasce di età superiori, con presenza di più fattori di rischio cardiovascolari (diabete, ipertensione, vizio tabagico, dislipidemia, ecc.) non considerati negli obiettivi dell'attuale protocollo.

Che la reattività vascolare arteriosa risenta delle crescenti concentrazioni plasmatiche degli ormoni sessuali è stato elegantemente dimostrato dal gruppo di ricerca di Banghoo et al. (2011) che hanno valutato la funzione endoteliale mediante EndoPAT in 89 soggetti di ambo i sessi, in età peripuberale. La popolazione studiata, suddivisa in 3 gruppi puberali sulla base dei dosaggi plasmatici dei livelli degli estrogeni e degli androgeni, mostrava uno spontaneo incremento statisticamente significativo dei valori di PAT *index* registrati con la progressione dello stadio puberale, e dunque un progressivo incremento della capacità di risposta arteriosa periferica all'iperemia reattiva. Gli autori quindi hanno dimostrato che la funzione endoteliale migliora sensibilmente durante la progressione attraverso gli stadi di Tanner.

Nel nostro studio i livelli di 17β estradiolo non hanno mostrato significative modificazioni dopo somministrazione di T in gel e si sono mantenuti stabili in tutti i soggetti trattati (figura 4). Tale fatto suggerisce due considerazioni: 1) che il 17β estradiolo non abbia contribuito alle modificazioni della reattività vascolare osservate in acuto nei soggetti sottoposti a valutazione EndoPAT, e 2) che l'aromatasi abbia bisogno di tempi maggiori di esposizione all'androgeno per attivarsi e determinare un incremento proporzionale dei livelli circolanti dell'estrogeno. Tali risultati sono in accordo con le evidenze scientifiche accumulate. Difatti, l'ipotesi secondo la quale la vasodilatazione indotta dal T possa essere un effetto indiretto mediato dalla conversione locale del T in 17β estradiolo, da parte dell'aromatasi vascolare, è stata rifiutata per i seguenti motivi: 1) l'inibizione dell'aromatasi non impedisce il rilassamento vascolare indotto dal T (Deenadayalu et al. 2001; Tep-areenan et al. 2003; Yue et al. 1995); 2) antagonisti del recettore estrogenico non alterano la vasodilatazione T-indotta (Chou et al. 1996; Jones et al. 2003; Perusquía et al. 2007); e 3) metaboliti del T non aromatizzabili (ad esempio, il DHT) sono in grado di determinare vasodilatazione (Deenadayalu et al. 2001; Perusquía et al. 2007).

I risultati mostrano un comportamento simile della SHBG, i cui livelli non si modificano significativamente durante trattamento con T (figura 4), a suggerire in prima ipotesi che la globulina non partecipi ai meccanismi di vasodilatazione T-indotti in acuto.

Altre limitazioni del nostro studio consistono nel non aver dosato i livelli circolanti né le concentrazioni urinarie dei metaboliti androgenici durante il trattamento con T. Il metabolismo del T produce nei vari tessuti bersaglio una varietà di composti dalla potenziale rilevanza biologica (figura 10).

Al di là della bioconversione irreversibile a 17β -estradiolo dovuta all'enzima aromatasi, il T può essere anche convertito a metaboliti 5-diidro-ridotti (riduzioni 5α e 5β), che includono il 5α -DHT ed il 5β -DHT, per azione rispettivamente della 5α -reduttasi (di tipo 1 e 2) e della 5β -reduttasi (Perusquía et al. 2010). A tal proposito va sottolineato che i vari tessuti bersaglio si caratterizzano per una relativa differente attività della 5α - o della 5β -reduttasi, a determinare un differente metabolismo del T, sebbene sia stato ipotizzato che la via metabolica 5α -reduttasica abbia la maggiore importanza.

È importante ricordare che tali metaboliti non sono aromatizzabili e pertanto non possono essere convertiti ad estrogeni. Poiché numerosi recenti studi hanno rivelato che tali metaboliti non aromatizzabili sono capaci di determinare vasodilatazione, la dogmatica concezione secondo la quale il T sia metabolizzato a molecole inattive poi escrete, deve essere riconsiderata alla luce dei nuovi dati riguardanti gli effetti degli androgeni sulla funzione vascolare. In particolare è stato dimostrato che il 5β -DHT, diversamente dal 5α -DHT, risulta notevolmente più influente del T sull'aorta di ratto e sull'arteria ombelicale umana, come anche sulla muscolatura liscia vasale ed uterina (Montaño et al. 2008; Perusquía et al. 2007).

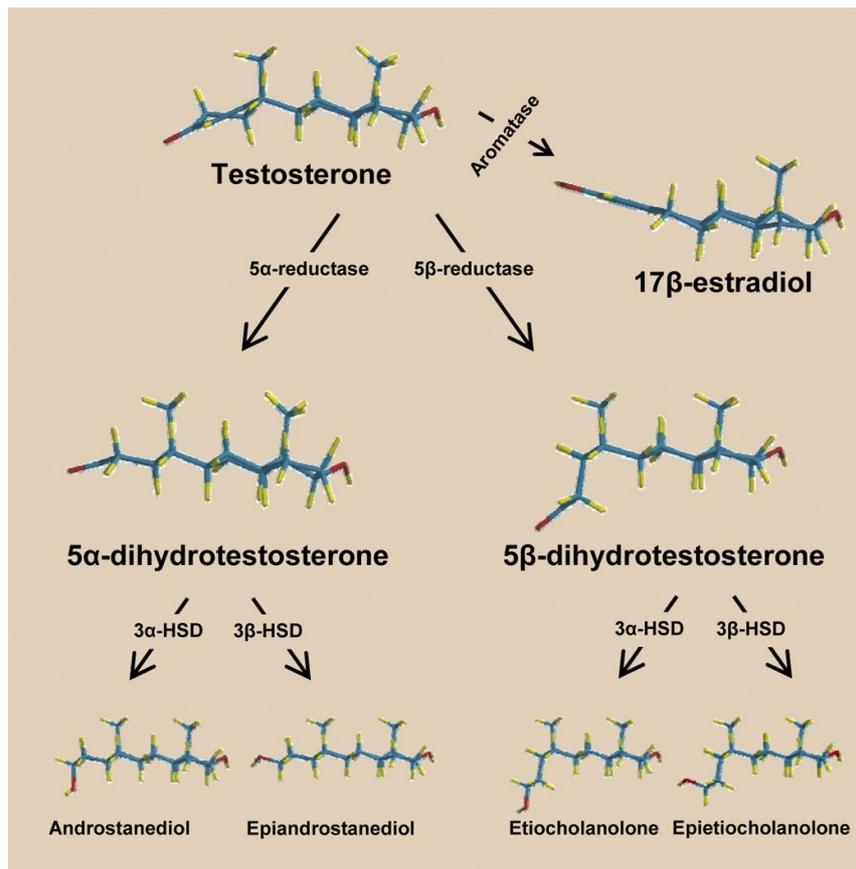


Figura 10. Vie metaboliche del testosterone (tratto da Perusquía et al. 2010).

Poiché il 5β-DHT ha poca o scarsa affinità per il recettore androgenico (AR) intracellulare ed è totalmente privo di proprietà androgeniche (Fang et al. 2003), si può ipotizzare che il dimostrato effetto vasorilassante acuto indotto dal 5β-DHT possa essere principalmente mediato da meccanismi non genomici, AR-indipendenti. Di contro, il 5α-DHT possiede un'alta affinità per l'AR e dunque un'elevata attività androgenica. Tale metabolita è un androgeno potente a livello genomico, ma la sua capacità vasorilassante non genomica è stata dimostrata in alcuni studi minore rispetto a quella del T (Deenadayalu et al. 2001). In base a ciò, si può ipotizzare che i due diidro-metaboliti del T possano indurre risposte biologiche differenti: il 5α-DHT con elevata azione genomica-androgenica ed il 5β-DHT con elevata azione vasorilassante non genomica. Per tale ragione, gli steroidi 5β-ridotti o gli analoghi funzionali del 5β-DHT, incapaci

di esercitare effetti estrogenici o androgenici, potrebbero ricoprire un ruolo nella terapia delle patologie vascolari. Un'eventuale estensione del nostro studio potrebbe prevedere il dosaggio dei livelli circolanti del 5β -DHT durante somministrazione di T in acuto.

I risultati del nostro studio hanno mostrato un incremento statisticamente significativo rispetto al tempo 0 dell'*arterial stiffness* dedotto dai valori di AI e di AI@75, sia al tempo +4 ore che al tempo +96 ore, con più elevata significatività al tempo +96 ore per entrambi i parametri ($p < 0.001$). Tali dati rafforzano ulteriormente le conclusioni dello studio ed indicano un effetto cumulativo (tardivo) a favore della funzione endoteliale. Gli effetti vascolari benefici dedotti dall'analisi delle modificazioni dei parametri EndoPAT, registrati durante la somministrazione di T, sono ulteriormente confermati dalla dimostrazione di una correlazione diretta tra le variazioni dei livelli degli androgeni (ΔT totale e ΔT libero) ed il ΔRHI , e di una correlazione inversa tra le variazioni dei livelli degli androgeni (ΔT totale e ΔT libero) ed il ΔAI (figura 8).

Infine, la dimostrazione di una correlazione diretta tra le lunghezze delle sequenze di ripetizione delle triplette CAG (*CAG repeats*), rilevate in ognuno dei pazienti ipogonadici, e le variazioni del logaritmo naturale del parametro RHI al tempo +96 ore (figura 9) sono in linea con i risultati di un precedente lavoro di Zitzmann et al. 2002. Tale studio, condotto su 110 soggetti sani (di età compresa tra 20 e 50 anni), ha riscontrato una correlazione diretta tra *CAG repeats* e FMD ($p < 0.001$; $r = 0.37$), a suggerire una peggiore funzione endoteliale nei soggetti con più elevata sensibilità del recettore androgenico. Il significato della correlazione da noi riscontrata, evidenziata al tempo +96 ore, dunque solo tardivamente, potrebbe essere interpretata come effetto genomico, AR dipendente, del T, plausibile soprattutto in tali soggetti di base severamente ipogonadici, dopo 96 ore di esposizione a dosi piene dell'androgeno. Si sottolinea inoltre che la correlazione tra *CAG repeats* e $\Delta \ln RHI$ diventa statisticamente signifi-

ficativa solo a 96 ore dall'inizio del trattamento, tempo al quale i livelli medi di RHI sono risultati simili a quelli registrati al *baseline* (figura 6).

I risultati ottenuti, nonostante derivino dalla valutazione di un numero limitato di soggetti, sembrerebbero concordi nel suggerire un effetto acuto del testosterone sulla funzione endoteliale di soggetti severamente ipogonadici. In base alle nostre conoscenze lo studio dimostra per la prima volta che la somministrazione *in vivo* di testosterone per via transdermica, a dosi non sovralfisiologiche, impatta favorevolmente sulla reattività vascolare arteriosa di uomini ipogonadici già a distanza di 4 ore dall'inizio del trattamento, e fornisce un'ulteriore conferma della rilevanza fisiologica degli effetti non genomici degli androgeni.

Conclusioni

In questo studio, abbiamo dimostrato per la prima volta, che la somministrazione di testosterone transdermico in dosi fisiologiche migliora la vasodilatazione arteriosa in soggetti ipogonadici altresì sani, in maniera dose-dipendente. Tale effetto rapido (4 ore), non genomico, viene perso dopo 96 ore, laddove troviamo una correlazione della risposta endoteliale con la lunghezza della sequenza di ripetizione delle triplette CAG (risposta genomica). Abbiamo inoltre dimostrato un netto miglioramento della rigidità vasale rispetto al placebo, parametro che non era mai stato dimostrato prima con tale metodica. Le potenziali implicazioni cardiologiche, in endocrinologia dello sport ed in medicina d'urgenza di tali effetti, restano ancora da essere approfondite in popolazioni di soggetti con differenti livelli soglia di testosterone.

Bibliografia.

1. Ajayi AA, Ogungbade GO, Okorodudu AO. Sex hormone regulation of systemic endothelial and renal microvascular reactivity in type-2 diabetes: studies in gonadectomized and sham-operated Zucker diabetic rats. *Eur J Clin Invest* 2004;34:349-357.
2. Akishita M, Hashimoto M, Ohike Y, Ogawa S, Iijima K, Eto M, Ouchi Y. Low testosterone level is an independent determinant of endothelial dysfunction in men. *Hypertens Res* 2007;30:1029-1034.
3. Allan CA, McLachlan A, McLachlan RI. Androgen deficiency disorders. In: *Endocrinology*, DeGroot-Jameson, V ed. Saunders Elsevier, Philadelphia, 2005.
4. Anderson TJ, Uehata A, Gerhard MD, Meredith IT, Knab S, Delagrangre D. Close relation of endothelial function in the human coronary and peripheral circulations. *J Am Coll Cardiol* 1995; 26:1235-41.
5. Aversa A, Bruzziches R, Francomano D, Natali M, Gareri P, Spera G. Endothelial dysfunction and erectile dysfunction in the aging man. *Int J Urol* 2010;17:38-47.
6. Aversa A, Bruzziches R, Francomano D, Natali M, Lenzi A. Testosterone and phosphodiesterase type-5 inhibitors: new strategy for preventing endothelial damage in internal and sexual medicine? *Ther Adv Urol* 2009;1:179-97.
7. Aversa A, Bruzziches R, Francomano D, Rosano G, Isidori AM, Lenzi A, Spera G. Effects of testosterone undecanoate on cardiovascular risk factors and atherosclerosis in middle-aged men with late-onset hypogonadism and metabolic syndrome: results from a 24-month, randomized, double-blind, placebo-controlled study. *J Sex Med* 2010;7:3495-503.
8. Aversa A, Bruzziches R, Spera G. Rationale for the use of testosterone “salvage” in treatment of men with erectile dysfunction failing phosphodiesterase inhibitors. *The Endocrinologist* 2005;15:99-105
9. Aversa A, Francomano D, Bruzziches R, Pili M, Natali M, Spera G, Lenzi A. The application of digital pulse amplitude tonometry to the diagnostic investigation of endothelial dysfunction in men with erectile dysfunction. *Andrologia* 2011;43:9-15.
10. Benten WP, Lieberherr M, Stamm O, Wrehlke C, Guo Z, Wunderlich F. Testosterone signaling through internalizable surface receptors in androgen receptor-free macrophages. *Mol Biol Cell* 1999;10:3113-3123.
11. Betik AC, Luckham VB, Hughson RL. Flow-mediated dilation in human brachial artery after different circulatory occlusion conditions. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2004;286:H442-8.

12. Bhangoo A, Sinha S, Rosenbaum M, Shelov S, Ten S. Endothelial function as measured by peripheral arterial tonometry increases during pubertal advancement. *Horm Res Paediatr* 2011;76:226-33.
13. Bhasin S. Testicular disorders. In: Williams Textbook of Endocrinology, XI ed. Saunders Elsevier, Philadelphia, 2008.
14. Blankenberg S, Rupprecht HJ, Bickel C, Peetz D, Hafner G, Tiret L, Meyer J. Circulating cell adhesion molecules and death in patients with coronary artery disease. *Circulation* 2001;104:1336-42.
15. Bonetti PO, Barsness GW, Keelan PC, Schnell TI, Pumper GM, Kuvin JT, Schnall RP, Holmes DR, Higano ST, Lerman A. Enhanced external counterpulsation improves endothelial function in patients with symptomatic coronary artery disease. *J Am Coll Cardiol* 2003;41:1761-1768.
16. Bonetti PO, Pumper GM, Higano ST, Holmes DR Jr, Kuvin JT, Lerman A. Noninvasive identification of patients with early coronary atherosclerosis by assessment of digital reactive hyperemia. *J Am Coll Cardiol* 2004;44:2137-41.
17. Bucci M, Cirino G. Hydrogen sulphide in heart and systemic circulation. *Inflamm Allergy Drug Targets* 2011;10:103-8.
18. Bucci M, Mirone V, Di Lorenzo A, Vellecco V, Roviezzo F, Brancaleone V, Ciro I, Cirino G. Hydrogen sulphide is involved in testosterone vascular effect. *Eur Urol* 2009;56:378-83.
19. Cairraño E, Alvarez E, Santos-Silva AJ, Verde I. Potassium channels are involved in testosterone-induced vasorelaxation of human umbilical artery. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* 2008;376:375-383.
20. Calles-Escandon J, Mirza SA, Sobel BE, Schneider DJ. Induction of hyperinsulinemia combined with hyperglycemia and hypertriglyceridemia increases plasminogen activator inhibitor 1 in blood in normal human subjects. *Diabetes* 1998;47:290-293.
21. Celermajer DS, Sorensen KE, Bull C, Robinson J, Deanfield JE. Endothelium-dependent dilation in the systemic arteries of asymptomatic subjects relates to coronary risk factors and their interaction. *J Am Coll Cardiol* 1994;24:1468-74.
22. Chou TM, Sudhir K, Hutchison SJ, Ko E, Amidon TM, Collins P, Chatterjee K. Testosterone induces dilation of canine coronary conductance and resistance arteries in vivo. *Circulation* 1996;94:2614-2619.

23. Corona G, Mannucci E, Lotti F, Fisher AD, Bandini E, Balercia G, Forti G, Maggi M. Pulse pressure, an index of arterial stiffness, is associated with androgen deficiency and impaired penile blood flow in men with ED. *J Sex Med* 2009;6:285-293.
24. Corretti MC, Anderson TJ, Benjamin EJ, Celermajer D, Charbonneau F, Creager MA. Guidelines for the ultrasound assessment of endothelial-dependent flow-mediated vasodilation of the brachial artery: a report of the International Brachial Artery Reactivity Task Force. *J Am Coll Cardiol* 2002;39:257-65.
25. Cox DA, Vita JA, Treasure CB, Fish RD, Alexander RW, Ganz P, Selwyn AP. Atherosclerosis impairs flow-mediated dilation of coronary arteries in humans. *Circulation* 1989;80:458-65.
26. Crews JK, Khalil RA. Gender-specific inhibition of Ca^{2+} entry mechanisms of arterial vasoconstriction by sex hormones. *Clin Exp Pharmacol Physiol* 1999;26:707-715.
27. Darby E, Anawalt BD. Male hypogonadism: an update on diagnosis and treatment. *Treat Endocrinol* 2005;4:293-309.
28. Deenadayalu VP, White RE, Stallone JN, Gao X, Garcia AJ. Testosterone relaxes coronary arteries by opening the large-conductance, calcium-activated potassium channel. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2001;281:H1720-7.
29. Donald AE, Halcox JP, Charakida M, Storry C, Wallace SM, Cole TJ, Friberg P, Deanfield JE. Methodological approaches to optimize reproducibility and power in clinical studies of flow-mediated dilation. *J Am Coll Cardiol* 2008;51:1959-64.
30. Er F, Michels G, Brandt MC, Khan I, Haase H, Eicks M, Lindner M, Hoppe UC. Impact of testosterone on cardiac L-type calcium channels and Ca^{2+} sparks: acute actions antagonize chronic effects. *Cell Calcium* 2007;41:467-477.
31. Esposito K, Ciotola M, Giugliano F, DeSio M, Giugliano G, D'armiento M, Giugliano D. Mediterranean diet improves erectile function in subjects with the metabolic syndrome. *Int J ImpRes* 2006;18:405-410.
32. Falkenstein E, Tillmann HC, Christ M, Feuring M, Wehling M. Multiple actions of steroid hormones--a focus on rapid, nongenomic effects. *Pharmacol Rev* 2000;52:513-56.
33. Fang H, Tong W, Branham WS, Moland CL, Dial SL, Hong H, Xie Q, Perkins R, Owens W, Sheehan DM. Study of 202 natural, synthetic, and environmental chemicals for binding to the androgen receptor. *Chem Res Toxicol* 2003;16:1338-1358.
34. Farouque HMO, Meredith IT. The assessment of endothelial function in humans. *Coron Artery Dis* 2001;12:445-54.

35. Ferlin A, Bartoloni L, Rizzo G, Roverato A, Garolla A, Foresta C. Androgen receptor gene CAG and GGC repeat lengths in idiopathic male infertility. *Mol Hum Reprod* 2004;10:417-21.
36. Fonseca V, Jawa A. Endothelial and erectile dysfunction, diabetes mellitus, and the metabolic syndrome: common pathways and treatments? *Am J Cardiol* 2005;96:13M-18M.
37. Foresta C, Caretta N, Lana A, DeToni L, Biagioli A, Ferlin A, Garolla A. Reduced number of circulating endothelial progenitor cells in hypogonadal men. *J Clin Endocrinol Metab* 2006;91:4599-4602.
38. Foresta C, Zuccarello D, De Toni L, Garolla A, Caretta N, Ferlin A. Androgens stimulate endothelial progenitor cells through an androgen-mediated pathway. *Clin Endo* 2008;68:284-289.
39. Fu L, Gao QP, Shen JX. Relationship between testosterone and indexes indicating endothelial function in male coronary heart disease patients. *Asian J Androl* 2008;10:214-218.
40. Fujimoto R, Morimoto I, Morita E, Sugimoto H, Ito Y, Eto S. Androgen receptors, 5 alpha-reductase activity and androgen dependent proliferation of vascular smooth muscle cells. *J Steroid Biochem Mol Biol* 1994;50:169-174.
41. Geary G, Krause D, Duckles S. Gonadal hormones affect diameter of male rat cerebral arteries through endothelium-dependent mechanisms. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2000;279:610-618.
42. Giannattasio C, Failla M, Grappiolo A, Stella ML, Del Bo A, Colombo M, Mancia G. Fluctuations of radial artery distensibility throughout the menstrual cycle. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1999;19:1925-1929.
43. Ginsberg HN. Insulin resistance and cardiovascular disease. *J Clin Investig* 2000;106:453-458.
44. Haffner SM, Agostino RD Jr, Saad MF, O'Leary DH, Savage PJ, Rewers M, Selby J, Bergman RN, Mykkänen L. Carotid artery atherosclerosis in type-2 diabetic and nondiabetic subjects with and without symptomatic coronary artery disease (The Insulin Resistance Atherosclerosis Study). *Am J Cardiol* 2000;85:1395-1400.
45. Haffner SM. Sex hormones, obesity, fat distribution, type 2 diabetes and insulin resistance: epidemiological and clinical correlation. *Int J Obes Relat Metab Disord* 2000;(suppl 2):S56-S58.

46. Hall J, Jones RD, Jones TH, Channer KS, Peers C. Selective inhibition of L- type Ca²⁺ channels in A7r5 cells by physiological levels of testosterone. *Endocrinology* 2006;147:2675-2680.
47. Hamburg NM, Benjamin EJ. Assessment of endothelial function using digital pulse amplitude tonometry. *Trends Cardiovasc Med* 2009;19:6-11.
48. Hamburg NM, Keyes MJ, Larson MG, Vasan RS, Schnabel R, Pryde MM, Mitchell GF, Sheffy J, Vita JA, Benjamin EJ. Cross-sectional relations of digital vascular function to cardiovascular risk factors in the Framingham Heart Study. *Circulation* 2008;117:2467-74.
49. Hughes GS, Mathur RS, Margolius HS. Sex steroid hormones are altered in essential hypertension. *J Hypertens* 1989;7:181-187.
50. Hutchison SJ, Browne AE, Ko E, Chou TM, Zellner C, Komesaroff PA, Chatterjee K, Sudhir K. Dehydroepiandrosterone sulfate induces acute vasodilation of porcine coronary arteries in vitro and in vivo. *J Cardiovasc Pharmacol* 2005;46:325-332.
51. Joannides R, Bellien J, Thuillez C. Clinical methods for the evaluation of endothelial function-- a focus on resistance arteries. *Fundam Clin Pharmacol* 2006;20:311-20.
52. Jones RD, English KM, Jones TH, Channer KS. Testosterone-induced coronary vasodilatation occurs via a non-genomic mechanism: evidence of a direct calcium antagonism action. *Clin Sci (Lond)* 2004a;107:149-158.
53. Jones RD, Hugh Jones T, Channer KS. The influence of testosterone upon vascular reactivity. *Eur J Endocrinol* 2004b;151:29-37.
54. Jones RD, Pugh PJ, Jones TH, Channer KS. The vasodilatory action of testosterone: a potassium-channel opening or a calcium antagonistic action? *Br J Pharmacol* 2003;138:733-44.
55. Kang SM, Jang Y, Kim JY, Chung N, Cho SY, Chae JS, Lee JH. Effect of oral administration of testosterone on brachial arterial vasoreactivity in men with coronary artery disease. *Am J Cardiol* 2002;89:862-864.
56. Kharbanda RK, Deanfield JE. Functions of the healthy endothelium. *Coron Artery Dis*. 2001;12:485-91.
57. Khaw KT, Barrett-Connor E. Blood pressure and endogenous testosterone in men: an inverse relationship. *J Hypertens* 1988;6:329-332.
58. Kim J, Montagnani M, Koh K, Quon M. Reciprocal relationships between insulin resistance and endothelial dysfunction. *Circulation* 2006;113:1888-1904.

59. Kitta Y, Obata JE, Nakamura T, Hirano M, Kodama Y, Fujioka D, Saito Y, Kawabata K, Sano K, Kobayashi T, Yano T, Nakamura K, Kugiyama K. Persistent impairment of endothelial vasomotor function has a negative impact on outcome in patients with coronary artery disease. *J Am Coll Cardiol* 2009;53:323-30.
60. Kouloumenta V, Hatziefthimiou A, Paraskeva E, Gourgoulisanis K, Molyvdas PA. Non-genomic effect of testosterone on airway smooth muscle. *Br J Pharmacol* 2006;149:1083-1091.
61. Kumanov P, Tomova A, Kirilov G, Dakovska L, Schinkov A. Increased plasma endothelin levels in patients with male hypogonadism. *Andrologia* 2002;34:29-33.
62. Kuvin JT, Patel AR, Sliney KA, Pandian NG, Sheffy J, Schnall RP, Karas RH, Udelson JE. Assessment of peripheral vascular endothelial function with finger arterial pulse wave amplitude. *Am Heart J* 2003;146:168–174.
63. Latini M, Conte D, Isidori A, Romanelli F. Gonadal function changes in healthy, aging men. *J Endocrinol Invest* 2002;25(10 Suppl):89-90.
64. Liu D, Dillon JS. Dehydroepiandrosterone activates endothelial cell nitric-oxide synthase by a specific plasma membrane receptor coupled to Galpha(i2,3). *J Biol Chem* 2002;277:21379-88.
65. Liu D, Dillon JS. Dehydroepiandrosterone stimulates nitric oxide release in vascular endothelial cells: evidence for a cell surface receptor. *Steroids* 2004;69:279-289.
66. Liu PY, Death AK, Handelsman DJ. Androgens and cardiovascular disease. *Endocr Rev* 2003;24:313-40.
67. Lu YL, Kuang L, Zhu H, Wu H, Wang XF, Pang YP, Wang NJ, Yu DL. Changes in aortic endothelium ultrastructure in male rats following castration, replacement with testosterone and administration of 5-alpha-reductase inhibitor. *Asian J Androl* 2007;9:843-847.
68. Maas R, Schwedhelm E, Albsmeier J, Böger, RH. The pathophysiology of erectile dysfunction related to EDys and mediators of vascular function. *Vasc Med* 2002;7:213-225.
69. Mahmud FH, Earing MG, Lee RA, Lteif AN, Driscoll DJ, Lerman A. Altered endothelial function in asymptomatic male adolescents with type 1 diabetes. *Congenit Heart Dis* 2006;1:98-103.
70. Malkin CJ, Jones RD, Jones TH, Channer KS. Effect of testosterone on ex vivo vascular reactivity in man. *Clin Sci (Lond)* 2006a;111:265-274.
71. Malkin CJ, Jones TH, Channer KS. The effect of testosterone on insulin sensitivity in men with heart failure. *Eur J Heart Fail* 2007;9:44-50.

72. Malkin CJ, Morris PD, Pugh PJ, English KM, Channer KS. Effect of testosterone therapy on QT dispersion in men with heart failure. *Am J Cardiol* 2003a;92:1241-1243.
73. Malkin CJ, Pugh PJ, Jones RD, Jones TH, Channer KS. Testosterone as a protective factor against atherosclerosis—immunomodulation and influence upon plaque development and stability. *J Endocrinol* 2003b;178:373-380.
74. Malkin CJ, Pugh PJ, Jones RD, Kapoor D, Channer KS, Jones TH. The effect of testosterone replacement on endogenous inflammatory cytokines and lipid profiles in hypogonadal men. *J Clin Endocrinol Metab* 2004a;89:3313-3318.
75. Malkin CJ, Pugh PJ, Jones TH, Channer KS. Testosterone for secondary prevention in men with ischaemic heart disease? *QJM* 2003c;96:521-529.
76. Malkin CJ, Pugh PJ, Morris PD, Kerry KE, Jones RD, Jones TH, Channer KS. Testosterone replacement in hypogonadal men with angina improves ischaemic threshold and quality of life. *Heart* 2004b;90:871-876.
77. Malkin CJ, Pugh PJ, West JN, van Beek EJ, Jones TH, Channer KS. Testosterone therapy in men with moderate severity heart failure: a double-blind randomized placebo controlled trial. *Eur Heart J* 2006b;27:57-64.
78. Mårin P, Holmäng S, Jönsson L, Sjöström L, Kvist H, Holm G, Lindstedt G, Bjorntoröp P. The effects of testosterone treatment on body composition and metabolism in middle-aged obese men. *Int J Obes Relat Metab Disord* 1992;16:991-997.
79. McVeigh GE, Cohn JN. Endothelial dysfunction and the metabolic syndrome. *Curr Diabetes Rep* 2003;3:87-92.
80. Miller VM, Mulvagh SL. Sex steroids and endothelial function: translating basic science to clinical practice. *Trends Pharmacol Sci* 2007;28:263-270.
81. Moerland M, Kales AJ, Schrier L, van Dongen MG, Bradnock D, Burggraaf J. Evaluation of the EndoPAT as a Tool to Assess Endothelial Function. *Int J Vasc Med* 2012;2012:904141.
82. Montaña LM, Calixto E, Figueroa A, Flores-Soto E, Carbajal V, Perusquía M. Relaxation of androgens on rat thoracic aorta: testosterone concentration dependent agonist/antagonist L-type Ca^{2+} channel activity, and 5 β -dihydrotestosterone restricted to L-type Ca^{2+} channel blockade. *Endocrinology* 2008;149:2517-2526.
83. Murphy JG, Khalil RA. Decreased $[Ca^{2+}]_i$ during inhibition of coronary smooth muscle contraction by 17 β -estradiol, progesterone, and testosterone. *J Pharmacol Exp Ther* 1999;291:44-52.

84. Navarro-Dorado J, Orensanz LM, Recio P, Bustamante S, Benedito S, Martínez AC, García-Sacristán A, Prieto D, Hernández M. Mechanisms involved in testosterone-induced vasodilatation in pig prostatic small arteries. *Life Sci* 2008;83:569-573.
85. Ong PJ, Patrizi G, Chong WC, Webb CM, Hayward CS, Collins P. Testosterone enhances flow-mediated brachial artery reactivity in men with coronary artery disease. *Am J Cardiol* 2000;85:269-72.
86. Onkelinx S, Cornelissen V, Goetschalckx K, Thomaes T, Verhamme P, Vanhees L. Reproducibility of different methods to measure the endothelial function. *Vasc Med* 2012;17:79-84.
87. Panes J, Perry M, Granger DN. Leukocyte-endothelial cell adhesion: avenues for therapeutic intervention. *Br J Pharmacol* 1999;126:537-550.
88. Perticone F, Ceravolo R, Pujia A, Ventura G, Iacopino S, Scozzafava A, Ferraro A, Chello M, Mastroberto P, Verdecchia P, Schillaci G. Prognostic significance of endothelial dysfunction in hypertensive patients. *Circulation* 2001;104:191-6.
89. Perusquía M, Navarrete E, González L, Villalón CM. The modulatory role of androgens and progestins in the induction of vasorelaxation in human umbilical artery. *Life Sci* 2007;81:993-1002.
90. Perusquía M, Navarrete E, Jasso-Kamel J, Montañó LM. Androgens induce relaxation of contractile activity in pregnant human myometrium at term: a nongenomic action on L-type calcium channels. *Biol Reprod* 2005;73:214-221.
91. Perusquía M, Stallone JN. Do androgens play a beneficial role in the regulation of vascular tone? Nongenomic vascular effects of testosterone metabolites. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2010;298:H1301-7.
92. Phillips GB, Jing TY, Resnick LM, Barbagallo M, Laragh JH, Sealey JE. Sex hormones and hemostatic risk factors for coronary heart disease in men with hypertension. *J Hypertens* 1993;11:699-702.
93. Polderman KH, Stehouwer CDA, van Kamp GJ, Dekker GA, Verheugt FWA, Gooren LJG. Influence of sex hormones on plasma endothelin levels. *Ann Intern Med* 1993;118:429-432.
94. Poredos P, Jezovnik MK. Testing Endothelial Function and its Clinical Relevance. *J Atheroscler Thromb* 2012 Sep 10. [Epub ahead of print]
95. Poredos P. Endothelial dysfunction and cardiovascular disease. *Pathophysiol Haemost Thromb* 2002;32:274-7.

96. Reaven GM, Lithell H, Landsberg L. Hypertension and associated metabolic abnormalities—the role of insulin resistance and the sympathoadrenal system. *N Engl J Med* 1996;334:374-381.
97. Romanelli F, Sansone A, Lenzi A. Erectile dysfunction in aging male. *Acta Biomed* 2010;81 Suppl 1:89-94.
98. Rowell KO, Hall J, Pugh PJ, Jones TH, Channer KS, Jones RD. Testosterone acts as an efficacious vasodilator in isolated human pulmonary arteries and veins: evidence for a biphasic effect at physiological and supra-physiological concentrations. *J Endocrinol Invest* 2009;32:718-723.
99. Rubinshtein R, Kuvin JT, Soffler M, Lennon RJ, Lavi S, Nelson RE, Pumper GM, Lerman LO, Lerman A. Assessment of endothelial function by non-invasive peripheral arterial tonometry predicts late cardiovascular adverse events. *Eur Heart J* 2010;31:1142-8.
100. Saad F, Aversa A, Isidori AM, Zafalon L, Zitzmann M, Gooren L. Onset of effects of testosterone treatment and time span until maximum effects are achieved. *Eur J Endocrinol* 2011;165:675-85.
101. Sagripanti A, arpi A. Antithrombotic and prothrombotic activities of the vascular endothelium. *Biomed Pharmacother* 2000;54:107-111.
102. Scragg JL, Dallas ML, Peers C. Molecular requirements for L-type Ca^{2+} channel blockade by testosterone. *Cell Calcium* 2007;42:11-15.
103. Scragg JL, Jones RD, Channer KS, Jones TH, Peers C. Testosterone is a potent inhibitor of L-type Ca^{2+} channels. *Biochem Biophys Res Commun* 2004;318:503-506.
104. Seftel AD. Male hypogonadism. Part I: epidemiology of hypogonadism. *Int J Impot Res* 2006a,18:115-20.
105. Seftel AD. Male hypogonadism. Part II: etiology, pathophysiology, and diagnosis. *Int J Impot Res* 2006b,18:223-8.
106. Simoncini T, Genazzani AR. Dehydroepiandrosterone, the endothelium, and cardiovascular protection. *Endocrinology* 2007;148:3065-7.
107. Simoncini T, Mannella P, Fornari L, Caruso A, Varone G, Genazzani AR. Genomic and non-genomic effects of estrogens on endothelial cells. *Steroids* 2004;69:537–542.
108. Smith JC, Bennett S, Evans LM, Kynaston HG, Parmar M, Mason MD, Cockcroft JR, Scanlon MF, Davies JS. The effects of induced hypogonadism on arterial stiffness, body composition, and metabolic parameters in males with prostate cancer. *J Clin Endocrinol Metab* 2001;86:4261-7.

109. Sobel BE. Insulin resistance and thrombosis: a cardiologist's view. *Am J Cardiol* 1999;84:37J-41J.
110. Sochorová R, Mosnářová A, Huzuláková I. The possible influence of testosterone on calcium ion transport (investigated) in guinea pig uterus. *Acta Physiol Hung* 1991;77:19-24.
111. Svartberg J, von Muhlen D, Schirmer H, Barrett-Connor E, Sundfjord J, Jorde R. Association of endogenous testosterone with blood pressure and left ventricular mass in men. The Tromso Study. *Eur J Endocrinol* 2004;150:65-71.
112. Tenover JS. Effects of testosterone supplementation in the aging male. *J Clin Endocrinol Metab* 1992;75:1092-1098.
113. Tep-areenan P, Kendall DA, Randall MD. Mechanisms of vasorelaxation to testosterone in the rat aorta. *Eur J Pharmacol* 2003;465:125-132.
114. Thijssen DH, Black MA, Pyke KE, Padilla J, Atkinson G, Harris RA, Parker B, Widlansky ME, Tschakovsky ME, Green DJ. Assessment of flow-mediated dilation in humans: a methodological and physiological guideline. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2011;300:H2-12.
115. Traish AM, Abu-Zahra H, Guay AT. The brain, the penis and steroid hormones: clinical correlates with endothelial dysfunction. *Curr Pharm Des* 2008;14:3723–36.
116. Traish AM, Guay AT, Feeley R, Saad F. The dark side of testosterone deficiency: I. Metabolic syndrome and erectile dysfunction. *J Androl* 2009a;30:10-22.
117. Traish AM, Saad F, Guay AT. The dark side of testosterone deficiency: II. Type 2 diabetes and insulin resistance. *J Androl* 2009b;30:23-32.
118. Vane JR, Anggard EE, Botting RM. Regulatory functions of the vascular endothelium. *N Engl J Med* 1990;323:27-36.
119. Vita JA, Keaney JF Jr. Endothelial function: a barometer for cardiovascular risk? *Circulation* 2002;106:640-2.
120. Webb C, Elkington A, Kraidly M, Keenan N, Pennell D, Collins P. Effects of oral testosterone treatment on myocardial perfusion and vascular function in men with low plasma testosterone and coronary heart disease. *Am J Cardiol* 2008;101:618-624.
121. Webb CM, Adamson DL, de Zeigler D, Collins P. Effect of acute testosterone on myocardial ischemia in men with coronary artery disease. *Am J Cardiol* 1999;83:437-439.

122. Webb CM, McNeill JG, Hayward CS, de Zeigler D, Collins P. Effects of testosterone on coronary vasomotor regulation in men with coronary heart disease. *Circulation* 1999;100:1690-6.
123. Weinbauer GF, Luetjens CM, Simoni M, Nieschlag E. Physiology of Testicular Function. In: *Andrology*, Nieschlag E, Behre HM, Nieschlag S Eds., 3rd edition, Springer-Verlag Berlin Heidelberg 2010.
124. White RE, Owen MP, Stallone JN. Testosterone-induced vasorelaxation of rat mesenteric microvasculature is K⁺ channel- and nitric oxide dependent but estrogen-independent (Abstract). *FASEB J* 2007;21:972.10.
125. Witte DR, Broekmans WM, Kardinaal AF, Klopping-Ketelaars IA, van Poppel G, Bots ML. Soluble intercellular adhesion molecule 1 and flow-mediated dilatation are related to the estimated risk of coronary heart disease independently from each other. *Atherosclerosis* 2003;170:147-53.
126. Wu FC, von Eckardstein A. Androgens and coronary artery disease. *Endocr Rev* 2003;24:183-217.
127. Wu WC, Sharma SC, Choudhary G, Coulter L, Coccio E, Eaton CB. Flow-mediated vasodilation predicts the presence and extent of coronary artery disease assessed by stress thallium imaging. *J Nucl Cardiol* 2005;12:538-44.
128. Yaron M, Greenman Y, Rosenfeld JB, Izkhakov E, Limor R, Osher E, Shenkerman G, Tordjman K, Stern N. Effect of testosterone replacement therapy on arterial stiffness in older hypogonadal men. *Eur J Endocrinol* 2009;160:839-846.
129. Yavuz BB, Yavuz B, Sener DD, Cankurtaran M, Halil M, Ulger Z, Nazli N, Kabakci G, Aytemir K, Tokgozoglu L, Oto A, Ariogul S. Advanced age is associated with endothelial dysfunction in healthy elderly subjects. *Gerontology* 2008;54:153-6.
130. Yıldırım E, Erol K. The effects of testosterone on isolated sheep coronary artery. *Anadolu Kardiyol Derg* 2011;11:343-50.
131. Yıldız O, Seyrek M, Gul H, Un I, Yildirim V, Ozal E, Uzun M, Bolu E. Testosterone relaxes human internal mammary artery in vitro. *J Cardiovasc Pharmacol* 2005;45:580-585.
132. Yıldız O, Seyrek M. Vasodilating mechanisms of testosterone. *Exp Clin Endocrinol Diabetes* 2007;115:1-6.
133. Yue P, Chatterjee K, Beale C, Poole-Wilson PA, Collins P. Testosterone relaxes rabbit coronary arteries and aorta. *Circulation* 1995;91:1154-1160.

134. Zitzmann M, Brune M, Kornmann B, Gromoll J, Junker R, Nieschlag E. The CAG repeat polymorphism in the androgen receptor gene affects bone density and bone metabolism in healthy males. *Clin Endocrinol (Oxf)* 2001b;55:649-57.
135. Zitzmann M, Brune M, Kornmann B, Gromoll J, von Eckardstein S, von Eckardstein A, Nieschlag E. The CAG repeat polymorphism in the AR gene affects high density lipoprotein cholesterol and arterial vasoreactivity. *J Clin Endocrinol Metab* 2001a;86:4867-73.
136. Zitzmann M, Brune M, Nieschlag E. Vascular reactivity in hypogonadal men is reduced by androgen substitution. *J Clin Endocrinol Metab* 2002;87:5030-7.
137. Zitzmann M. The role of the CAG repeat androgen receptor polymorphism in andrology. *Front Horm Res* 2009;37:52-61.